



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012022799-8 B1



(22) Data do Depósito: 10/03/2011

(45) Data de Concessão: 30/11/2021

(54) Título: USO DE UMA COMPOSIÇÃO DE FIBRA DIETÉTICA DE POLISSACARÍDEO ALTAMENTE VISCOSA, E MÉTODO DE PREPARAR UM PRODUTO DE ALIMENTO MEDICINAL

(51) Int.Cl.: A61K 31/736; A61K 31/723; A61K 31/734; A61P 1/18; A61P 3/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 10/03/2010 US 61/312,630; 23/06/2010 US 61/357,658.

(73) Titular(es): INOVOBIOLOGIC, INC.

(72) Inventor(es): ROLAND J. GAHLER; MICHAEL LYON; SIMON WOOD; CHRISTOPHER JOHN LAWSON.

(86) Pedido PCT: PCT CA2011000260 de 10/03/2011

(87) Publicação PCT: WO 2011/109900 de 15/09/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/09/2012

(57) Resumo: ALIMENTO COMPREENDENDO GLUCOMANANO, GOMA XANTANA E ALGINATO PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS METABÓLICOS. Suplementos dietéticos e alimento compreendendo uma mistura de glucomanano goma xantana e alginato. Os alimentos e suplementos são usados para retardar o início de, reduzir a progressão de, e /ou melhorar pelo menos um sintoma de, síndrome metabólica, diabetes tipo I, diabetes tipo II, doença pancreática ou hiperlipidemia. A mistura de glucomanano, goma xantana e alginato é analisada usando métodos padrão de análise de carboidrato envolvendo hidrólise ácida dos polissacarídeos seguido por separação cromatográfica.

“USO DE UMA COMPOSIÇÃO DE FIBRA DIETÉTICA DE POLISSACARÍDEO ALTAMENTE VISCOSA, E MÉTODO DE PREPARAR UM PRODUTO DE ALIMENTO MEDICINAL”

REFERÊNCIAS CRUZADAS AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Nº 61/312.630, depositado em 10 de Março de 2010, e Pedido Nº 61/357.658, depositado em 23 de Junho de 2010, as divulgações dos quais são incorporadas aqui por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A invenção refere-se a composições de fibra dietética, alimentos medicinais compreendendo composições de fibra dietética, e seu uso para retardar o início e/ou reduzir a severidade da síndrome metabólica e de diabetes Tipo II.

FUNDAMENTOS

[0003] Obesidade e síndrome metabólica, condições que podem levar ao desenvolvimento de diabetes Tipo II, tornaram-se mais e mais comuns. Um aumento em níveis de obesidade visceral, glicose sérica, e insulina, junto com hipertensão e dislipidemia são um grupo de condições clínicas que são coletivamente conhecidas como a síndrome metabólica (E.J. Gallagher et al., *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37:559-79 (2008)). Foi descoberto que estas condições são devido à resistência à insulina crescente das células, e em muitos casos, estes sintomas são um precursor para diabetes Tipo II. Existem correntemente controvérsias sobre os critérios diagnósticos exatos que identificam síndrome metabólica, e nenhum produto farmacêutico foi aprovado para seu tratamento, embora dislipidemias e hipertensão associadas têm intervenções medicamentosas específicas. A diabetes Tipo II é tipicamente manejada com vários produtos farmacêuticos para regular o açúcar no sangue e, em casos mais severos, injeções de insulina. Entretanto, dieta e perda de peso desempenham um papel principal em corrigir muitas anormalidades metabólicas associadas tanto com síndrome metabólica quanto com diabetes Tipo II (Yip et al., *Obesity Res.* 9:341S-347S (2001)). A pesquisa mostrou que aqueles que têm síndrome metabólica têm um risco maior em 50 % de experienciar um evento coronário maior (D.E. Moller et al., *Annu. Rev. Med.* 56:45-62 (2005)). Como tal,

quaisquer reduções em peso, insulina de jejum, e glicose confeririam benefícios de saúde significantes sobre aqueles indivíduos assim afligidos.

[0004] O consumo de alimentos com um índice glicêmico alto é conhecido levar à ingestão em excesso de alimentos e obesidade (Ludwig et al., *Pediatrics* 103(3):E26 (1999)). Portanto, é preferível que qualquer agente usado no manejo de condições diabéticas ou pré-diabéticas assim como perda de peso seja baixo em índice glicêmico. É mais preferível se tais agentes reduzissem o índice glicêmico dos alimentos.

[0005] Uma redução no consumo de carboidrato também é necessária no manejo bem sucedido de condições diabéticas. A recomendação de dieta é útil, mas diabéticos experienciam mais desejos por alimentos conforme eles experienciam estados mais frequentes de hipoglicemia (Strachan et al., *Physiol. Behav.* 80(5):675-82 (2004)). Adicionalmente, terapias que reduzem níveis de glicose no sangue em pacientes diabéticos são frequentemente associadas com o efeito colateral indesejável de ganho de peso corporal (Schultes et al., *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 88(3):1133-41 (2003)). Foi relatado que dietas altas em fibra solúvel podem reduzir o risco de diabetes através de sensibilidade à insulina aumentada (Ylonen et al., *Diabetes Care* 26:1979-85 (2003)). Isto pode resultar do papel possível da fibra dietética na regulação do açúcar no sangue. Também foi relatado que refeições com viscosidade alta produzem um sentimento maior de satisfação comparado a refeições com viscosidade baixa (Marciani et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280:G1227-33 (2001)).

[0006] Assim, existe uma necessidade para composições de fibra dietética que ajudam no manejo da síndrome metabólica incluindo condições diabéticas reduzindo-se níveis de açúcar no sangue e promovendo-se a saciedade. A presente invenção dirige-se a esta necessidade e outras.

SUMÁRIO

[0007] Em um aspecto, a invenção fornece um alimento medicinal composto para a prevenção, tratamento, ou melhora de um ou mais sintomas associados com uma doença ou distúrbio metabólicos. O alimento medicinal de acordo com este aspecto

da invenção compreende uma composição de fibra dietética de polissacarídeo altamente viscosa compreendendo uma combinação de fibra viscosa ("VFB") ou complexo ("VFC") desta, compreendendo de cerca de 48 % a cerca de 90 % (p/p) de glucomanano, de cerca de 5 % a cerca de 20 % (p/p) de goma xantana, e de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) de alginato, e pelo menos um macronutriente selecionado do grupo consistindo em proteína, carboidrato, e gordura.

[0008] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método de preparar um produto de alimento medicinal compreendendo a etapa de adicionar uma quantidade eficaz de uma composição de fibra dietética compreendendo uma combinação de fibra viscosa (VFB) ou complexo ("VFC") desta, compreendendo glucomanano, goma xantana, e alginato, ao produto de alimento medicinal. Em algumas formas de realização, o produto de alimento medicinal é composto para a prevenção, tratamento ou melhora de um ou mais sintomas associados com uma doença ou distúrbio metabólicos. Em algumas formas de realização, a composição de fibra dietética adicionada ao produto de alimento medicinal compreende de cerca de 48 % a cerca de 90 % (p/p) de glucomanano, de cerca de 5 % a cerca de 20 % (p/p) de goma xantana, e de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) de alginato.

[0009] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para prevenir, tratar, ou melhorar um ou mais sintomas associados com uma doença ou distúrbio metabólicos. O método de acordo com este aspecto da invenção compreende administrar a um paciente humano em necessidade deste de cerca de 25 mg/kg/dia a cerca de 1000 mg/kg/dia de uma composição de fibra dietética de polissacarídeo altamente viscosa compreendendo uma combinação de fibra viscosa (VFB) ou complexo (VFC) desta, compreendendo de cerca de 48 % a cerca de 90 % (p/p) de glucomanano, de cerca de 5 % a cerca de 20 % (p/p) de goma xantana, e de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) de alginato eficazes por um período de tempo eficaz para prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas associados com a doença ou distúrbio metabólicos no paciente.

[0010] Ainda em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para melhorar pelo menos um sintoma associado com a progressão de resistência à

insulina em um paciente mamífero sofrendo de, ou em risco para, desenvolver diabetes tipo II. O método de acordo com este aspecto da invenção compreende administrar ao paciente mamífero em necessidade deste de cerca de 25 mg/kg/dia a cerca de 1000 mg/kg/dia de uma composição de fibra dietética de polissacarídeo altamente viscosa compreendendo uma combinação de fibra viscosa (VFB), ou complexo desta (VFC), compreendendo de cerca de 48 % a cerca de 90 % (p/p) de glucomanano, de cerca de 5 % a cerca de 20 % (p/p) de goma xantana, e de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) de alginato por um período de pelo menos duas semanas.

[0011] Ainda em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para determinar os açúcares constituintes em uma amostra compreendendo pelo menos um polissacarídeo. Os métodos de acordo com este aspecto da invenção compreendem: (a) hidrolisar uma amostra compreendendo pelo menos um polissacarídeo com um ácido para produzir um hidrolisado; (b) separar os produtos da hidrólise no hidrolisado com um método cromatográfico; (c) detectar os produtos da hidrólise separados na etapa (b); e (d) comparar os produtos da hidrólise detectados na etapa (c) a um ou mais padrões de referência para determinar os açúcares constituintes na amostra.

Descrição dos Desenhos

[0012] Os aspectos precedentes e muitas das vantagens presentes desta invenção tornar-se-ão mais facilmente avaliados conforme os mesmos tornam-se melhores entendidos por referência à descrição detalhada seguinte, quando tomados em combinação com os desenhos anexos, em que:

[0013] A FIGURA 1A ilustra graficamente o efeito de dietas de VFC, celulose, ou inulina sobre o peso corporal (g) com o passar do tempo durante o estudo de oito semanas em ratos diabéticos Zucker, como descrito no Exemplo 1;

[0014] A FIGURA 1B ilustra graficamente o efeito de dietas de VFC, celulose, ou inulina sobre o consumo de alimentos (g/dia) com o passar do tempo durante o estudo de 8 semanas em ratos diabéticos Zucker, como descrito no Exemplo 1;

[0015] A FIGURA 2A ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre níveis de glicose no sangue de jejum (mg/dL) com o passar

do tempo durante o estudo de 8 semanas em ratos diabéticos Zucker, como descrito no Exemplo 1;

[0016] A FIGURA 2B ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre níveis de insulina sérica de jejum (ng/mL) com o passar do tempo durante o estudo de 8 semanas em ratos diabéticos Zucker, como descrito no Exemplo 1;

[0017] A FIGURA 2C ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre níveis de glicose no sangue que não de jejum (mg/dL) com o passar do tempo durante o estudo de 8 semanas em ratos diabéticos Zucker, como descrito no Exemplo 1;

[0018] A FIGURA 2D ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre contagens de Modelo de Avaliação da Homeostase (HOMA) de jejum ($\text{mg}^*\text{U}/\text{ml}^2$) com o passar do tempo durante o estudo de 8 semanas em ratos diabéticos Zucker, como descrito no Exemplo 1;

[0019] A FIGURA 3A ilustra graficamente as contagens do índice de sensibilidade à insulina compósito (CISI) para ratos diabéticos Zucker de jejum alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina durante o estudo de 8 semanas, como descrito no Exemplo 1;

[0020] A FIGURA 3B ilustra graficamente as contagens do índice de sensibilidade à insulina compósito (CISI) para ratos diabéticos Zucker que não de jejum alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina durante o estudo de 8 semanas, como descrito no Exemplo 1;

[0021] A FIGURA 3C ilustra graficamente as contagens de HOMA para ratos diabéticos Zucker que não de jejum alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina durante o estudo de 8 semanas, como descrito no Exemplo 1;

[0022] A FIGURA 4 ilustra graficamente o nível de triglicerídeos séricos medido em ratos diabéticos Zucker de jejum alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina durante o estudo de 8 semanas, como descrito no Exemplo 1;

[0023] A FIGURA 5A ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre ratos diabéticos Zucker depois de 8 semanas em dilatação

do túbulo renal, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa, como descrito no Exemplo 1;

[0024] A FIGURA 5B ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre ratos diabéticos Zucker depois de 8 semanas em degeneração/regeneração do túbulo renal, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa, como descrito no Exemplo 1;

[0025] A FIGURA 5C ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre ratos diabéticos Zucker depois de 8 semanas em expansão mesangial renal, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa, como descrito no Exemplo 1;

[0026] A FIGURA 6 ilustra graficamente a porcentagem de área imunorreativa de insulina nas ilhotas pancreáticas presente em ratos diabéticos Zucker alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina no final do estudo de 8 semanas, como determinado por coloração com anticorpo anti-insulina de rato, como descrito no Exemplo 1;

[0027] A FIGURA 7A ilustra graficamente a contagem histológica para infiltrados de célula inflamatória mononuclear das ilhotas pancreáticas presentes em ratos diabéticos Zucker alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina no final do estudo de 8 semanas, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa, como descrito no Exemplo 1;

[0028] A FIGURA 7B ilustra graficamente a contagem histológica para a degeneração de célula das ilhotas pancreáticas presente em ratos diabéticos Zucker alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina no final do estudo de 8 semanas, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa, como descrito no Exemplo 1;

[0029] A FIGURA 7C ilustra graficamente a contagem histológica para a quantidade de fibrose nas ilhotas pancreáticas presente em ratos diabéticos Zucker alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina no final do estudo de 8 semanas, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa, como descrito no Exemplo 1;

[0030] A FIGURA 8A ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre ratos diabéticos Zucker depois de 8 semanas em esteatose hepática, como medido por coloração com negro de Sudão reduzida, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa, como descrito no Exemplo 1;

[0031] A FIGURA 8B ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre ratos diabéticos Zucker depois de 8 semanas em vacuolização microvesicular hepática, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa, como descrito no Exemplo 1;

[0032] A FIGURA 8C ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre ratos diabéticos Zucker depois de 8 semanas em vacuolização macrovesicular hepática, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa, como descrito no Exemplo 1;

[0033] A FIGURA 9 ilustra graficamente o efeito de VFC ou celulose sobre o ganho de peso corporal e triacilgliceróis séricos (TAG) em ratos Sprague-Dawley alimentados com sacarose durante o estudo de 43 semanas, como descrito no Exemplo 2;

[0034] A FIGURA 10A ilustra graficamente o efeito de VFC ou controle (leite em pó desnatado) sobre níveis de PYY no plasma para todos os participantes do estudo adultos saudáveis durante um período de estudo de 3 semanas (V1 = início do estudo dia 0; V2 = dia 14; V3 = dia 21), como descrito no Exemplo 4;

[0035] A FIGURA 10B ilustra graficamente o efeito de VFC ou controle (leite em pó desnatado) sobre níveis de PYY no plasma em participantes do estudo adultos saudáveis com um BMI < 23 durante um período de estudo de 3 semanas (V1 = início do estudo dia 0; V2 = dia 14; V3 = dia 21), como descrito no Exemplo 4;

[0036] A FIGURA 10C ilustra graficamente o efeito de VFC ou controle (leite em pó desnatado) sobre níveis de grelina de jejum em participantes do estudo adultos saudáveis durante um período de 3 semanas (V1 = início do estudo dia 0; V2 = dia 14; V3 = dia 21), como descrito no Exemplo 4;

[0037] A FIGURA 11A ilustra graficamente a comparação de curva de fluxo de

VFB não granulada (referida como Mistura Ternária 1 ("TM1")) e VFC processado (por exemplo, granulado) (PGX[®]) em 0,5 % (p/p), como descrito no Exemplo 6;

[0038] A FIGURA 11B ilustra graficamente a comparação de curva de fluxo de VFB não granulada (referida como Mistura Ternária 1 ("TM1")) e VFC processado (por exemplo, granulado) (PGX[®]) em 0,2 % (p/p), como descrito no Exemplo 6;

[0039] A FIGURA 11C ilustra graficamente a comparação de curva de fluxo de VFB não granulada (referida como Mistura Ternária 1 ("TM1")) e VFC processado (por exemplo, granulado) (PGX[®]) em 0,1 % (p/p), como descrito no Exemplo 6;

[0040] A FIGURA 12A ilustra graficamente a comparação de lei de potência K de VFB não granulada (TM1), VFC processado (por exemplo, granulado) (PGX[®]) e goma xantana, como descrito no Exemplo 6;

[0041] A FIGURA 12B ilustra graficamente a comparação de lei de potência η de VFB não granulada (TM1), VFC processado (por exemplo, granulado) (PGX[®]) e goma xantana, como descrito no Exemplo 6;

[0042] A FIGURA 13A ilustra graficamente a curva de fluxo de glucomanano de konjac em 0,1 %, 0,2 %, e 0,5 % (p/p) como medido a 25 °C, como descrito no Exemplo 6;

[0043] A FIGURA 13B ilustra graficamente a curva de fluxo de goma xantana em 0,1 %, 0,2 %, e 0,5 % (p/p) como medido a 25 °C, como descrito no Exemplo 6;

[0044] A FIGURA 13C ilustra graficamente a curva de fluxo de alginato de sódio em 0,1 %, 0,2 %, e 0,5 % (p/p) como medido a 25 °C, como descrito no Exemplo 6;

[0045] A FIGURA 14A ilustra graficamente a curva de fluxo de soluções aquosas não aquecidas (concentração a 0,5 %) de misturas ternárias compreendendo glucomanano de konjac, goma xantana, e alginato de sódio, contendo glucomanano de konjac (KM) e goma xantana (XG) em uma razão constante (KM:XG = 4,12:1) e quantidades variáveis de alginato de sódio (0 %, 2 %, 5 %, 8 %, 11 %, 13 %, 17 %, 21 %, 24 %, 27 %, 30 %, e 33 %), medida a 25 °C, como descrito no Exemplo 6;

[0046] A FIGURA 14B ilustra graficamente a curva de fluxo de soluções aquosas (concentração a 0,5 %) aquecidas por 1 hora de misturas ternárias compreendendo glucomanano de konjac, goma xantana, e alginato de sódio, contendo glucomanano

de konjac (KM) e goma xantana (XG) em uma razão constante (KM:XG = 4,12:1) e quantidades variáveis de alginato de sódio (0 %, 2 %, 5 %, 8 %, 11 %, 13 %, 17 %, 21 %, 24 %, 27 %, 30 %, e 33 %), medida a 25 °C, como descrito no Exemplo 6;

[0047] A FIGURA 14C ilustra graficamente a curva de fluxo de soluções aquosas (concentração a 0,5 %) aquecidas por 4 horas de misturas ternárias compreendendo glucomanano de konjac, goma xantana, e alginato de sódio, contendo glucomanano de konjac (KM) e goma xantana (XG) em uma razão constante (KM:XG = 4,12:1) e quantidades variáveis de alginato de sódio (0 %, 2 %, 5 %, 8 %, 11 %, 13 %, 17 %, 21 %, 24 %, 27 %, 30 %, e 33 %), medida a 25 °C, como descrito no Exemplo 6;

[0048] A FIGURA 15A ilustra graficamente a dependência de K da proporção de alginato de sódio na mistura para soluções aquosas a 0,5 % não aquecidas ou aquecidas (uma hora) de misturas de glucomanano de konjac, goma xantana, e alginato de sódio em uma razão de KM:XG constante (4,12:1) e quantidades variáveis de alginato (0 a 33 %), como descrito no Exemplo 6;

[0049] A FIGURA 15B ilustra graficamente a dependência de n da proporção de alginato de sódio na mistura para a solução aquosa a 0,5 % não aquecida e aquecida (uma hora) de misturas de glucomanano de konjac, goma xantana, e alginato de sódio em uma razão de KM:XG constante (4,12:1) e quantidades variáveis de alginato (0 a 33 %), como descrito no Exemplo 6;

[0050] A FIGURA 16A ilustra graficamente as distribuições de concentração de sedimentação aparente $g^*(s)$ vs s para glucomanano em uma concentração de carga de 2 mg/ml e em $l = 0,0$, com uma Velocidade de rotor de 45.000 rpm, temperatura = 20,0 °C. A ordenada é expressada em unidades de franja por Svedberg (S) e a abscissa é em unidades de Svedberg, como descrito no Exemplo 6;

[0051] A FIGURA 16B ilustra graficamente as distribuições de concentração de sedimentação aparente $g^*(s)$ vs s para alginato de sódio em uma concentração de carga de 2 mg/ml e em $l = 0,0$, com uma Velocidade de rotor de 45.000 rpm, temperatura = 20,0 °C. A ordenada é expressada em unidades de franja por Svedberg (S) e a abscissa é em unidades de Svedberg, como descrito no Exemplo 6;

[0052] A FIGURA 16C ilustra graficamente as distribuições de concentração de

sedimentação aparente $g^*(s)$ vs s para xantana em uma concentração de carga de 2 mg/ml e em $l = 0,0$, com uma Velocidade de rotor de 45.000 rpm, temperatura = 20,0 °C. A ordenada é expressada em unidades de franja por Svedberg (S) e a abscissa é em unidades de Svedberg, como descrito no Exemplo 6;

[0053] A FIGURA 17A ilustra graficamente as distribuições de concentração de sedimentação aparente para VFB não processada/não granulada (referida como "TM1") em forças iônicas de 0 a 0,2 M, como descrito no Exemplo 6;

[0054] A FIGURA 17B ilustra graficamente as distribuições de concentração de sedimentação aparente para VFB não processada/não granulada (referida como "TM1") em forças iônicas de 0 a 0,01 M, como descrito no Exemplo 6;

[0055] A FIGURA 17C ilustra graficamente as distribuições de concentração de sedimentação aparente para VFC processado/granulado (PGX[®]) em forças iônicas de 0 a 0,01 M, como descrito no Exemplo 6;

[0056] A FIGURA 17D ilustra graficamente as distribuições de concentração de sedimentação aparente para VFC processado/granulado (PGX[®]) em forças iônicas de 0 a 0,2 M, como descrito no Exemplo 6;

[0057] A FIGURA 18A ilustra graficamente o efeito da força iônica (expressada em unidades de concentração molar M) sobre a quantidade de material com um coeficiente de sedimentação $> 3,5S$ para VFB não processada/não granulada (TM1), como descrito no Exemplo 6;

[0058] A FIGURA 18B ilustra graficamente o efeito da força iônica (expressada em unidades de concentração molar M) sobre a quantidade de material com um coeficiente de sedimentação $> 3,5S$ para VFC processado/granulado (PGX[®]), como descrito no Exemplo 6;

[0059] A FIGURA 19A ilustra graficamente as distribuições do coeficiente de sedimentação para misturas não aquecidas contendo uma razão de glucomanano:xantana fixa (KM:XG = 4,12:1) e concentrações de alginato variadas (de 0 % a 33 %), como descrito no Exemplo 6; e

[0060] A FIGURA 19B ilustra graficamente as distribuições do coeficiente de sedimentação para misturas aquecidas (1 ou 4 horas) contendo uma razão de

glucomanano:xantana fixa (KM:XG = 4,12:1) e concentrações de alginato variadas (de 0 % a 33 %), como descrito no Exemplo 6.

Descrição detalhada

[0061] A presente invenção fornece suplementos dietéticos, alimentos medicinais, e métodos eficazes para retardar o início, reduzir a progressão, e/ou melhorar pelo menos um dos sintomas de uma doença ou distúrbio metabólicos, tais como síndrome metabólica, diabetes tipo I, diabetes tipo II, doença pancreática, e/ou hiperlipidemia.

[0062] Como usado aqui, o termo "síndrome metabólica" refere-se a um ou mais dos sintomas seguintes: um aumento em níveis de obesidade visceral, glicose sérica, e insulina, junto com hipertensão e dislipidemia (E.J. Gallagher et al., *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37:559-79 (2008)). Síndrome metabólica é um nome para um grupo de sintomas que ocorrem juntos e são associados com o risco aumentado de desenvolver aterosclerose coronariana, acidente vascular cerebral, e diabetes tipo II. Os sintomas da síndrome metabólica incluem peso extra em volta da cintura (obesidade central ou abdominal), pressão sanguínea alta, triglicerídeos altos, resistência à insulina, colesterol HDL baixo, e dano tecidual causado por glicose alta. Acredita-se que a resistência à insulina seja a principal causa de síndrome metabólica.

[0063] Como usado aqui, o termo "melhorar pelo menos um dos sintomas de doença ou distúrbio metabólicos," inclui terapia sintomática para reduzir, aliviar, ou mascarar os sintomas da doença ou distúrbio, assim como terapia para prevenir, reduzir, parar, ou reverter a progressão da severidade da condição ou sintomas sendo tratados. Como tal, o termo "tratamento" inclui tanto o tratamento terapêutico medicinal de uma condição ou sintomas estabelecidos quanto a administração profilática, conforme apropriado.

[0064] Como usado aqui, o termo "tratar" também inclui, dependendo da condição do paciente em necessidade deste, prevenir a doença ou distúrbio metabólicos, ou prevenir um ou mais sintomas associados com a patologia da doença ou distúrbio metabólicos, incluindo início da doença ou distúrbio metabólicos ou de quaisquer sintomas associados com estes, assim como reduzir a severidade da doença ou distúrbio metabólicos ou prevenir uma reincidência de um ou mais sintomas

associados com a doença ou distúrbio metabólicos.

[0065] Como usado aqui, o termo "alimento medicinal" refere-se a um alimento que é formulado para ser consumido ou administrado enteralmente sob a supervisão de um médico e que é intencionado para o manejo dietético específico de uma doença ou condição para as quais os requerimentos nutricionais distintos, com base em princípios científicos reconhecidos, são estabelecidos por avaliação médica.

[0066] Como usado aqui, o termo "glucomanano" refere-se a uma fibra dietética solúvel em água com resíduos de D-manose ligados a β -(1,4) e de D-glicose ligados a β -(1,4) na razão de aproximadamente 3:1 e vários grupos finais de galactose ligados a α . Ela é o mais comumente isolada da raiz de konjac (*Amorphophallus konjac*), mas também pode ser isolada de outras fontes de plantas.

[0067] Como usado aqui, o termo "goma xantana" refere-se a um heteropolissacarídeo contendo glicose, manose, glicuronato, acetato e piruvato de potássio ou sódio.

[0068] Como usado aqui, o termo "alginato" refere-se a um polímero misto de ácido manurônico e ácido gulurônico.

[0069] Como usado aqui, o termo "combinação de fibra" refere-se a uma mistura de fibras.

[0070] Como usado aqui, o termo "combinação de fibra viscosa" ("VFB") refere-se a uma mistura de glucomanano, goma xantana, e alginato.

[0071] Como usado aqui, o termo "complexo de fibra viscosa" ("VFC") refere-se a uma matriz interconectável dos três componentes glucomanano, goma xantana, e alginato em que os componentes são processados em uma maneira (por exemplo, granulação) que permite que eles interajam para formar um novo ingrediente ao invés de uma mistura de três componentes separados formando-se interações secundárias e terciárias (zonas e redes de junção) entre os ingredientes brutos que impedem que os componentes individuais exibam as propriedades que eles todos mostrariam em seu estado puro.

Alimentos medicinais

[0072] Em um aspecto, a presente invenção fornece alimentos medicinais

compostos para a prevenção, tratamento, ou melhora de um ou mais sintomas associados com uma doença ou distúrbio metabólicos, tais como síndrome metabólica, diabetes tipo I ou tipo II, insuficiência pancreática exócrina, incluindo pacientes sofrendo de pancreatite crônica, e/ou hiperlipidemia. O alimento medicinal de acordo com este aspecto da invenção compreende uma composição de fibra dietética de polissacarídeo altamente viscosa compreendendo uma combinação de fibra viscosa (VFB), ou complexo desta (VFC), compreendendo de cerca de 48 % a cerca de 90 % (p/p) de glucomanano, de cerca de 5 % a cerca de 20 % (p/p) de goma xantana, e de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) de alginato, e pelo menos um macronutriente selecionado do grupo consistindo em proteína, carboidrato, e gordura.

[0073] Como descrito no Pedido de Patente U.S. pendente Nº 11/400.768, depositado em em 7 de Abril de 2006, e Pedido de Patente U.S. pendente Nº 11/830.615, depositado em 30 de Julho de 2007, cada um dos quais é por meio deste incorporado por referência, uma composição de fibra dietética de polissacarídeo altamente viscosa compreendendo uma combinação de fibra (VFB), ou complexo desta (VFC), produzidos combinando-se de cerca de 48 % a cerca de 90 % (p/p) de glucomanano, de cerca de 5 % a cerca de 20 % (p/p) de goma xantana, e de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) de alginato, foi desenvolvida, comercialmente referida como "PolyGlycopleX®" ou "PGX®," que possui uma capacidade de retenção de água muito alta e propriedade de formação de gel. Os componentes de polissacarídeo constituintes desta composição de fibra são complementares entre si e agem sinergicamente para formar interações fortes que levam a um nível de viscosidade que é três a cinco vezes mais alto do que qualquer outro polissacarídeo correntemente conhecido. Como descrito no Exemplos 5 e 6 aqui, foi determinado que quando processados (por exemplo, granulados), os três componentes glucomanano, goma xantana, e alginato interagem para formar um novo ingrediente (complexo ("VFC")) ao invés de uma mistura dos 3 componentes separados formando-se interações secundárias e terciárias (zonas e redes de junção) entre os ingredientes brutos que impedem que os componentes individuais exibam as propriedades que eles todos mostrariam em seu estado puro.

[0074] Esta composição de fibra dietética altamente viscosa comunica um aumento significativo na viscosidade de conteúdos gastrointestinais em uma quantidade gravimétrica mais baixa do que aquela que seria necessária com outras fibras solúveis. Esta propriedade altamente concentrada permite que esta composição de fibra comunique efeitos fisiológicos substanciais em doses que são significativamente mais baixas do que outras fibras solúveis, tornando-a assim mais fácil para incorporar quantidades significativas deste material em gêneros alimentícios.

[0075] Em uma forma de realização, os polissacarídeos usados na produção da combinação de fibra viscosa (VFB) são processados por intermédio de granulação para produzir uma matriz interconectável dos três componentes (isto é, um complexo (VFC)). Como usado aqui, "granulação" refere-se a qualquer processo de alargamento de tamanho em que partículas pequenas são reunidas em agregados permanentes, maiores. A granulação pode ser realizada por agitação em equipamento de mistura, por compactação, extrusão, ou globulação. As composições de fibra dietética podem ser granuladas usando vários tamanhos de malha. O termo "malha" refere-se ao tamanho da partícula como determinado por sua capacidade para passar através de uma peneira tendo furos de dimensões definidas. Os tamanhos de malha usados aqui são equivalentes de Tyler, como apresentado na Tabela 21-12 do Chemical Engineers Handbook (5ª ed., Perry & Chilton, eds.). Quanto maior a granulação (isto é, quanto menor o tamanho de malha) da composição de fibra dietética/complexo, mais tempo ela consome para que uma viscosidade desejada seja atingida. Em algumas formas de realização, a composição de fibra dietética/complexo é granulada usando um tamanho de malha combinado separando-se materiais granulados por seu tamanho de partícula, depois recombina-se os grânulos separados por tamanho de partícula para fornecer o perfil de viscosidade desejado. Por exemplo, um tamanho de malha combinado de 30 a 60 é obtido combinando-se grânulos de malha 30 (cerca de 600 microns), grânulos de malha 40 (cerca de 400 microns), e grânulos de malha 60 (250 microns).

[0076] As proporções de glucomanano, goma xantana, e alginato na

combinação/complexo de fibra dietética viscosa (VFB/C) contidas no alimento medicinal podem ser de cerca de 48 % a cerca de 90 % de glucomanano (tal como de cerca de 60 % a cerca de 80 %, ou de cerca de 60 % a cerca de 90 %, ou de cerca de 65 % a cerca de 75 %, ou de cerca de 50 % a cerca de 80 %, ou de cerca de 50 % a cerca de 70 %, ou cerca de 70 %), de cerca de 5 % a cerca de 20 % de goma xantana (tal como de cerca de 10 % a cerca de 20 % ou de cerca de 11 % a cerca de 13 %, ou de cerca de 13 % a cerca de 17 %, ou cerca de 13 %, ou cerca de 17 %), e de cerca de 5 % a cerca de 30 % de alginato (tal como de cerca de 10 % a cerca de 20 % ou de cerca de 13 % a cerca de 17 %, ou cerca de 13 %, ou cerca de 17 %). Em algumas formas de realização, proporções de glucomanano, goma xantana, e alginato nas composições dietéticas contidas no alimento medicinal são cerca de 70 % de glucomanano, de cerca de 13 % a cerca de 17 % de xantana, e de cerca de 13 % a cerca de 17 % de alginato.

[0077] Em algumas formas de realização, os alimentos medicinais são formulados para fornecer um consumo diário total em um paciente humano de 1,0 g a 100 g de uma combinação de fibra viscosa, ou complexo desta (VFB/C), compreendendo de cerca de 48 % a cerca de 90 % (p/p) de glucomanano, de cerca de 5 % a cerca de 20 % (p/p) de goma xantana, e de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) de alginato (VFB/C), tal como de cerca de 5 g a cerca de 50 g de VFB/C por dia, tal como de cerca de 10 g a cerca de 35 g de VFB/C por dia, de cerca de 12 g a 35 g de VFB/C por dia, ou tal como de cerca de 15 g a 35 g de VFB/C por dia, tal como de cerca de 20 g a 35 g de VFB/C por dia, tal como de cerca de 12 g a cerca de 25 g de VFB/C por dia, tal como de cerca de 15 g a cerca de 25 g de VFB/C por dia. Em algumas formas de realização, os alimentos medicinais são formulados para fornecer uma dosagem diária de VFB/C em um paciente humano de cerca de 25 mg/kg/dia a cerca de 1000 mg/kg/dia, tal como de cerca de 50 mg/kg/dia a cerca de 600 mg/kg/dia, tal como de cerca de 100 mg/kg/dia a cerca de 500 mg/kg/dia, tal como de cerca de 200 mg/kg/dia a cerca de 400 mg/kg/dia.

[0078] Os produtos de alimento medicinal da invenção podem conter ainda componentes adicionais tais como proteínas ou aminoácidos, carboidratos, lipídeos,

vitaminas, minerais, e cofatores, sabores naturais ou artificiais, corantes ou outros aditivos de coloração, e conservantes. O termo "vitaminas" inclui, mas não é limitado a, tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantotênico, piridoxina, biotina, ácido fólico, vitamina B12, ácido lipóico, ácido ascórbico, vitamina A, vitamina D, vitamina E, e vitamina K. Também incluídos dentro do termo "vitaminas" são cofatores e coenzimas tais como coenzimas incluindo pirofosfatos de tiamina (TPP), mononucleotídeo de flavina (FMM), dinucleotídeo de flavina adenina (FAD), dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NAD), fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADP), Coenzima A (CoA), fosfato de piridoxal, biocitina, ácido tetraidrofólico, coenzima B12, lipoillisina, 11-cis-retinal, e 1,25-diidroxicolecalciferol. O termo "vitaminas" também inclui colina, carnitina, e alfa, beta, e gama carotenos. O termo "minerais" refere-se a substâncias inorgânicas, metais, e semelhantes, necessárias na dieta humana, incluindo, mas não limitadas a, cálcio, ferro, zinco, selênio, cobre, iodo, magnésio, fósforo, cromo, manganês, potássio, e semelhantes, e misturas destes. O mineral pode estar na forma de um sal, um óxido, ou um sal quelado.

[0079] Em algumas formas de realização, os alimentos medicinais da invenção compreendem ainda um ou mais um lipídeos. Como usado de acordo com esta forma de realização da invenção, um lipídeo é definido como uma substância tal como uma gordura, óleo, ou cera que dissolve em álcool mas não em água. Como usado aqui, os termos "gordura" e "óleo" são usados permutavelmente e compreendem ácidos graxos. Em algumas formas de realização, o lipídeo para uso na composição compreende uma gordura selecionada do grupo consistindo em uma gordura láctea (por exemplo, gordura do leite, gordura da manteiga), uma gordura animal (por exemplo, banha) ou uma gordura vegetal (por exemplo, óleo de coco, manteiga de cacau, óleo de palma, ou margarina).

[0080] Em algumas formas de realização, o lipídeo para uso nos alimentos medicinais da invenção compreende um óleo comestível ou uma mistura de óleos. Tais óleos incluem óleos vegetais (por exemplo, óleo de canola, óleo de soja, óleo de palmiste, óleo de oliva, óleo de cártamo, óleo de semente de girassol, óleo de semente

do linho (linhaça), óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de amendoim, óleo de noz, óleo de amêndoa, óleo de semente de uva, óleo de onagrácea, óleo de coco, óleo de borragem, e óleo de cassis); óleos marinhos (por exemplo, óleos de peixe e óleos de fígado de peixe), ou uma mistura destes.

[0081] Em algumas formas de realização, o lipídeo para uso nos alimentos medicinais da invenção compreende óleos contendo triglicerídeos de cadeia média, tais como óleo de coco, óleo de palmiste, e manteiga ou triglicerídeos de cadeia média na forma purificada.

[0082] Em algumas formas de realização, os alimentos medicinais da invenção fornecem a única fonte de calorías e nutrientes para um paciente. Em algumas formas de realização, o alimento medicinal de acordo com a invenção é designado para fornecer a fonte primária de fibra na dieta de um paciente humano. Em algumas formas de realização, o alimento medicinal de acordo com a invenção é designado para fornecer a única fonte de fibra na dieta de um paciente humano e é rotulado e/ou administrado por um médico conseqüentemente.

[0083] Alimentos medicinais que devem ser consumidos como parte de uma dieta balanceada, completa são tipicamente formulados para substituir uma ou mais refeições por todo o dia, deste modo diminuindo a quantidade de fibra consumida de alimentos convencionais. Porque alimentos medicinais são administrados sob a supervisão de um médico, é improvável que os pacientes consumissem suplementos de fibra dietética adicionais contendo fibra.

[0084] Os alimentos medicinais da presente invenção são para uso por uma população seleta de pacientes que estão sob o cuidado e supervisão de um médico. Os alimentos medicinais da invenção podem ser administrados a um paciente mamífero, tal como um ser humano sofrendo de, ou em risco para, desenvolver uma condição metabólica de modo a prevenir, tratar, ou melhorar um ou mais sintomas associados com a doença ou distúrbio metabólicos, tais como síndrome metabólica, (também conhecida como síndrome X e síndrome da resistência à insulina), diabete tipo I, diabete tipo II, obesidade, esteatoepatose não alcoólica (doença hepática gordurosa), doença pancreática, e hiperlipidemia, como descrito ainda aqui.

[0085] Em algumas formas de realização, o alimento medicinal da invenção é administrado a um paciente em necessidade deste pelo menos uma vez por dia. Em algumas formas de realização, o alimento medicinal da invenção é administrado duas vezes por dia, preferivelmente uma vez na manhã e uma vez à tarde/noite. Um regime de tratamento típico para os alimentos medicinais continuará de pelo menos duas semanas a oito semanas ou mais. Dependendo de tais fatores como as condições médicas sendo tratadas e a resposta no paciente, o regime de tratamento pode ser estendido até que o paciente experiencie melhora de pelo menos um sintoma da doença ou distúrbio. Um alimento medicinal da presente invenção tipicamente será consumido em duas porções por dia como uma substituição de refeição ou lanche entre as refeições. Em algumas formas de realização, o alimento medicinal da invenção é administrado ao paciente como a única fonte de alimento três a quatro vezes por dia como parte de um regime de dieta com teor calórico muito baixo medicamente supervisionada. Um uso exemplar de uma dieta com teor calórico muito baixo é no tratamento de obesidade ocasionada por perda de peso rápida e a redução de fatores de risco cardiometabólicos.

Métodos de Fabricar Alimentos Medicinais

[0086] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método de preparar um produto de alimento medicinal compreendendo a etapa de adicionar uma quantidade eficaz de uma composição de fibra dietética compreendendo uma combinação de fibra viscosa (VFB), ou complexo desta (VFC) compreendendo glucomanano, goma xantana, e alginato, ao produto de alimento medicinal. Em algumas formas de realização, o método de preparar um produto de alimento medicinal compreende a etapa de adicionar uma quantidade eficaz de uma composição de fibra dietética compreendendo um complexo de fibra (VFC) formado de uma combinação de fibra viscosa (VFB) compreendendo glucomanano, goma xantana, e alginato ao produto de alimento medicinal.

[0087] Em algumas formas de realização, o produto de alimento medicinal é composto para a prevenção, tratamento, ou melhora de um ou mais sintomas associados com uma doença ou distúrbio metabólicos. Em algumas formas de

realização, a composição de fibra dietética adicionada ao produto de alimento medicinal compreende uma combinação de fibra (VFB), ou um complexo de fibra (VFC) formados da combinação de fibra (por exemplo, VFB granulada), compreendendo de cerca de 48 % a cerca de 90 % (p/p) de glucomanano (tal como de cerca de 60 % a cerca de 80 %, ou de cerca de 60 % a cerca de 90 %, ou de cerca de 65 % a cerca de 75 %, ou de cerca de 50 % a cerca de 80 %, ou de cerca de 50 % a cerca de 70 %, ou cerca de 70 %), de cerca de 5 % a cerca de 20 % (p/p) de goma xantana (tal como de cerca de 10 % a cerca de 20 %, ou de cerca de 11 % a cerca de 13 %, ou de cerca de 13 % a cerca de 17 %, ou cerca de 13 %, ou cerca de 17 %), e de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) de alginato (tal como de cerca de 10 % a cerca de 20 % ou de cerca de 13 % a cerca de 17 %, ou cerca de 13 %, ou cerca de 17 %). Em algumas formas de realização, proporções de glucomanano, goma xantana, e alginato na combinação de fibra, ou no complexo de fibra formado da combinação de fibra, contidas na composição de fibra dietética que é adicionada ao alimento medicinal são cerca de 70 % de glucomanano, de cerca de 13 % a cerca de 17 % de xantana, e de cerca de 13 % a cerca de 17 % de alginato.

[0088] Em algumas formas de realização, a quantidade da composição de fibra dietética compreendendo a combinação de fibra viscosa (VFB), ou complexo desta (VFC), adicionados a um produto de alimento medicinal formulado para o tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio metabólicos é de cerca de 5 % a cerca de 20 % do peso total do produto de alimento medicinal. Em algumas formas de realização, a quantidade da composição de fibra dietética, ou complexo desta (VFB/C) adicionados ao produto de alimento medicinal compreende de cerca de 1 g a 100 g por dia, tal como de 5 g a cerca de 50 g por dia, de cerca de 10 g a 35 g por dia, tal como de cerca de 12 g a 35 g por dia, tal como de cerca de 15 g a 35 g por dia, tal como de cerca de 20 g a 35 g por dia, tal como de cerca de 12 g a cerca de 25 g por dia, tal como de cerca de 15 g a cerca de 25 g por dia, com base no consumo de duas porções por dia. Os produtos de alimento medicinal da invenção são tipicamente consumidos pelo menos uma vez por dia, preferivelmente duas vezes ou três vezes por dia. O alimento medicinal de acordo com esta invenção é para administração oral.

[0089] A composição de fibra dietética compreendendo a combinação de fibra, ou complexo desta, pode ser combinada com qualquer tipo de produto de alimento medicinal, incluindo produtos de alimento medicinal sólidos, líquidos, ou semissólidos. Produtos de alimento medicinal sólidos exemplares incluem, mas não são limitados a, grãos (por exemplo, arroz, cereal (quente ou frio)), granola, farinha de aveia, produtos assados (pão, biscoitos, bolinhos, bolos, e outros), pasta (incluindo macarrões fabricados com arroz ou outros grãos), carne (por exemplo, aves domésticas, carne bovina, carne de cordeiro, carne de porco, frutos do mar), e produtos lácteos (por exemplo, leite, iogurte, queijo, sorvete, e manteiga). Produtos de alimento medicinal líquidos ou semilíquidos exemplares incluem, mas não são limitados a, bebidas de substituição de refeição, sucos de frutas, sopas (incluindo misturas de sopa em pó), suplementos dietéticos, e milk-shakes.

[0090] A composição de fibra dietética compreendendo a combinação de fibra ou complexo desta pode ser adicionada ao produto de alimento medicinal antes do consumo usando qualquer método adequado. Por exemplo, a composição de fibra dietética pode ser assada no produto de alimento medicinal, pode ser misturada com o produto de alimento medicinal, ou pulverizada sobre o produto de alimento medicinal.

[0091] Os alimentos medicinais da invenção são embalados em doses unitárias, com um rótulo claramente determinando que o produto é intencionado para uso no manejo de uma doença ou distúrbio metabólicos específicos, sob a supervisão de um médico.

Métodos para Prevenir, Tratar, ou Melhorar Um ou Mais Sintomas Associados Com Uma Doença ou Distúrbio Metabólicos

[0092] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para prevenir, tratar, ou melhorar um ou mais sintomas associados com uma doença ou distúrbio metabólicos, tais como síndrome metabólica, diabetes tipo I, diabetes tipo II, obesidade, esteatoepatose não alcoólica (doença hepática gordurosa), doença pancreática, e hiperlipidemia. O método de acordo com este aspecto da invenção compreende administrar a um paciente humano em necessidade deste uma dosagem

eficaz de uma composição de fibra dietética de polissacarídeo altamente viscosa compreendendo uma combinação de fibra viscosa (VFB) ou complexo desta (VFC), compreendendo de cerca de 48 % a cerca de 90 % (p/p) de glucomanano (tal como de cerca de 60 % a cerca de 80 %, ou de cerca de 60 % a cerca de 90 %, ou de cerca de 65 % a cerca de 75 %, ou de cerca de 50 % a cerca de 80 %, ou de cerca de 50 % a cerca de 70 %, ou cerca de 70 %), de cerca de 5 % a cerca de 20 % (p/p) de goma xantana (tal como de cerca de 10 % a cerca de 20 %, ou de cerca de 11 % a cerca de 13 %, ou de cerca de 13 % a cerca de 17 %, ou cerca de 13 %, ou cerca de 17 %), e de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) de alginato (tal como de cerca de 10 % a cerca de 20 % ou de cerca de 13 % a cerca de 17 %, ou cerca de 13 %, ou cerca de 17 %). Em algumas formas de realização, proporções de glucomanano, goma xantana, e alginato na combinação de fibra ou complexo desta são cerca de 70 % de glucomanano, de cerca de 13 % a cerca de 17 % de xantana, e de cerca de 13 % a cerca de 17 % de alginato.

[0093] Em algumas formas de realização, o método compreende administrar uma composição de fibra dietética compreendendo uma combinação de fibra viscosa (VFB) ou complexo desta (VFC, tal como, por exemplo, VFB granulada), compreendendo de cerca de 48 % a cerca de 90 % (p/p) de glucomanano, de cerca de 5 % a cerca de 20 % (p/p) de goma xantana, e de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) de alginato a um paciente humano em necessidade deste em uma dosagem de 1,0 g a 100 g de VFB/C por dia, tal como de cerca de 5 g a cerca de 50 g de VFB/C por dia, tal como de cerca de 10 g a cerca de 35 g de VFB/C por dia, de cerca de 12 g a 35 g de VFB/C por dia, ou tal como de cerca de 15 g a 35 g de VFB/C por dia, tal como de cerca de 20 g a 35 g de VFB/C por dia, tal como de cerca de 12 g a cerca de 25 g de VFB/C por dia, tal como de cerca de 15 g a cerca de 25 g de VFB/C por dia.

[0094] Em algumas formas de realização, o método compreende administrar um combinação de fibra dietética (VFB) ou complexo desta (VFC) a um paciente mamífero, tal como um paciente humano, em necessidade deste em uma dosagem de cerca de 25 mg/kg/dia a cerca de 1000 mg/kg/dia, tal como de cerca de 50 mg/kg/dia a cerca de 600 mg/kg/dia, tal como de cerca de 100 mg/kg/dia a cerca de

500 mg/kg/dia, tal como de cerca de 333 mg/kg/dia a cerca de 583 mg/kg/dia, tal como de cerca de 200 mg/kg/dia a cerca de 400 mg/kg/dia, por um período de tempo eficaz para prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas associados com a doença ou distúrbio metabólicos no paciente.

[0095] Em algumas formas de realização, a composição de fibra dietética compreendendo uma combinação de fibra (VFB) ou complexo desta (VFC) é administrada ao paciente na forma de um produto de alimento medicinal, como descrito aqui. Em algumas formas de realização, a composição de fibra dietética é administrada a um paciente em necessidade desta pelo menos uma vez por dia. Em algumas formas de realização, a composição de fibra dietética da invenção é administrada duas vezes por dia, preferivelmente uma vez na manhã e uma vez à tarde/noite. Um regime de tratamento típico de acordo com este aspecto da invenção continuará de pelo menos duas semanas a 16 semanas ou mais. Dependendo de tais fatores como as condições médicas sendo tratadas e a resposta no paciente, o regime de tratamento pode ser estendido até que o paciente experiencie melhora de pelo menos um sintoma da doença ou distúrbio metabólicos.

[0096] Em uma forma de realização, a presente invenção fornece um método para melhorar pelo menos um sintoma associado com a progressão de resistência à insulina em um paciente humano sofrendo de, ou em risco para, desenvolver diabetes tipo II. O método de acordo com este aspecto da invenção compreende administrar ao paciente humano em necessidade deste de cerca de 25 mg/kg/dia a cerca de 1000 mg/kg/dia (por exemplo, de 100 mg/kg/dia a 500 mg/kg/dia, ou de cerca de 333 mg/kg/dia a cerca de 583 mg/kg/dia, ou de 350 mg/kg/dia a cerca de 450 mg/kg/dia) de uma composição de fibra dietética de polissacarídeo altamente viscosa compreendendo uma combinação de fibra ou complexo desta (VFB/C), compreendendo de cerca de 48 % a cerca de 90 % (p/p) de glucomanano, de cerca de 5 % a cerca de 20 % (p/p) de goma xantana, e de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) de alginato por um período de tempo eficaz para melhorar pelo menos um sintoma da progressão de resistência à insulina, tal como uma redução em níveis de glicose no sangue. Em algumas formas de realização, o método compreende

administrar a composição de fibra dietética por um período de tempo de pelo menos duas semanas até 16 semanas ou mais.

[0097] De acordo com a American Heart Association e o National Heart, Lung, and Blood Institute, a síndrome metabólica é diagnosticada como estando presente se um paciente tem três ou mais do seguinte: pressão sanguínea igual a ou mais alta do que 130/85 mmHg; açúcar no sangue (glicose) igual a ou mais alto do que 100 mg/dL; circunferência da cintura grande (homens: 40 polegadas (101,6 cm) ou mais; mulheres: 35 polegadas (88,9 cm) ou mais); colesterol HDL baixo (homens: abaixo de 40 mg/dL; mulheres: abaixo de 50 mg/dL); ou triglicerídeos igual a ou mais alto do que 150 mg/dL. Portanto, em algumas formas de realização, o método para melhorar pelo menos um sintoma associado com a progressão de resistência à insulina em um paciente humano sofrendo de, ou em risco para, desenvolver diabetes tipo II compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de VFB/C por um período de tempo eficaz para (1) reduzir o açúcar no sangue (glicose) no paciente a um nível abaixo de 100 mg/dL; (2) reduzir a circunferência da cintura até abaixo de 40 polegadas (101,6 cm) para um paciente masculino, ou abaixo de 35 polegadas (88,9 cm) para um paciente feminino; e/ou (3) reduzir o nível de triglicerídeos a um nível igual a ou menor do que 150 mg/dL.

[0098] Como descrito nos Exemplos 1 a 4, a eficácia de VFC (por exemplo VFB granulada) é demonstrada para melhorar o desenvolvimento e progressão da fase inicial de síndrome metabólica em pacientes mamíferos, incluindo a capacidade para reduzir a progressão de dano do órgão induzido por glicose, reduzir o acúmulo de lipídeo no fígado, preservação de células beta pancreáticas, e sensibilidade à insulina melhorada, quando comparado ao grupo de controle.

Métodos para Analisar uma Amostra Compreendendo pelo menos Um Polissacarídeo

[0099] Ainda em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para determinar os açúcares constituintes em uma amostra compreendendo pelo menos um polissacarídeo, tal como uma composição de fibra dietética compreendendo uma combinação de fibra, ou complexo desta. Os métodos de acordo com este aspecto da invenção compreendem: (a) hidrolisar uma amostra compreendendo pelo menos um

polissacarídeo com um ácido para produzir um hidrolisado; (b) separar os produtos da hidrólise no hidrolisado com um método cromatográfico; (c) detectar os produtos da hidrólise separados na etapa (b); e (d) comparar os produtos da hidrólise detectados na etapa (c) a um ou mais padrões de referência para determinar os açúcares constituintes na amostra.

[0100] Em algumas formas de realização, a amostra compreende pelo menos uma fibra dietética. Em algumas formas de realização, a amostra compreende alginato de sódio. Em algumas formas de realização, a amostra compreende uma combinação de fibra ou complexo desta, compreendendo alginato, glucomanano e goma xantana.

Hidrólise

[0101] De acordo com os métodos deste aspecto da invenção, a amostra compreendendo pelo menos um polissacarídeo é hidrolisada com um ácido para produzir um hidrolisado. Em algumas formas de realização, o ácido usado para hidrolisar a amostra é ácido trifluoroacético (TFA).

[0102] Em algumas formas de realização, a amostra compreende alginato, um polímero misto de ácido manurônico e ácido gulurônico. Em tais formas de realização, a etapa de hidrólise da amostra compreendendo alginato é realizada sob condições adequadas para levar em consideração a liberação e preservação de ácido L-glicurônico assim como o ácido D-manurônico. Por exemplo, em uma forma de realização, a hidrólise inicial de ácido algínico pode ser efetuada com 95 % de ácido sulfúrico a 3 °C por 14 horas, ou com 80 % de ácido sulfúrico na temperatura ambiente por 14 horas, como descrito por Fischer e Dorfel. De acordo com tais formas de realização, antes da agitação no ácido algínico, o ácido mineral é resfriado até entre -10 e -5 °C. A massa viscosa é agitada completamente para evitar a formação de massas informes. A mistura é depois diluída com gelo triturado e água até que a solução de ácido sulfúrico seja cerca de 0,5 N. A solução é depois aquecida por seis horas em um banho de água fervendo, depois neutralizada com carbonato de cálcio. Depois da filtração e lavagem do precipitado de sulfato de cálcio, o filtrado amarelo claro e água de lavagem são concentrados, depois passados através de uma coluna de troca de cátion e concentrados sob pressão reduzida a um xarope fino. Depois de

reduzir ainda mais a concentração em um dessecador e inoculação com D-manofuranurono-lactona de ponto de fusão de 191 °C, um pouco da lactona cristaliza a partir do xarope, mas apenas se o ácido algínico hidrolisado continha mais ácido D-manurônico do que ácido L-glicurônico. Depois da remoção da D-manuronolactona cristalina, a D-manuronolactona e ácido L-glicurônico remanescentes são separados por métodos cromatográficos como descrito aqui.

[0103] Em uma outra forma de realização, a etapa de hidrólise da amostra compreendendo alginato compreende o uso de ácido trifluoroacético (TFA). TFA tem a vantagem sobre ácidos minerais de ser suficientemente volátil para levar em consideração sua remoção simplesmente secando-se por congelamento o hidrolisado. Por exemplo, a hidrólise em TFA 2 M a 100 °C sob nitrogênio por um período de tempo de cerca de oito horas a cerca de 18 horas mostrou ser uma alternativa adequada para hidrólise em H₂SO₄ 1 M sob as mesmas condições. (Hough et al.). É observado que um tempo de hidrólise de 6 a 8 horas tipicamente é suficiente para a degradação de polissacarídeos compostos de açúcares neutros, entretanto, a presença de resíduos de ácido urônico em proporção apreciável introduz a dificuldade adicional de que ligações de ácido glicosidurônico são, em geral, muito mais resistentes à hidrólise ácida do que outras ligações glicosídicas. Para polissacarídeos tais como os polissacarídeos capsulares de bactérias, contendo ácido urônico ao grau de aproximadamente 16 a 30 % molar, a hidrólise em TFA 2 M a 100 °C sob nitrogênio por 18 horas mostrou ser satisfatória em alguns casos (Hough et al.). Entretanto, onde resíduos de açúcar particularmente suscetíveis à degradação por ácido (tal como D-ribose, D-xilose, ou L-ramnose) estão presentes, o tempo de hidrólise é preferivelmente limitado a oito horas e subsequentemente corrigindo os resultados analíticos para o açúcar remanescente ligado ao ácido urônico, a proporção de ácido aldobiurônico no hidrolisado sendo encontrada por cromatografia em gel em um gel firmemente reticulado.

[0104] Em algumas formas de realização, a etapa de hidrólise de uma amostra compreendendo alginato é realizada incubando-se a amostra com TFA por um período de tempo de cerca de 48 a 72 horas em uma temperatura variando de cerca

de 95 °C a cerca de 110 °C. Como descrito no Exemplo 6, foi determinado pelos presentes inventores que a hidrólise com TFA por 72 horas foi eficaz para a liberação hidrolítica dos açúcares de uma amostra compreendendo alginato, tal como uma amostra contendo VFB/C.

Separação cromatográfica do hidrolisado

[0105] De acordo com os métodos deste aspecto da invenção, os produtos da hidrólise no hidrolisado são depois separados com um método cromatográfico, tal como, por exemplo, cromatografia de camada fina, cromatografia gasosa (GLC), ou cromatografia líquida (LC), incluindo o uso de materiais de fase reversa C18. Em algumas formas de realização, o método cromatográfico é capaz de separar açúcares neutros de ácidos urônicos, tal como cromatografia Dionex.

[0106] Os produtos da hidrólise separados pelo método cromatográfico são detectados e comparados a um ou mais padrões de referência para determinar os açúcares constituintes na amostra. Detectores representativos adequados para detectar açúcares incluem o Detector Amperométrico Pulsado da Dionex, ou um Detector de Dispersão de Luz Evaporativo (ELSD) ou espectrômetro de massa ligado a um sistema de HPLC. Os padrões de referência, tais como amostras com componentes conhecidos, podem ser conduzidos como amostras de controle em paralelo com a amostra de teste. Alternativamente, o padrão de referência pode ser as características conhecidas de um ou mais açúcares constituintes particulares (por exemplo, tempo de retenção/altura/área relativa) na amostra de referência analisada por um método cromatográfico particular, como descrito no Exemplo 5.

[0107] Em algumas formas de realização, o método de acordo com este aspecto da invenção compreende hidrolisar uma amostra compreendendo pelo menos um polissacarídeo, tal como alginato, com TFA; separar os produtos da hidrólise no hidrolisado com um método cromatográfico, tal como um sistema de HPLC com uma coluna C18; detectar os produtos da hidrólise com um detector, tal como um ELSD ou espectrômetro de massa; e comparar os produtos detectados a um ou mais padrões de referência para determinar os açúcares constituintes na amostra.

[0108] Os seguintes exemplos meramente ilustram o melhor modo agora

considerado para praticar a invenção, mas não devem ser interpretados para limitar a invenção.

EXEMPLO 1

[0109] Este exemplo descreve os efeitos da composição de fibra dietética compreendendo uma combinação de fibra viscosa granulada, (também referida como o complexo de fibra viscosa (VFC) comercialmente conhecido como PolyGlycopleX (PGX[®])) sobre Resistência à Insulina, Peso Corporal, Viabilidade de célula Pancreática, e Perfil de Lipídeo em ratos diabéticos Zucker.

[0110] Análise racional: O Rato Diabético Zucker Macho (ZDF) (ZDF/Cr1-Leprfa/fa) foi escolhido como o modelo de animal para uso neste estudo porque este modelo de animal é considerado ser um modelo excelente de obesidade de início em adulto com diabetes tipo II comórbida e/ou sensibilidade à insulina reduzida em idades mais precoces (C. Daubioul et al., J. Nutr. 132:967-973 (2002); J.M. Lenhard et al., Biochem. & Biophys. Res. Comm. 324:92-97 (2004); J.N. Wilson, Atherosclerosis 4:147-153 (1984)). ZDFs são mutantes que foram descobertos carecer de receptores de leptina cerebrais. Leptina é uma proteína secretada por tecido adiposo que sinaliza a supressão do apetite. Portanto, nestes ratos mutantes, não existe nenhuma sinalização de retroalimentação para reduzir o apetite ou para induzir saciedade. Ratos ZDF consomem alimento em taxas muito altas e tornam-se obesos muito rapidamente. Este modelo portanto imita pessoas que são obesas através da ingestão em excesso de alimentos. Conforme os ratos ZDF tornam-se obesos, eles rapidamente tornam-se insensíveis à insulina, exatamente como observado em homens (também referida como síndrome metabólica). Os ratos ZDF também são hiperlipidêmicos, mostrando este modelo de rato a ser um bom modelo para síndrome metabólica em seres humanos. Com o passar do tempo, a diabetes progride no modelo de ZDF, similar à progressão em seres humanos, tornando-se corada com a perda da população de célula β pancreática (células de secreção de insulina). Proteínas tornam-se glicadas pela glicose em excesso, causando problemas tanto em ZDFs quanto em seres humanos com a função do órgão, particularmente nos rins. Níveis de glicose altos causam a glicação de proteínas, causando nefropatia diabética e dano

vascular. As idades precoces de ZDFs (cinco semanas de idade) foram usadas neste estudo sem alimentação com alto teor de gordura de modo a determinar se a administração de grânulos de complexo de fibra viscosa (VFC) pode retardar o início e/ou reduzir a severidade da diabetes.

[0111] O marcador padrão do grau de dano de glicose a proteínas é hemoglobina glicada (HbA1c), que é elevada em ZDFs, é agora um dos marcadores mais importantes para aprovação do medicamento em seres humanos. A medição da albumina na urina também é um marcador padrão de dano diabético ao rim. As diretrizes do FDA para o tratamento de diabetes requerem controle glicêmico e redução do dano tecidual causado pela glicose alta.

Métodos

Ração para rato realçada com fibra

[0112] O complexo de fibra viscosa (VFC) (grânulos de konjac/xantana/alginato (70:13:17) (isto é, a combinação de fibra foi processada por granulação para formar um complexo, comercialmente conhecido como PGX[®]) foi incorporado em ração para rato básica (D11725: Research Diets, New Brunswick, Nova Jersey). Dietas alternadas usadas neste estudo incorporaram outras formas de fibra, como mostrado abaixo na TABELA 1. Todas as dietas foram formuladas para ser tão isoenergéticas quanto possível dada a diferente contribuição de energia de cada fonte de fibra (dietas com VFC e inulina forneceram 3,98 kcal/g e celulose forneceu 3,90 kcal/g).

[0113] A celulose foi selecionada como a fibra de referência básica que é insolúvel e é não fermentável e é considerada ser um composto de referência inerte (J.W. Anderson et al., J. Nutr. 124:78-83 (1994). A inulina é polímero de frutose derivado de planta que é solúvel em água e não digerível e tem mostrado eficácia em alguns estudos com respeito à redução de lipídeo e controle glicêmico em alguns estudos; mas os resultados são variáveis (ver P. Rozan et al., Br. J. Nutr. 99:1-8 (2008). O número de unidades de frutose ou glicose (grau de polimerização "DP") da inulina foi 99,9 % \geq 5, com o DP médio sendo \geq 23.

[0114] TABELA 1: Composição das Três Dietas Contendo VFB, Celulose, ou Inulina (Porcentagem de contribuição dos Ingredientes em Peso)

	Complexo de fibra viscosa (VFC) (Konjac/Xantana/Alginato (70:13:17)) Grânulos de PGX®	Fibra insolúvel (Celulose)	Fibra solúvel, não viscosa (Inulina)
Research Diets Fórmula #	D08012504	D08012507	D08012503
Caseína	20 %	20 %	20 %
Metionina	0,3 %	0,3 %	0,3 %
Amido de milho	50 %	50 %	50 %
Maltodextrina	15 %	15 %	15 %
Fibra*	5 % de VFC (PGX®)	5 % de celulose	5 % de inulina
Óleo de milho	5 %	5 %	5 %
Mistura de sal/mineral	3,5 %	3,5 %	3,5 %
Mistura de vitamina	1 %	1 %	1 %
Bitartarato de colina	0,2 %	0,2 %	0,2 %
Corante	0,1 %	0,1 %	0,1 %

[0115] *Grânulos de fibra do VFC comercialmente conhecidos como PolyGlycopleX® (PGX®) (Innovobiologic Inc., Calgary, Alberta, Canadá), Celulose (Research Diets, New Brunswick, Nova Jersey), e Inulina (Raftiline® HP, Orafiti, Tienen, Bélgica), respectivamente.

Projeto de estudo

[0116] Trinta (30) ratos ZDF/Crl-Leprfa/fa machos foram obtidos da Charles River

(Kingston, New York) em cinco semanas de idade. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de malha de arame suspensas que corresponderam ao tamanho recomendado no Guide for the Care and Use of Laboratory Animals mais recente, DHEW (NIH). Todos os estudos foram aprovados pelo Eurofins Institutional Animal Use and Care Committee. O ambiente do animal foi controlado em temperatura e umidade, teve um ciclo de luz/escuridão de 12 horas, e foi mantido limpo e livre de parasitas. Os animais foram condicionados por uma semana depois da chegada, e os animais tiveram acesso a alimento e água à vontade.

[0117] Depois da habituação, os ratos foram aleatoriamente designados a um dos três grupos na base de glicose no sangue e peso corporal iniciais. Cada grupo de ratos foi fornecido com um tipo de ração contendo VFC (comercialmente conhecido como PGX[®]), celulose, ou inulina (Raftiline[®] HP, uma inulina derivada de chicória), todos em 5 % (peso/peso), como mostrado acima na TABELA 1, por um período de tempo de 8 semanas. Procedimentos de monitoramento básicos foram conduzidos por todo o estudo de 8 semanas, incluindo medição de três vezes por semana do peso do alimento, medição semanal do peso corporal, e coleta de amostras de sangue para glicose e insulina. É observado que a análise que não de jejum de glicose foi iniciada na semana 3, enquanto a análise de jejum foi iniciada na semana 1. Nos animais que não de jejum, insulina foi apenas medida no último ponto no tempo. A análise do estado que não de jejum foi adicionada ao estudo devido à observação de que efeitos maiores de VFC sobre níveis de glicose em estabilização foram observados enquanto a fibra estava fisicamente presente no trato gastrointestinal, provavelmente devido ao fato de que os ratos Zucker comem continuamente igualmente dia e noite. Em animais de jejum, os triglicérides séricos foram medidos por todo o estudo, enquanto em animais que não de jejum, apenas uma medição terminal foi tomada (IDEXX, North Grafton, Massachusetts).

[0118] Para todos os estudos, as amostras de sangue usadas para glicose e insulina foram tomadas aproximadamente ao mesmo tempo do dia (meio da manhã). O estudo foi concluído com dois testes de tolerância à glicose oral, separados por um semana, e uma necropsia.

Medições

[0119] As seguintes medições foram tomadas por todo o estudo de 8 semanas:

[0120] Consumo de alimento: Antes e depois da introdução de ração experimental, o peso do alimento foi medido 3 vezes por semana.

Peso corporal foi medido uma vez por semana.

[0121] Glicose no sangue e Insulina: Antes e em intervalos semanais depois da introdução da ração experimental, o sangue foi coletado por intermédio de sangria retroorbital depois de um jejum noturno. Amostras de sangue foram tomadas uma vez por semana para glicose e insulina aproximadamente ao mesmo tempo do dia (meio da manhã). Uma quantidade pequena foi analisada com um glicosímetro portátil. Depois de remover uma amostra para análise da insulina, 1 mL foi deixado coagular; 0,5 mL de soro foi removido e analisado quanto ao teor de triglicerídeo. Amostras adicionais foram coletadas por intermédio de uma incisão na cauda quando os animais tiveram acesso ao alimento. A glicose no sangue foi medida usando um Glicosímetro Bayer Ascensia Elite (Bayer Health Care, Tarrytown, Nova Iorque). A insulina foi medida usando um ELISA (Ani Lytics, Gaithersburg, Mariland).

Testes de tolerância à glicose oral (OGTTs)

[0122] Na semana 9 e na semana 10, o estudo foi concluído com dois testes de tolerância à glicose oral (OGTTs) em ratos de jejum e que não de jejum, com o OGTT que não de jejum feito por último. Tanto para OGTTs de jejum quanto que não de jejum, uma amostra de sangue de valor de referência para análise da insulina e medição de glicose foi tomada. A amostra de sangue inicial para o OGTT que não de jejum final também foi usada para um painel da química clínica como descrito abaixo.

[0123] O OGTT tanto para animais de jejum quanto que não de jejum foi induzido por tratamento com glicose oral (2 g/kg de glicose, por gavagem). Amostras de sangue foram tomadas em 30, 60, 90, e 120 minutos depois da carga de glicose e foram analisadas quanto ao teor de glicose e insulina. Na conclusão do segundo teste de tolerância à glicose, os ratos foram sacrificados por overdose de isoflurano, e os órgãos relevantes foram colhidos para análise histopatológica.

[0124] Contagens da Modelo de avaliação da homeostase (HOMA) foram

calculadas por todo o estudo como mg de glicose x insulina (U/mL²). Isto é geralmente aceito como um método seguro de mostrar mudanças na resistência à insulina, com contagens de HOMA mais baixas representando reduções maiores na resistência à insulina periférica. Contagens do índice de sensibilidade à insulina compósito (CISI) para os estudos de teste de tolerância à glicose oral (OGTT) também foram calculada usando a seguinte fórmula:

$$CISI = \frac{1000}{\sqrt{(Gluc_{base} \times Ins_{base}) \times (Gluc_{média} \times Ins_{mean})}}$$

[0125] Esta contagem de CISI leva em conta o desvio da glicose e área sob a curva com uma contagem mais alta mostrando sensibilidade à insulina melhorada.

[0126] Tanto para OGTTs de jejum quanto que não de jejum, uma amostra de sangue de valor de referência para análise da insulina e medição de glicose foi tomada. A amostra de sangue inicial para o OGTT final (que não de jejum) também foi usada para um painel da química clínica incluindo: eletrólitos, nitrogênio ureico no sangue (BUN), creatinina, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase (ALT), alanina aminotransferase (AST), e bilirrubina (direta + indireta) e colesterol plasmático total (Análise feita por IDEXX, North Grafton, Massachusetts).

[0127] Triglicerídeos séricos: Em animais de jejum, os triglicerídeos séricos foram medidos por todo o estudo, enquanto em animais que não de jejum, apenas uma medição terminal foi tomada (Análise feita por IDEXX, North Grafton, Massachusetts).

[0128] Painel da química clínica: A amostra de sangue inicial para o OGTT que não de jejum final foi usada para um painel da química clínica incluindo eletrólitos, nitrogênio ureico no sangue (BUN), creatinina, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase (ALT), alanina aminotransferase (AST), e bilirrubina (direta + indireta) e colesterol plasmático total (Análise feita por IDEXX, North Grafton, Massachusetts).

[0129] Análise tecidual: Um lóbulo do fígado, um rim, e o pâncreas foram fixados em formalina tamponada neutra a 10 % (NBF). O pâncreas foi transferido para etanol a 70 % depois de 24 horas. Os tecidos foram processados e embutidos em parafina. O fígado e rim foram seccionados em aproximadamente 5 microns e tingidos com

hematoxilina e eosina (H&E). O pâncreas foi serialmente seccionado duas vezes em aproximadamente 5 microns, e as seções foram tingidas com H&E ou imunoistoquimicamente tingidas com um anticorpo de camundongo contra insulina de rato (anti-insulina de rato de coelho a 1:300, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts).

Imuno-histoquímica:

[0130] A imuno-histoquímica foi realizada como segue. Um anticorpo de controle de isótipo (IgG de coelho normal, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) foi usado para avaliar o nível global de coloração não específica e de base. A seguir da desparafinização, recuperação do antígeno foi realizada usando solução Declere® (Cell Marque™ Corporation, Rocklin, Califórnia) por 15 minutos a 120 °C, seguido por 5 minutos em temperatura ambiente em solução Declere® quente. A atividade de peroxidase endógena foi extinta por incubação em peróxido de hidrogênio a 3 % em água desionizada por 10 minutos. As lâminas foram incubadas por 20 minutos em soro de cabra normal a 5 %. As lâminas depois foram incubadas com o anticorpo primário por 60 minutos, seguido por incubação por 30 minutos em anticorpo anti-coelho de cabra biotilado. As lâminas depois foram incubadas em ABC Elite Reagent® (Vector, Burlingame, Califórnia) por 30 minutos. Finalmente, os espécimes foram incubados em diaminobenzidina por 5 minutos, seguido por contra-coloração com hematoxilina.

[0131] A seguir da necropsia, um lóbulo do fígado adicional foi congelado repentinamente, embutido em OCT e seccionado em 5 µM e tingido com negro de Sudão para análise do teor de lipídeo (ácidos graxos livres e triglicerídeos).

[0132] Todas as lâminas tingidas com H&E foram avaliadas quanto a mudanças morfológicas relacionadas à aquelas comumente observadas em ZDFs, tal como um aumento na dilatação tubular e um aumento na degeneração tubular no rim, degeneração de célula das ilhotas pancreáticas, e esteatose hepática. Estas mudanças foram classificadas semi-quantitativamente em uma escala de 0 a 5 com base na severidade desta descoberta, com 5 sendo a mais severa.

[0133] As lâminas de fígado tingidas com negro de Sudão foram avaliadas e

classificadas semi-quantitativamente quanto à presença de vacúolos positivos com negro de Sudão em uma escala de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa.

[0134] A porcentagem da área da ilhota com células positivas de insulina foi medida nas lâminas de pâncreas imunoistoquimicamente tingidas com anticorpo anti-insulina. Esta medição foi realizada morfometricamente. Dez ilhotas por pâncreas foram manualmente delineadas por um patologias veterinário. Áreas positivas para coloração de insulina dentro destas ilhotas foram similarmente delineadas, e a porcentagem de áreas da ilhota positivas para insulina foi calculada usando o software de imageamento ImagePro®Plus. Métodos estatísticos:

[0135] Dados de intervalo coletados em tempos múltiplos foram analisados por análise de medições repetidas de duas vias de variância (ANOVA). Efeitos significantes foram seguidos por comparação post hoc usando teste de comparações múltiplas de Bonferroni, como descrito em Motulsky H., Intuitive Biostatistics, NY, University Press (1995).

[0136] Químicas de insulina, colesterol, e sangue medidas apenas no final do estudo em ratos que não de jejum foram analisados por ANOVA de uma via. Efeitos significantes foram seguidos por comparações post hoc usando teste de comparações múltiplas de Dunnett (MCT), como descrito em Motulsky H., Intuitive Biostatistics, NY, University Press (1995). Dados sem intervalo ou separados (por exemplo, contagens histológicas) foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis como descrito em Motulsky H., Intuitive Biostatistics, NY, University Press (1995). Efeitos significantes foram seguidos por comparações post hoc usando MCT de Dunnett.

Resultados

Peso corporal e Consumo de alimentos

[0137] A FIGURA 1A ilustra graficamente o efeito de dietas de VFC, celulose, ou inulina sobre o peso corporal (g) com o passar do tempo durante o estudo de 8 semanas em ratos diabéticos Zucker. Como mostrado na FIGURA 1A, o aumento no peso corporal com respeito ao tempo foi significativamente obtundido nos ratos tratados com VFC versus animais alimentados com celulose ou animais alimentados com inulina da semana 1 em diante. No início do estudo, todos os ratos diabéticos

Zucker tiveram pesos corporais similares (aproximadamente 160 g). Durante as três semanas seguintes, ratos alimentados com ração contendo celulose ou inulina ganharam aproximadamente 40 g mais em média do que ratos alimentados com ração contendo VFC. Diferenças significantes entre ratos alimentados com VFC versus dietas contendo celulose ou inulina foram observadas da semana 1 à semana 8 (O símbolo "****" indica $p < 0,001$, MCT de Bonferroni). Nenhuma diferença significativa foi observada entre ratos alimentados com dietas contendo inulina e celulose.

[0138] A FIGURA 1B ilustra graficamente o efeito de dietas de VFC, celulose, ou inulina sobre o consumo de alimentos (g/dia) com o passar do tempo durante o estudo de 8 semanas em ratos diabéticos Zucker. Como mostrado na FIGURA 1B, o consumo de alimentos foi significativamente reduzido em ratos tratados com VFC para as primeiras três semanas (o símbolo "*" indica $p < 0,05$ na semana 1; o símbolo "****" indica $p < 0,001$ na semana 2; e o símbolo "***" indica $p < 0,01$ na semana 3). O consumo de alimento no grupo de VFC permaneceu mais baixo por todo o restante do protocolo, embora depois de 4 semanas no estudo, os níveis não foram mais estatisticamente diferentes dos outros dois grupos. Nenhuma diferença significativa foi observada entre ratos alimentados com dietas contendo inulina e celulose.

[0139] Ratos alimentados com ração contendo VFC tipicamente até 20 a 23 g/dia (corrigidos quanto ao derramamento; equivalente a aproximadamente 70 a 85 kcal/dia). Ratos alimentados com ração contendo celulose ou inulina tipicamente até 21 a 27 g/dia (corrigidos quanto ao derramamento; equivalente a aproximadamente 75 a 100 kcal/dia).

[0140] Em resumo, estes resultados demonstram que o aumento no peso corporal com respeito ao tempo tipicamente observado no modelo de rato ZDF foi significativamente obtundido nos animais tratados com VFC.

Controle glicêmico: Açúcar no sangue e Metabolismo

[0141] As FIGURAS 2A a D ilustram graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre glicose no sangue de jejum (FIGURA 2A), insulina sérica de jejum (FIGURA 2B), glicose no sangue que não de jejum (FIGURA 2C), e contagens da Modelo de avaliação da homeostase (HOMA) de jejum (FIGURA 2D)

em ratos ZDF com o passar do tempo durante o estudo de 8 semanas. Como mostrado na FIGURA 2A, os valores de glicose no sangue nos ratos de jejum não foram muito elevados em qualquer um dos ratos, com aumentos leves observados em valores de glicose para os ratos tratados com VFC (o símbolo "*" indica $p < 0,05$ nas semanas 3 e 6).

[0142] Como mostrado na FIGURA 2B, os níveis de insulina séricos em ratos de jejum foram reduzidos nos ratos tratados com VFC por todo o período de estudo, e os níveis de insulina séricos foram reduzidos em níveis estatisticamente significantes começando em cinco semanas (o símbolo "****" indica $p < 0,001$ depois da semana 4).

[0143] Como mostrado na FIGURA 2C, os valores de glicose no sangue nos ratos que não de jejum foram significativamente reduzidos em ratos tratados com VFC começando em aproximadamente cinco semanas (o símbolo "****" indica $p < 0,0001$ depois da semana 5) quando comparado aos ratos alimentados com celulose e inulina.

[0144] Como mostrado na FIGURA 2D, ratos tratados com VFC tiveram contagens de HOMA significativamente reduzidas começando em cinco semanas no estudo (o símbolo "*" indica $p < 0,05$), com as semanas 5 a 7 ($p < 0,05$), e semana 8 (o símbolo "***" indica $p < 0,01$).

[0145] Geralmente, sob condições de jejum (isto é, animais testados na manhã depois de aproximadamente 16 horas sem acesso ao alimento), os ratos ZDF mantiveram concentrações de glicose no sangue muito mais baixas do que aqueles observados sob condições repletas de alimento (que não de jejum) (comparar a FIGURA 2A à FIGURA 2C). Como mostrado na FIGURA 1A, para todos os grupos de jejum, valores de glicose no sangue foram tipicamente observados na faixa entre 95 mg/dL e 145 mg/dL, que é considerada marginalmente diabética, com poucas diferenças observadas entre os grupos alimentados com VFC, celulose, ou inulina.

[0146] Como mostrado na FIGURA 2B, sob condições de jejum, ratos alimentados com uma dieta contendo VFC mantiveram concentrações de insulina sérica muito mais estáveis do que ratos alimentados com ração contendo celulose ou inulina. Como mostrado na FIGURA 2B, níveis de insulina sérica de jejum foram reduzidos

em ratos ZDF tratados com VFC por todo o curso de tempo do estudo, com reduções significativas observadas começando em cinco semanas e permaneceram significativas através da semana 8 ($p < 0,001$ depois da semana 4, como indicado pelo símbolo "****"). Nenhuma diferença significativa foi observada entre ratos alimentados com dietas contendo inulina e celulose.

[0147] A resistência à insulina durante o curso deste estudo em ratos de jejum foi avaliada calculando-se o modelo de avaliação da homeostase (HOMA). Como mostrado na FIGURA 2D, contagens de HOMA elevaram durante o curso do estudo para todos os grupos, mas significativamente menos ainda para ratos alimentados com uma dieta contendo VFC do que para ratos alimentados com celulose ou inulina. Diferenças significativas entre VFC versus celulose ou inulina foram observadas em 5, 6, e 7 semanas ($p < 0,05$, como indicado pelo símbolo "**") e em 8 semanas ($p < 0,01$, como indicado pelo símbolo "****"). Nenhuma diferença significativa foi observada entre ratos alimentados com dietas contendo celulose ou inulina.

[0148] A FIGURA 3A ilustra graficamente as contagens do índice de sensibilidade à insulina compósito (CISI) para ratos diabéticos Zucker de jejum alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina durante o estudo de 8 semanas. Como mostrado na FIGURA 3A, contagens de CISI calculadas para o teste de OGTT em animais de jejum foram significativamente mais altas ($p < 0,01$, indicado pelo símbolo "****") para animais tratados com VFC, demonstrando ainda sensibilidade à insulina melhorada para este grupo de VFC quando comparado aos grupos alimentados com celulose e inulina.

[0149] A FIGURA 3B ilustra graficamente as contagens do índice de sensibilidade à insulina compósito (CISI) para ratos diabéticos Zucker que não de jejum alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina durante o estudo de 8 semanas. Como mostrado na FIGURA 3B, os animais que não de jejum, tratados com VFC mostraram uma contagem de CISI significativamente mais alta ($p < 0,001$, indicado pelo símbolo "****"), portanto sensibilidade à insulina mais alta, quando comparado aos grupos tratados com celulose e inulina. Níveis de glicose de pico foram observados em inoculação pós-glicose de 30 minutos, e o grupo de VFC teve um valor de pico

significativamente mais baixo comparado aos outros dois grupos.

[0150] Como mostrado na FIGURA 2C, sob condições que não de jejum (alimentadas) (isto é, animais testados na manhã com acesso ao alimento contínuo durante as 24 horas anteriores), ratos alimentados com uma dieta contendo VFC mantiveram níveis de glicose no sangue mais baixos do que ratos alimentados com dietas contendo celulose ou inulina durante todas as semanas testadas. O Teste de glicose no sangue começou durante a terceira semana do estudo e continuou até a oitava semana. O teste de glicose dos animais no estado alimentado foi adicionado ao protocolo de estudo dada a observação de que valores de glicose de jejum foram muito próximos à faixa normal e, embora não desejando estar ligado por qualquer teoria particular, acredita-se que muitas das ações mecanicistas de VFC envolvem seu contato direto com o alimento.

[0151] Embora sob as condições alimentadas insulina fosse apenas medida no último ponto no tempo, uma sensibilidade à insulina melhorada foi observada similar àquela observada nos animais de jejum quando medida no ponto no tempo final. Como mostrado na FIGURA 2C, a resposta de glicose no sangue no estado alimentado foi significativamente reduzida em animais tratados com VFC ($p < 0,001$, como indicado pelo símbolo "****"), quando comparado a animais tratados com inulina ou celulose. Nenhuma diferença significativa foi observada entre ratos alimentados com dietas contendo inulina ou celulose.

[0152] A FIGURA 3C ilustra graficamente as contagens de HOMA calculadas para ratos diabéticos Zucker que não de jejum alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina para a retirada de sangue final do estudo de 8 semanas. Como mostrado na FIGURA 3C, a contagem de HOMA foi descoberta ser significativamente mais baixa no grupo tratado com VFC ($p < 0,001$) quando comparado aos grupos de celulose e inulina. Como observado acima, contagens de HOMA mais baixas representam maiores reduções na resistência à insulina periférica.

Perfil lipídico

[0153] Triglicerídeos séricos foram medidos nos animais de jejum (medidos por todo o estudo) e que não de jejum (medidos apenas no final do estudo de 8 semanas).

A FIGURA 4 ilustra graficamente o nível de triglicerídeos séricos medido em ratos diabéticos Zucker de jejum alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina com o passar do tempo durante o estudo de 8 semanas. Como mostrado na FIGURA 4, para os animais de jejum, animais tratados com VFC mostraram um efeito de redução inicial e significativa sobre triglicerídeos quando comparado aos grupos tratados com inulina e celulose. Depois de 2 a 3 semanas, triglicerídeos séricos foram reduzidos em todos os grupos, com uma tendência para animais tratados com celulose tendo teor de triglicerídeos um pouco mais baixo quando comparado a animais tratados com inulina e VFC. Como mostrado abaixo na TABELA 2, em animais que não de jejum, como medido no final do estudo, triglicerídeos séricos foram similares para Animais tratados com VFC e tratados com celulose, com animais tratados com inulina descobertos ter níveis de triglicerídeo significativamente mais baixos do que os outros dois grupos.

[0154] No final do estudo de 8 semanas, o colesterol plasmático foi medido na amostra de valor de referência obtida dos animais alimentados antes do último OGTT. Como mostrado abaixo na TABELA 2, os animais foram hipercolesterolêmicos, e VFC significativamente reduziu níveis de colesterol em mais do que a metade quando comparado a grupos alimentados com celulose e inulina.

Efeitos no órgão alvo: Avaliação histológica do Fígado, Pâncreas e Rins

[0155] Embora os dados descritos acima para glicose e insulina mostrem sensibilidade à insulina e controle glicêmico melhorados com tratamento com VFC, a análise tecidual foi realizada para avaliar o efeito de VFC sobre e melhora do grau de dano a órgãos tais como os rins. O rim em particular é conhecido ser sensível à nefropatia diabética, que é provavelmente relacionada à hiperglicemia e glicação excessiva. Para todos os tecidos medidos, o grau de dano foi avaliado como um indicador da capacidade do tratamento com VFC para retardar a progressão de diabete e/ou melhorar os sintomas associados com a diabete.

Rim

[0156] Todas as lâminas de tecido renal diabético tingido com H&E foram avaliadas quanto a mudanças morfológicas relacionadas àquelas comumente

observadas em ZDFs, incluindo um aumento na dilatação tubular e um aumento na degeneração/regeneração tubular. Vários parâmetros patológicos renais mostraram diferenças entre ratos diabéticos Zucker (ZDF), ratos alimentados com uma dieta contendo VFC e ratos ZDF alimentados com ração contendo inulina ou celulose.

[0157] A FIGURA 5A ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre ratos diabéticos Zucker depois de oito semanas em dilatação do túbulo renal, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa. Como mostrado na FIGURA 5A, a dilatação do túbulo foi registrada como sendo ausente em ratos ZDF tratados com VFC. Ao contrário, a dilatação do túbulo foi descoberta estar presente em ratos ZDF alimentados com celulose e inulina. As contagens mostradas na FIGURA 5A mostraram um efeito de tratamento significativo ($p < 0,001$, indicado pelo símbolo "***") entre os grupos alimentados com VFC e celulose ou inulina. Nenhuma diferença significativa foi observada na quantidade de dilatação do túbulo entre os animais alimentados com inulina e celulose.

[0158] A FIGURA 5B ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre ratos diabéticos Zucker depois de oito semanas sobre a degeneração/regeneração do túbulo renal, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa. Como mostrado na FIGURA 5B, ratos alimentados com uma dieta contendo VFC mostraram uma contagem de degeneração/regeneração de túbulo média de 0,1, contagem esta que consiste em uma contagem de 1 (severidade mínima) em um rato, e uma contagem de 0 (dentro de limites normais) para os outros 9 ratos no grupo. Ao contrário, a contagem média para ratos alimentados com dietas contendo celulose ou inulina foi 1,0, como mostrado ainda na FIGURA 5B. O efeito do tratamento de VFC sobre reduzir a severidade da degeneração/regeneração do túbulo foi significativo ($p < 0,01$, indicado pelo símbolo "***"), com uma diferença significativa observada entre grupos alimentados com VFC versus celulose ou inulina. Não houve nenhuma diferença significativa observada entre celulose ou inulina.

[0159] A FIGURA 5C ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC,

celulose, ou inulina sobre ratos diabéticos Zucker depois de 8 semanas em expansão mesangial renal, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa. Como mostrado na FIGURA 5C, a contagem de expansão mesangial glomerular mostrou contagens mais baixas para o grupo que recebe a dieta contendo VFC quando comparado às dietas contendo celulose ou inulina. Embora as contagens para expansão mesangial atingissem significância estatística global ($p < 0,05$), o único par de grupos de tratamento que diferiu significativamente no teste post hoc foram os grupos alimentados com dietas contendo VFC e inulina ($p < 0,05$, indicado pelo símbolo "**"), com uma tendência forte a ser reduzido quando comparado à dieta com celulose.

Pâncreas

[0160] A FIGURA 6 ilustra graficamente a porcentagem de área imunorreativa de insulina nas ilhotas pancreáticas presentes em ratos diabéticos Zucker alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina no final do estudo de 8 semanas, como determinado por coloração com anticorpo anti-insulina de rato. Como mostrado na FIGURA 6, ratos alimentados com uma dieta contendo VFC mantiveram uma área mais alta de imunorreatividade à insulina como uma porcentagem de área da ilhota total (isto é, uma massa de célula beta pancreática maior), como medido por imunohistoquímica da insulina, quando comparado a ratos alimentados com dietas contendo celulose ou inulina. A análise ANOVA mostrou um efeito de tratamento significativo ($p < 0,0001$, indicado pelo símbolo "****"), enquanto o teste post hoc mostrou diferenças entre ratos alimentados com dietas contendo VFC e celulose ($p < 0,001$). Nenhuma diferença foi observada entre os animais alimentados com dietas contendo inulina e celulose. Importaneamente, estes dados combinados com dados que mostram concentrações de insulina sérica de jejum mais baixas (FIGURA 2B) e sensibilidade à insulina maior (FIGURAS 3B), indicam que ratos diabéticos Zucker alimentados com uma dieta contendo VFC mantêm uma capacidade reversa significativamente maior para secreção de insulina em comparação a ratos alimentados com uma dieta contendo celulose ou inulina.

[0161] A FIGURA 7A ilustra graficamente a contagem histológica para infiltrados

de célula inflamatória mononuclear das ilhotas pancreáticas presentes em ratos diabéticos Zucker alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina no final do estudo de 8 semanas, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa. Como mostrado na FIGURA 7A, não houve nenhuma diferença no efeito de tratamento observado nas contagens quanto à presença de infiltrados mononucleares nas ilhotas.

[0162] A FIGURA 7B ilustra graficamente a contagem histológica para degeneração de célula das ilhotas pancreáticas presente em ratos diabéticos Zucker alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina no final do estudo de 8 semanas, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa. Como mostrado na FIGURA 7B, contagens para a degeneração de células das ilhotas foram ausentes em ratos alimentados com uma dieta contendo VFC, e tenderam a ser mais altas em ratos alimentados com dietas contendo celulose ou inulina; entretanto, estas diferenças não atingiram significância estatística.

[0163] A FIGURA 7C ilustra graficamente a contagem histológica para a quantidade de fibrose nas ilhotas pancreáticas presente em ratos diabéticos Zucker alimentados igualmente com dietas de VFC, celulose, ou inulina no final do estudo de 8 semanas, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa. Como mostrado na FIGURA 7C, contagens quanto à quantidade de fibrose nas ilhotas tenderam a ser mais baixas em ratos alimentados com uma dieta contendo VFC comparado a ratos alimentados com dietas contendo celulose ou inulina; entretanto, estas diferenças não atingiram significância estatística. Contagens quanto à presença de hemorragia ou hemossiderina revelaram uma tendência para contagens mais baixas em ratos alimentados com uma dieta contendo VFC, mas os resultados não foram estatisticamente significantes (dados não mostrados).

Fígado

[0164] A FIGURA 8A ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre ratos diabéticos Zucker depois de oito semanas em esteatose hepática, como medido por coloração com negro de Sudão reduzida, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa. Como

mostrado na FIGURA 8A, ratos alimentados com uma dieta contendo VFC mostraram menos esteatose hepática (medida por coloração com negro de Sudão) do que ratos alimentados com dietas contendo celulose ou inulina. Em uma escala de 0 (dentro de limites normais) a 5 (severo), ratos alimentados com uma dieta contendo VFC ponderaram 3,4. Isto compara-se com uma contagem de 4,6 para ratos alimentados com uma dieta contendo celulose e 4,1 para ratos alimentados com uma dieta contendo inulina. Os grupos diferiram significativamente entre ratos alimentados com dietas contendo VFC versus contendo celulose e inulina ($p < 0,01$, como indicado pelo símbolo "***"). Nenhuma diferença significativa foi observada entre ratos alimentados com dietas contendo inulina e celulose.

[0165] Ratos alimentados com uma dieta contendo VFC também mostraram menos vacuolização microvesicular de hepatócito do que ratos alimentados com dietas contendo celulose ou inulina. A FIGURA 8B ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre ratos diabéticos Zucker depois de 8 semanas e, vacuolização microvesicular hepática, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa. Como mostrado na FIGURA 8B, a vacuolização microvesicular foi contada como severa em todos os ratos alimentados com uma dieta contendo celulose ou inulina (contagem média de 4,6, alta). Ao contrário, ratos alimentados com uma dieta contendo VFC ponderaram uma contagem de 3,2 (suave). MCT de Dunnett mostrou uma diferença significativa entre grupos alimentados com dietas contendo VFC e contendo celulose ($p < 0,001$, como indicado pelo símbolo "***"), mas não entre grupos alimentados com dietas contendo inulina e celulose.

[0166] A FIGURA 8C ilustra graficamente o efeito de dietas contendo VFC, celulose, ou inulina sobre ratos diabéticos Zucker depois de oito semanas em vacuolização macrovesicular hepática, com base em uma contagem histológica de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa. Como mostrado na FIGURA 8C, em todos os grupos de tratamento, a vacuolização de hepatócito macrovesicular foi geralmente menos proeminente do que a vacuolização de hepatócito microvesicular, como refletido em contagens de severidade mais baixa (comparar a FIGURA 8B a 8C). Embora ratos

fornecidos com uma dieta contendo inulina mostrassem uma tendência para ter vacuolização reduzida quando comparado a ratos fornecidos com uma dieta contendo celulose, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Houve uma diferença significativa entre grupos alimentados com dietas contendo VFC versus contendo celulose e inulina ($p < 0,001$, como indicado pelo símbolo "****"). Nenhuma diferença significativa foi observada entre grupos alimentados com dietas contendo inulina e celulose. A degeneração de hepatócito cística e fibrose também mostraram uma tendência para contagens menos severas em ratos que recebem dieta contendo VFC, mas isto não atingiu significância estatística (dados não mostrados).

[0167] Como mostrado abaixo na TABELA 2, vários indicadores da química clínica para dano hepático mostraram efeitos de tratamento substanciais com VFC. As enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são liberadas no sangue por lesão hepatocelular, mesmo com membranas celulares intactas. Ratos Sprague-Dawley sem nenhuma faixa de doença hepática evidente têm níveis de ALT de 22 a 48 IU/L (dados de referência de IDEXX). Os dados mostrados na TABELA 2 mostraram efeitos de tratamento globais quanto a níveis de ALT e AST. O teste post hoc mostrou níveis de ALT no sangue mais baixos em ratos que recebem dieta contendo VFC comparado a ratos que recebem dietas contendo celulose ou inulina ($p < 0,05$), e níveis de ALT no sangue significativamente mais altos em ratos que recebem dietas contendo inulina quando comparado a ratos que recebem uma dieta contendo celulose ($p < 0,05$).

[0168] AST no sangue mostrou um padrão similar de resultados como mostrado ainda na TABELA 2. Ratos Sprague-Dawley sem nenhuma faixa de doença hepática evidente têm níveis de AST de 33 a 53 IU/L (dados de referência de IDEXX). Ratos que recebem dieta contendo VFC ponderaram aproximadamente 170 IU/L, ratos que recebem dieta contendo celulose ponderaram 870 IU/L, enquanto ratos que recebem dietas contendo inulina ponderaram 1010 IU/L. O efeito de tratamento global foi estatisticamente significativo ($p < 0,0001$), embora a diferença entre os grupos alimentados com dietas contendo inulina e celulose não foi significativa, a diferença entre grupos alimentado dietas contendo VFC e celulose foi significativa ($p < 0,001$,

MCT de Dunnett).

[0169] Ratos alimentados com uma dieta contendo VFC tiveram níveis de fosfatase alcalina sérica mais baixos do que ratos alimentados com dietas contendo celulose ou inulina, como mostrado na TABELA 2. A faixa normal para este parâmetro em Ratos Sprague-Dawley sem nenhuma doença hepática ou doença óssea conhecida é 0 a 267 IU/L (dados de referência de IDEXX). Como mostrado na TABELA 2, os níveis de fosfatase alcalina sérica médios para ratos alimentados com uma dieta contendo VFC estavam dentro desta faixa normal, ao passo que as médias para ratos alimentados com dietas contendo celulose ou inulina foram ambas fora da faixa normal. A redução da fosfatase alcalina entre grupos alimentados com dietas contendo VFC versus contendo celulose ou inulina foi significativa ($p < 0,001$). Níveis de fosfatase alcalina sérica mais baixos com VFC sugerem um efeito protetivo sobre a colestase, enquanto aumentos em ALT e AST indicam lesão hepatocelular (D.S. Pratt et al., Harrison's Principles of Internal Medicine 15ª Edição, páginas 1711 a 1715 (2001). Reciprocamente, globulina e bilirrubina são iluminadas pelo fígado, e elevações refletem a função hepática comprometida.

[0170] A faixa normal para globulina para ratos Sprague-Dawley é de 2,8 a 4,5 g/dL (dados de referência de IDEXX). Como mostrado na TABELA 2, concentrações de globulina ponderaram 3,4 g/dL para ratos que recebem uma dieta contendo VFC, e 4,0 e 3,9 g/dL para ratos que recebem dietas contendo celulose e inulina, respectivamente. O efeito do tipo de fibra foi significativo ($p < 0,001$), com uma diferença significativa entre grupos alimentados com ração contendo VFC e celulose ($p < 0,001$, MCT de Dunnett), mas não entre grupos alimentados com dietas contendo inulina e celulose. Similarmente, ratos alimentados com uma dieta contendo VFC ponderaram 0,13 mg/dL de bilirrubina total (direta e indireta), como mostrado na TABELA 2, enquanto ratos alimentados com dietas contendo celulose e inulina ponderaram 0,19 e 0,18 mg/dL, respectivamente. A faixa de referência para ratos Sprague-Dawley é de 0 a 0,4 mg/dL (dados de referência de IDEXX). efeitos de tratamento foram estatisticamente significantes (ANOVA de 1 via, $F(2,28) = 4,93$, $p < 0,05$), com uma diferença significativa entre grupos alimentados com dietas contendo

VFC ($p < 0,05$, MCT de Dunnett) mas não entre grupos alimentados com dietas contendo inulina e celulose. Embora níveis de globulina e bilirrubina estivessem dentro de limites normais para todos os grupos, ratos alimentados com uma dieta contendo VFC mostraram concentrações significativamente mais baixas ($p < 0,001$) de ambos os analitos versus os outros grupos, sugerindo função hepática melhorada.

[0171] A faixa normal para bilirrubina para ratos Sprague-Dawley é de 0 a 0,4 mg/dL (dados de referência de IDEXX). Nenhuma diferença significativa em bilirrubina foi observada entre os grupos de tratamento. A albumina, que é sintetizada pelo fígado, foi similar em todos os grupos de tratamento.

[0172] TABELA 2: Química do plasma de analitos chaves tomados no término do estudo em ratos diabéticos Zucker que não de jejum (medição de valor de referência de OGTT que não de jejum final)

Dieta	VFC (PGX [®])	Celulose	Inulina
Colesterol (mg/dL)	179,6 ± 6,4 ^{***}	383,7 ± 23,2	350,8 ± 21,3
Aspartato aminotransferase (AST) (IU/L)	165,9 ± 24,5 ^{***}	871,4 ± 109,3	1010,1 ± 169,1
Alanina aminotransferase (ALT) (IU/L)	93,3 ± 13,3 [*]	299,4 ± 30,9	472,7 ± 77,7 [*]
Bilirrubina (mg/dL)	0,1 ± 0,0 [*]	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Fosfatase alcalina (IU/L)	134,2 ± 7,7 ^{***}	327,7 ± 46,8	302,3 ± 30,3
Globulina (g/L)	3,4 ± 0,1 ^{***}	4,0 ± 0,1	3,9 ± 0,1
Albumina (g/dL)	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1
Nitrogênio ureico no sangue (mg/dL)	10,4 ± 0,6	13,4 ± 0,7	17,0 ± 2,6
Triglicerídeos (mg/dL)	276,4 ± 24,6	276,7 ± 43,5	352,6 ± 67,6

[0173] * significativamente diferente do grupo de celulose ($p < 0,05$)

[0174] ** significativamente diferente do grupo de celulose ($p < 0,01$)

[0175] *** significativamente diferente do grupo de celulose ($p < 0,001$)

Debate dos Resultados:

[0176] Este estudo no modelo de rato diabético Zucker demonstra que uma dieta contendo VFC significativamente melhora o controle glicêmico, reduz o dano renal, preserva células beta pancreáticas, melhora a sensibilidade à insulina, e portanto reduz a carga de glicose total no corpo. Além disso, uma redução na taxa de ganho de peso corporal em aproximadamente 10 % durante o curso do estudo foi observada em ratos alimentados com uma dieta contendo VFC em comparação às outras dietas enriquecidas com fibras. Isto pode ser parcialmente devido ao consumo de alimento reduzido observado durante o estudo, embora o consumo de alimento reduzido fosse significativo apenas para as primeiras três semanas do estudo. Como mostrado ainda no Exemplo 4, VFC também aumenta a secreção de GLP-1 e PYY de indução de saciedade.

[0177] A quantidade de grânulos de VFC usados neste estudo foi 5 % de VFC adicionados à ração para rato. Como mostrado nas FIGURAS 1A e 1B, o consumo de alimento por dia para ratos alimentados com VFC ponderaram aproximadamente 22 g/dia, assim em 22 gramas, 1,1 g de VFC. Supondo que o peso médio dos ratos Zucker seja de aproximadamente 300 g (ver a FIGURA 1A), então a dosagem neste estudo por kg foi de aproximadamente 3,66 g/d/kg. Supondo que um ser humano é de cerca de 60 k, então esta dosagem seria o equivalente de cerca de 219,6 g/dia para um ser humano. Usando a conversão para dosagens com base na área de superfície corporal ao volume de 0,1 a 0,15 da dose de rato para o ser humano, como descrito em Reagan-Shaw et al., FASEB Journal 22:659-661 (2007), isto se traduziria em uma faixa de dosagem em um ser humano de 60 kg de cerca de 22 gramas a cerca de 33 gramas de VFC por dia, ou de cerca de 366 mg/kg/dia a cerca de 550 mg/kg/dia.

[0178] Neste estudo, os ratos diabéticos Zucker de jejum (isto é, animais testados na manhã depois de aproximadamente 16 horas sem acesso ao alimento) não tiveram níveis de glicose muito elevados, provavelmente devido à compensação adequada fornecida pela hiperinsulinemia observada conforme a doença estava apenas começando a torna-se evidente. Nos animais de jejum por 16 horas antes do teste, através dos grupos de dieta, níveis de insulina foram mais altos nos grupos tratados

com celulose e inulina quando comparado ao grupo tratado com VFC, que em combinação com as contagens de HOMA e CISI é indicativo de uma resistência à insulina periférica maior nos grupos tratados com inulina e celulose em comparação a animais tratados com VFC. Portanto, parece que VFC não precisa estar presente no intestino para melhorar a sensibilidade à insulina. Embora não desejando estar ligado por qualquer teoria particular, a sensibilidade à insulina melhorada observada nos animais tratados com VFC que estiveram de jejum por 16 horas antes do teste pode ser devido à expressão de proglucagon aumentada (S.P. Massimino et al., J. Nutr. 128:1786-1793 (1998); R.A. Reimer et al., Endocrinology 137:3948-3956 (1996)); ou pode ser devido à superregulação de GLUT-4 muscular (Y.J. Song et al., Clin. Exp. Pharm. Physiol. 27:41-45 (2000)).

[0179] Visto que os animais que estiveram de jejum por 16 horas antes do teste foram apenas levemente hiperglicêmicos, começando em três semanas no estudo, a glicose no plasma também foi medida nos ratos sob um estado que não de jejum (isto é, acesso contínuo ao alimento antes do teste). Foi determinado que nos animais testados no estado que não de jejum, os animais nos grupos tratados com celulose e inulina foram hiperglicêmicos, ao passo que os animais no grupo tratado com VFC tiveram níveis de glicose que foram reduzidos até níveis quase não diabéticos. Os níveis de insulina no estado que não de jejum foram apenas medidos no término do estudo, e foi descoberto que a insulina foi significativamente reduzida nos animais tratados com VFC, e as contagens de HOMA e CISI também mostraram sensibilidade à insulina melhorada nos animais tratados com VFC quando comparado aos outros grupos.

[0180] Portanto, devido aos resultados de que a insulina sérica foi significativamente reduzida tanto em estados de jejum quanto em que não de jejum nos animais tratados com VFC, e a glicose no sangue foi significativamente reduzido em animais tratados com VFC testados no estado que não de jejum, parece que o tratamento com VFC dos ratos diabéticos Zucker foi eficaz para retardar a progressão precoce da diabetes.

[0181] Além de melhoras no controle glicêmico, foi determinado que os animais

tratados com VFC também tiveram dano de órgão reduzido em comparação aos animais tratados com celulose e inulina. Nefropatia diabética é uma seqüela clinicamente importante da diabetes, particularmente espessamento da membrana basal glomerular e expansão do mesângio e túbulos e degeneração tubular, resultante de distúrbios metabólicos e alterações hemodinâmicas (H.R. Brady e B.M. Brenner: Pathogenesis of Glomerular Injury, em Harrison's Principles of Internal Medicine 15ª ed., E. Braunwald et al., páginas 1572 a 1580 (2001)). Interessantemente, foi determinado neste estudo que dano ao órgão significativo ocorre muito rapidamente nos ratos diabéticos Zucker mais jovens com o início precoce de diabetes, apesar de uma diabetes relativamente suave. Importaneamente, foi observado que animais tratados com VFC tiveram uma densidade significativamente maior de células β pancreáticas presentes no final do estudo de 8 semanas quando comparado aos grupos tratados com inulina ou celulose. Estes dados indicam que ratos diabéticos Zucker alimentados com uma dieta contendo VFC por oito semanas mantiveram uma capacidade reversa significativamente maior quanto à secreção de insulina. É observado que a preservação de células β pancreáticas foi observada por inibidores de DPP IV que aumentaram os níveis do secretagogo de insulina GLP-1, e em alguns estudos usando inibidores de DPP IV, a insulina é mais alta do que o controle em modelos de diabetes tipo II, particularmente níveis de insulina pós-prandial (A. Viljanen et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 94:50-55 (2009)).

[0182] No modelo de rato diabético Zucker usado neste estudo, níveis de glicose que não de jejum pareceram ser suficientes para causar dano renal. Foi determinado que houve menos lesão renal no grupo tratado com VFC, em particular com respeito à expansão mesangial. O controle glicêmico realçado durante a alimentação normal e redução subsequente na glicação tecidual provavelmente serviu como um fator principal na lesão renal reduzida. Interessantemente, e inesperadamente, a histologia mostrou que VFC significativamente protegeu os rins de dano por glicação, indicando uma redução na carga de glicose total, e portanto glicação reduzida. O FDA considera a glicação reduzida como um marcador primário para efeitos antidiabéticos, visto que uma mera redução de glicose no sangue não é mais considerado suficiente para a

aprovação do medicamento.

[0183] Quanto ao efeito de tratamento com VFC sobre perfis lipídicos séricos e hepáticos, o colesterol plasmático foi significativamente reduzido no grupo tratado com VFC. O efeito sobre níveis de triglicerídeo sérico foi mais variável. Não obstante, níveis lipídicos hepáticos (esteatose) e medições hepáticas tais como bilirrubina, ALT, e AST séricos foram significativamente reduzidos no grupo tratado com VFC, que indicou dano hepático reduzido no grupo tratado com VFC. Além disso, com base na análise histológica, também foi determinado que animais tratados com VFC tiveram índices reduzidos de lesão hepatocelular e níveis séricos reduzidos de fosfatase alcalina, que podem indicar que animais tratados com VFC tiveram colestatase reduzida assim como uma redução em esteatoepatose, um acompanhamento comum da síndrome metabólica (A. Viljanen et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 94:50-55 (2009)).

[0184] Portanto, a eficácia para o uso de VFC é demonstrada em ZDFs em termos de controle glicêmico, redução de dano renal e preservação de células beta pancreáticas. Como demonstrado neste Exemplo, os ratos tratados com VFC tiveram menos lesão renal, em particular expansão mesangial. O controle glicêmico realçado e a redução subsequente na glicação tecidual provavelmente serviram como um fator principal na lesão renal reduzida. Portanto, VFC pode ser usado como um aditivo dietético para ajudar a melhorar o desenvolvimento e progressão da fase inicial da síndrome metabólica, incluindo a capacidade para reduzir a progressão de dano ao órgão induzido por glicose, acúmulo de lipídeo no fígado, e inibir a perda de células beta pancreáticas.

EXEMPLO 2

[0185] Este exemplo descreve um estudo realizado em um modelo de rato com obesidade induzida por dieta com alto teor de sacarose para determinar o efeito de uma composição de fibra dietética, compreendendo uma combinação de fibra viscosa granulada (grânulos de VFC) (também referida como o complexo de fibra PolyGlycopleX (PGX[®])) sobre a desregulação pancreática, dislipidemia, e obesidade.

[0186] Análise racional: Como descrito no Exemplo 1, os novos grânulos de complexo de fibra solúvel em água, VFC, também referido como PolyGlycopleX[®]

(PGX[®]) (fabricado de manano de konjac, goma xantana, e alginato para formar um complexo de polissacarídeo altamente viscoso com altas propriedades de retenção de água e formação de gel), reduzem o peso corporal e aumentam sensibilidade à insulina em ratos diabéticos Zucker. Entretanto, o efeito de grânulos de VFC observados nos ratos diabéticos Zucker com respeito a triacilgliceróis séricos (TAG) foi variável. A variabilidade de várias fibras para reduzir níveis de TAG no soro foi observada em outros estudos, e pode referir-se ao tipo de fibra e ao modelo de animal particular (W.U. Jie et al., *Biomed. Environ. Sci.* 10:27-37 (1997); A. Sandberg et al., *Am. J. Clin. Nutr.* 60:751-756 (1994); R. Wood et al., *Metab. Clin. Exp.* 56:58-67 (2007); e N.M. Delzenne et al., *J. Nutr.* 129:1467S-1470S (1999)). Por exemplo, um estudo de Mao-Yu et al. mostrou que a redução de TAG por fibras não digeríveis é dependente da severidade do aumento e estabilidade de TAG com o passar do tempo (Z. Mao-Yu et al., *Biomed. Environ. Sci.* 3:99-105 (1990)).

[0187] O estudo descrito neste Exemplo foi realizado para determinar os efeitos de VFC granulado (PGX[®]) sobre ganho de peso corporal, triacilgliceróis séricos (TAG), e esteatose hepática em ratos Sprague-Dawley machos alimentados com sacarose, um modelo de obesidade induzida por dieta (alto teor de sacarose de 65 % peso/peso), conhecido resultar no ganho de peso e aumentos consistentes em níveis de TAG no fígado e soro, particularmente quando dados cronicamente, que imita rigorosamente diabete tipo II humana (A.M. Gadja et al., *A. Lab News* 13:1-7 (2007); M. Hafidi et al., *Clin. Exp. Hyperten.* 28:669-681 (2006); e P. Rozan et al., *Br. J. Nutr.* 98:1-8 (2008)). O estudo descrito neste exemplo foi realizado por 43 semanas de modo a capturar uma parte razoável do ciclo de vida dos ratos e maximizar aumentos consistentes em níveis de TAG no soro que são característicos deste modelo.

Métodos:

Ração para rato realçada com fibra:

[0188] Grânulos de complexo de fibra viscosa (VFC) (konjac/xantana/alginato (70:13:17)) (isto é, a combinação de fibra foi processada por granulação para formar um complexo, comercialmente conhecido como PGX[®]) foram incorporados na ração para rato básica (D11725: Research Diets, New Brunswick, Nova Jersey). Dietas

alternadas usadas neste estudo incorporaram outras formas de fibra como mostrado abaixo na TABELA 3. Celulose foi selecionada como a fibra de referência básica que é insolúvel e é não fermentável e é considerada ser um composto de referência inerte (J.W. Anderson et al., J. Nutr. 124:78-83 (1994)).

[0189] TABELA 3: Composição das três dietas contendo VFC ou celulose (porcentagem de contribuição de ingredientes em peso)

	Complexo de fibra viscosa (VFC) (konjac/xantana/alginato (70:13:17)) PGX® grânulos	Fibra insolúvel(celulose)
Research Diets Fórmula #	D08012504	D08012507
Caseína	20 %	20 %
Metionina	0,3 %	0,3 %
Amido de milho	50 %	50 %
Maltodextrina	15 %	15 %
Fibra*	5 % de VFC (PGX®)	5 % de celulose
Óleo de milho	5 %	5 %
Mistura de sal/mineral	3,5 %	3,5 %
Mistura de vitamina	1 %	1 %
Bitartarato de colina	0,2 %	0,2 %
Corante	0,1 %	0,1 %

[0190] *Grânulos de fibra do VFC comercialmente conhecidos como PolyGlycopleX® (PGX®) (InnovoBiologic Inc. Calgary, AB, Canadá).

[0191] Modelo de animal: O rato Sprague-Dawley (SD) macho foi escolhido porque o rato alimentado com sacarose é considerado ser um modelo excelente de hipertrigliceridomia na presença de uma base genética normal (A.M. Gadja et al., A Lab News 13:1-7 (2007)).

[0192] Projeto de estudo: 30 ratos SD machos foram obtidos de Charles River (Kingston NY) em seis semanas de idade. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de malha de arame suspensas, que corresponderam ao tamanho recomendado no Guide for the Care and Use of Laboratory Animals mais recente, DHEW (NIH). O ambiente do animal foi controlado em temperatura e umidade, teve um ciclo de luz/escuridão de 12 horas, e foi mantido limpo e livre de parasitas. Os animais foram condicionados por quatro dias antes do teste.

Água: Água de torneira filtrada foi fornecida à vontade por um sistema de dispensação de água automático.

[0193] Alimento: Depois da habituação, ratos foram aleatoriamente designados a um de dois grupos com $n = 10$ por grupo, celulose em 5 % (peso/peso) ou 5 % VFB (peso/peso), e com 65 % (peso/peso) de sacarose adicionados à dieta de ambos os grupos. As dietas foram quase isoenergéticas, com a dieta de celulose sendo de 3,90 kcal/g e a dieta de VFC sendo de 3,98 kcal/g, por um total de aproximadamente 3902 kcal dietéticos totais. Os ratos foram alimentados com a dieta com alto teor de sacarose à vontade com celulose (peso corporal de partida de $214,7 \pm 2,6$ g) ou VFB (peso de partida de $220,8 \pm 3,5$ g) por um total de 43 semanas.

[0194] Medições de estudo: Consumo de alimentos (diário), peso corporal (semanalmente), e coleta semanal de amostras de sangue para a medição de triacilgliceróis séricos (TAG) (analisados por IDEXX, North Grafton, MA), glicose no sangue (por intermédio de Acensia Elite Glicosímetro) e insulina sérica (Ani Lytics, Gaithersburg, MD) foram seguidos por todo o estudo. O estudo foi concluído com uma análise de sangue final para medir a glicação de hemoglobina e nitrogênio ureico no sangue. Uma necropsia limitada foi depois realizada como segue. Um lóbulo do fígado foi congelado repentinamente para a análise de teor de lipídeo usando histoquímica de negro de Sudão. Um lóbulo do fígado foi pós-fixado para coloração com hematoxilina e eosina.

[0195] Métodos estatísticos: Ganho de peso corporal foi analisado quanto a diferenças estatísticas usando medidas repetidas ANOVA e ANOVA de uma via quanto a diferenças no ganho de peso por todo o estudo. Taxas de erro alfa para

multiplicar comparações foram controladas usando a correção de Bonferroni. Contagens histológicas foram medidas usando o teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos.

Resultados:

[0196] A FIGURA 9 ilustra graficamente o efeito de dietas com VFC granulado (PGX[®]) ou celulose sobre o ganho de peso corporal e triacilgliceróis séricos (TAG) em ratos Sprague-Dawley alimentados com sacarose durante o estudo de 43 semanas (o símbolo "*" indica $p < 0,05$; o símbolo "***" indica $p < 0,01$; o símbolo "****" indica $p < 0,001$). Pesos corporais iniciais não diferiram entre o grupo alimentado com VFC (215 ± 3 gramas) e o grupo alimentado com celulose (221 ± 3 g). Como mostrado na FIGURA 9, o peso corporal aumentou com o passar do tempo em ambos os grupos devido à dieta rica em sacarose, entretanto o ganho de peso foi significativamente atenuado no grupo alimentado com VFC do início do estudo até a semana 22 em comparação ao grupo alimentado com celulose ($p < 0,05$). Medições repetidas mostraram um efeito de tratamento significante sobre o ganho de peso ($p = 0,04$) com ratos alimentados com VFC mostrando ganho de peso reduzido. Embora o peso corporal final não diferisse significativamente entre os grupos ($p = 0,20$; 660 ± 22 versus 645 ± 26 g para alimentados com VFC e celulose, respectivamente), os ratos com VFC mantiveram um peso corporal mais baixo de 7 % no término do estudo. O consumo de alimentos para ratos alimentados com VFC foi similar ao de ratos alimentados com celulose (dados não mostrados).

[0197] Como mostrado ainda na FIGURA 9, níveis de TAG sérico foram estáveis para a parte inicial do estudo, mas subiram com o passar do tempo no grupo alimentado com celulose até o término do estudo em 43 semanas. Ao contrário, os ratos alimentados com VFC mostraram níveis de TAG sérico significativamente mais baixos versus o grupo alimentado com celulose ($p < 0,01$). O grupo alimentado com VFC teve níveis de TAG de valor de referência que não foram significativamente diferentes de níveis de TAG de valor de referência no grupo alimentado com celulose.

[0198] Ratos alimentados com uma dieta contendo VFC mostraram menos esteatose hepática (medida por coloração com negro de Sudão) que ratos

alimentados com dietas com celulose. O teor de lipídeo foi determinado por coloração de seções de tecido do fígado com negro de Sudão, e as lâminas foram avaliadas e classificadas semi-quantitativamente quanto à presença de vacúolos positivos com negro de Sudão em uma escala de 0 a 5, com 5 sendo a mais severa. Contagens de severidade foram $3,9 \pm 0,3$ para o grupo tratado com celulose e $2,7 \pm 0,4$ para o grupo tratado com VFC, que foi significativamente diferente. Uma tendência forte para a redução na lesão hepatocelular em ratos alimentados com VFC também foi observada em comparação a ratos alimentados com celulose, embora a diferença não fosse estatisticamente significativa ($p < 0,07$ para vacuolização macrovesicular e $p < 0,11$ para vacuolização microvesicular, dados não mostrados).

[0199] Níveis de glicose no sangue e insulina foram monitorados semanalmente por todo o estudo e não foram alterados, o que é esperado para este modelo de animal (A.M. Gadja et al., A. Lab News 13:1-7 (2007)).

Debate:

[0200] Como esperado neste modelo de obesidade induzida por dieta, os ratos Sprague-Dawley (SD) alimentados com sacarose ganharam peso rapidamente com o tempo até aproximadamente 18 a 25 semanas, tempo este em que o peso estabilizou a uma taxa mais lenta de crescimento. Como mostrado na FIGURA 9, durante o período de crescimento de peso rápido, grânulos de VFC significativamente reduziram mudanças no peso corporal em comparação à celulose, com reduções menores observadas durante a fase de crescimento mais lento na última parte do estudo (isto é, idades maiores dos ratos). Como mostrado ainda na FIGURA 9, TAG no plasma apenas aumentou acima do valor de referência nos ratos mais velhos, e VFC significativamente obtundiu a elevação em TAG. Compatível com estes dados, a esteatose hepática foi significativamente reduzida em animais alimentados com VFC como medido por histomorfometria em comparação a animais alimentados com celulose.

[0201] A redução do peso em pacientes que consomem fibras não digeríveis é considerada estar relacionada a um ou mais dos seguintes: consumo de alimento reduzido, resposta hormonal à saciedade alterada, adsorção de nutriente reduzida

secundária ao retardo gástrico e/ou adsorção de nutriente pela fibra (ver N.C. Howarth et al., *Nutr. Rev.* 59:163-169 (2001); A. Sandberg et al., *Am. J. Clin. Nutr.* 60:751-756 (1994); G. Grunberger et al., *Diabet. Metab. Res. Rev.* 23:56-62 (2006); e J.R. Paxman et al., *Nutr. Res.* 51:501-505 (2008)). É interessante observar que no presente estudo, pouca redução no consumo de alimentos foi observada, portanto este fator provavelmente não contribuiu para a redução do peso observada em animais alimentados com VFC. Embora não desejando estar ligado por qualquer teoria particular, é possível que o esvaziamento gástrico mais lento e a absorção de nutriente reduzida do alimento ingerido podem ser responsáveis pela redução do peso, que pode ser devido à secreção aumentada de proteína semelhante a Glucagon(GLP-1) (N.N. Kok et al., *J. Nutr.* 128:1099-1103 (1998)).

[0202] A redução de TAG no fígado ou plasma foi o assunto de muitos estudos de fibra dietética, e os resultados variam amplamente (W.U. Jie et al., *Biomed. Environ. Sci.* 10:27-37 (1997); A. Sandberg et al., *Am. J. Clin. Nutr.* 60:751-756 (1994); R. Wood et al., *Metab. Clin. Exp.* 56:58-67 (2007); e N.M. Delzenne et al., *J. Nutr.* 129:1467S-1470S (1999); P. Rozan et al., *Br. J. Nutr.* 98:1-8 (2008)). Nem todos os estudos mostram a absorção de TAG a ser acentuadamente reduzida, com algumas diferenças observadas entre tipos de fibra. Por exemplo, um estudo de Delzenne e Kok mostrou que oligofrutose reduziu a esteatose hepática reduzindo-se a lipogênese em ratos alimentados com frutose (N.M. Delzenne et al., *J. Nutr.* 129:1467S-1470S (1999)). Similarmente, Kok et al. sugerem que a secreção de GLP-1 induzida por fibra de oligofrutose também pode ser responsável por lipogênese e mobilização de gordura reduzida (N.N. Kok et al., *J. Nutr.* 128:1099-1103 (1998)). Embora não desejando estar ligado por qualquer teoria particular, é provável que tanto a lipogênese reduzida quanto a absorção de gordura reduzida desempenharam um papel nas reduções de TAG observadas nos animais alimentados com VFC neste estudo. A absorção de nutriente reduzida explicaria a redução no ganho de peso observado sem uma redução no consumo de alimentos.

[0203] Em conclusão, este estudo demonstra que grânulos de VFC significativamente reduziram TAG no soro no modelo de rato Sprague-Dawley (SD)

alimentado com sacarose, que produtos farmacêuticos correntes não são muito eficazes em reduzir. A esteatose hepática reduzida assemelha-se a TAG no soro reduzido, e tais propriedades torna os grânulos de VFC um aditivo de alimento útil para tratar pacientes com hiperlipidemia assim como outros aspectos de síndrome metabólica incluindo perda de peso.

EXEMPLO 3

[0204] Este Exemplo descreve um estudo em pacientes humanos adultos com sobrepeso e obesos demonstrando o efeito de uma composição de fibra dietética, compreendendo um complexo de fibra viscosa granulada (grânulos de VFC) (também referido como o complexo de fibra PolyGlycopleX (PGX[®])) sobre a perda de peso a curto prazo e fatores de risco associados.

[0205] Análise racional: De acordo com dados recentes publicados pela World Health Organization, a obesidade tem atingido proporções epidêmicas globais com mais do que 1 bilhão de adultos com sobrepeso afetados por este distúrbio crônico (www.who.int, acessado em 15/3/08). Aterosclerose coronariana e acidente vascular cerebral, resistência à insulina, (síndrome metabólica), diabetes tipo II, hipertensão, e câncer são todos comorbidades médicas bem conhecidas de peso corporal em excesso (K. Fukuioka Obesity Res 10(Supp 12):116S-123S (2002)). Além disso, um estudo epidemiológico recente confirmou que a obesidade em adulto é associada com uma redução significativa na expectativa de vida. Este estudo mostrou que não fumantes masculinos e femininos de 40 anos de idade perderam em média 7,1 e 5,8 anos de suas vidas respectivamente devido à obesidade (A. Peeters et al., Ann. Intern. Med. 138:24-32 (2003)). Dados estes últimos fatores de risco, várias intervenções terapêuticas estão disponíveis para o indivíduo com sobrepeso/obeso que podem incluir cirurgia, terapia medicamentosa, e modificações no estilo de vida tais como dieta e exercício.

[0206] Uma estratégia de dieta importante de qualquer programa de controle de peso deveria envolver o consumo de quantidades significantes de alimentos com alto teor de fibra, particularmente alimentos ou suplementos alimentícios contendo fibra solúvel viscosa (K.M. Queenan et al., Nutr. J. (2007)). Estima-se que os cidadãos

americanos em média consomem aproximadamente 2,4 gramas de fibra solúvel viscosa por dia — metade dos 5 a 10 gramas de fibra solúvel viscosa dietética recomendada para serem consumidos em uma base diária (T.A. Shamliyan et al., J. Family Practice 55:761-69 (2006)).

[0207] Devido à dificuldade em obter as quantidades ideais de fibra solúvel através da dieta sozinha, existe uma necessidade clara por concentrados de fibra solúvel que podem ser usados como ingredientes alimentícios ou consumidos como suplementos para levar em consideração um consumo consistentemente alto de fibra solúvel. VFC granulado, também referido como PGX[®] (PolyGlycopleX[®]) é um novo complexo de polissacarídeo altamente viscoso que é fabricado reagindo-se glucomanano, goma xantana, e alginato usando um processo referido como EnviroSimplex[®]. O complexo de polissacarídeo resultante (α -D-glucurono- α -D-mano- β -D-mano- β -D-glucano), (α -L-gulurono- β -D-manuronano), β -D-gluco- β -D-manano, α -D-glucurono- α -D-mano- β -D-mano- β -D-gluco), (α -L-gulurono- β -D-manurono), β -D-gluco- β -D-manano é uma nova entidade, como demonstrado na análise estrutural descrita nos Exemplos 5 e 6, e tem a capacidade de retenção de viscosidade e água mais alta de qualquer fibra correntemente conhecida.

[0208] Este exemplo descreve um estudo realizado para examinar a eficácia de grânulos de VFC e modificações modestas sobre o estilo de vida sobre perda de peso, índice de massa corpórea (BMI), assim como fatores de risco cardiometabólicos incluindo colesterol, colesterol de lipoproteína de densidade baixa (LDL), lipoproteína de densidade alta (HDL), triglicérides, insulina de jejum, glicose de jejum, e teste de tolerância à glicose de 2 horas durante um intervalo de tempo de 14 semanas em adultos com sobrepeso e obesos.

Métodos:

[0209] Participantes: Um total de 29 adultos sedentários (23 mulheres; 6 homens), de idade de 20 a 65 anos, com uma faixa de índice de massa corpórea (BMI) de aproximadamente 25 kg/m² a 36 kg/m², foram convidados a participar através de uma série de anúncios colocados em jornais locais. Os pacientes forneceram consentimento informado antes da participação neste programa. A análise

observacional foi conduzida de acordo com os padrões éticos apresentados na Declaração de Helsinki de 1975.

[0210] Medições antropométricas e outras: Os participantes foram avaliados em uma base bissemanal quanto a medições de altura (cm), peso (quilogramas), e da cintura-quadril (cm) usando uma fita métrica do tipo médico padrão. Medições da cintura-quadril foram tomadas em locais anatômicos compatíveis aproximadamente 2,2 cm acima do umbigo e em torno do quadril no tocante maior em pacientes que usam um jaleco de papel descartável. A porcentagem de gordura corporal foi determinada usando teste de impedância bioelétrica (RJL Systems, Michigan, USA) no valor de referência (antes do início do estudo) e a cada duas semanas posteriormente. Uma análise computadorizada dos dados de impedância foi empregada de modo a determinar o índice de massa corpórea (BMI) e a porcentagem de gordura corporal.

[0211] Dieta e suplementação: Cada voluntário recebeu direções gerais de um médico quanto à alimentação saudável, perda de peso e exercício. Além disso, sessões de recomendação de dieta e exercício foram apresentadas ao grupo a cada duas semanas por 14 semanas. A ênfase nestas palestras não foi sobre contagem de calorias, mas principalmente focada no controle da porção e como seguir e manter uma dieta com baixo teor de gordura, índice glicêmico baixo. Recomendações gerais também foram incluídas neste programa focando na variedade, tipo, e cronograma de exercício (por exemplo, resistência e treinamento aeróbico cardiovascular) que aumentariam a redução do peso global. Além disso, pacientes foram fornecidos com grânulos de complexo de fibra viscosa granulada (VFC) (konjac/xantana/alginato (70:13:17), também referidos como o complexo de fibra PolyGlycopleX (PGX®)) que pode ser adicionado a uma bebida ou alimento (por exemplo, um iogurte sem gordura).

[0212] Cinco gramas de grânulos de VFC tiveram que ser consumidos com 500 ml de água 5 a 10 minutos antes de cada refeição, duas a três vezes por dia por 14 semanas, para um consumo diário total de 10 a 15 gramas de VFC granulada/dia.

[0213] Coleta de sangue e análise bioquímica laboratorial: Todas as medições laboratoriais foram realizadas por um laboratório independente em British Columbia,

Canadá. No valor de referência (antes do início do estudo), pacientes foram questionados a jejuar dez horas antes do procedimento de retirada do sangue que incluiu os seguintes testes: colesterol total, triglicérides, HDL, LDL, glicose, insulina, e insulina de 2 horas. Um teste de tolerância à glicose oral de 75 gramas também foi realizado de acordo com os critérios e procedimentos como determinado pelo laboratório. Apenas aqueles com fatores de risco aberrantes foram testados novamente usando os últimos parâmetros laboratoriais na semana 14.

[0214] Análise estatística: Uma análise estatística computadorizada foi realizada usando o teste t pareado de modo a avaliar vários tipos de variáveis incluindo altura, peso, BMI, % de gordura corporal, e vários valores laboratoriais antes e depois do tratamento. Resultados significantes foram obtidos nestas variáveis que produziram um valor de p de $< 0,05$.

Resultados:

[0215] Perda de peso e Outros Parâmetros antropométricos: Durante as 14 semanas de uso de VFC, houve reduções significantes no peso do grupo ($-5,79 \pm 3,55$ kg), medições da cintura ($-12,07 \pm 5,56$ cm), % de gordura corporal ($-2,43 \pm 2,39$ %), e BMI ($-2,26 \pm 1,24$ kg/m²). Os resultados completos são mostrados abaixo nas TABELAS 4 e 5.

[0216] Tabela 4: Grupo 1: Homens e Mulheres Combinados

Teste	Tamanho da amostra	Semana 0 Média & SD	Semana 14 Média & SD	Mudança & SD	% de mudança
*Cintura	29	103,58 ^b ± 12,78	91,51 ^b ± 12,95	-12,07 ± 5,56 ^b	- 11,65
*Quadril	29	116,30 ^b ± 7,67	106, 83 ^b ± 7,44	- 9,47 ± 4,15 ^b	- 8,14
*% de gordura	29	40,30 ± 8,28	37,87 ± 8,88	- 2,43 ± 2,39	- 6,02

[0217] *p $< 0,05$ da semana 0

[0218] a = peso é em quilogramas (kg)

[0219] b = cintura e quadril são em centímetros (cm)

[0220] TABELA 5: BMI para todos os Grupos Combinados

Teste	Tamanho da amostra	Semana 0 Média & SD	Semana 14 Média & SD	Mudança & SD	% de mudança
*Macho	6	35,03 ^c ± 4,09	32,47 ^c ± 3,78	-2,56 ^c ± 1,22	- 7,31
*Fêmea	23	33,45 ^c ± 7,57	31,27 ^c ± 8,17	-2,18 ^c ± 1,26	- 6,52
*Todos	29	33,78 ^c ± 6,96	31,52 ^c ± 7,43	-2,26 ^c ± 1,24	- 6,70

[0221] *p < 0,05 da semana 0

[0222] c = BMI em kg/m²

[0223] Similarmente, ambos os sexos individualmente demonstraram reduções significantes nas variáveis de perda de peso testadas como mostrado na TABELA 6 e TABELA 7 abaixo. Como mostrado abaixo na TABELA 7, homens perderam em média 8,30 ± 2,79 kg durante o estudo de 14 semanas (média de 7,43 % de perda de peso). Como mostrado na TABELA 6, mulheres perderam uma média de 5,14 ± 3,49 kg durante o estudo de 14 semanas (média de 6 % perda de peso).

[0224] TABELA 6: Grupo 1: Mulheres (n = 23)

Teste	Semana 0 Média & SD	Semana 14 média & SD	Mudança & SD	% de mudança
*Peso	84,29 ^a ± 7,85	79,15 ^a ± 8,77	-5,14 ^a ± 3,49	-6,00
*Cintura	98,98 ^b ± 8,99	87,55 ^b ± 10,57	-11,43 ^b ± 5,71	-12,00
*Quadril	115,19 ^b ± 6,73	105,92 ^b ± 7,34	-9,27 ^b ± 4,29	-8,00
*% de gordura	43,88 ± 4,52	41,33 ^b ± 6,15	-2,55 ^b ± 2,63	-6,00

[0225] p < 0,05 da semana 0

[0226] a = peso é em quilogramas (kg)

[0227] b = cintura e quadril são em centímetros (cm)

[0228] TABELA 7: Grupo 2: Homens (n = 6)

Teste	Semana 0 Média & SD	Semana 14 Média & SD	Mudança & SD	% de mudança
*Peso	111,81 ^a ± 9,18	103,51 ^a ± 13,05	-8,30 ^a ± 2,79	-7,43
*Cintura	121,13 ^b ± 9,65	106,63 ^b ± 10,23	-14,50 ^b ± 4,59	-12,00
*Quadril	120,57 ^b ± 7,62	110,36 ^b ± 7,39	-10,21 ^b ± 3,63	-8,00

Teste	Semana 0 Média & SD	Semana 14 Média & SD	Mudança & SD	% de mudança
* % de gordura	26,58 ± 3,01	24,62 ^b ± 2,97	-1,97 ^b ± 1,15	-7,00

[0229] p < 0,05 da semana 0

[0230] a = peso é em quilogramas (kg)

[0231] b = cintura e quadril são em centímetros (cm)

[0232] Níveis de lipídeo: Comparados ao valor de referência valores obtidos antes do início do estudo, depois de 14 semanas de uso de VFC, pacientes tiveram uma redução média de 19,26 % em valores de colesterol total (n = 17; p < 0,05 da semana 0) e uma redução média de 25,51 % em valores de colesterol LDL (n = 16; p < 0,05 da semana 0). Como mostrado na TABELA 8, uma tendência também foi observado para uma redução em triglicerídeo e um aumento em valores de colesterol HDL observados neste estudo, entretanto as diferenças observadas não foram estatisticamente significantes.

[0233] Insulina e glicose de jejum: Depois de 14 semanas de uso de VFC, pacientes neste estudo experienciaram uma média de uma redução de 6,96 % na glicose de jejum (n = 20; p < 0,05 da semana 0), uma média de um declínio de 12,05 % na tolerância à glicose de 2 horas (n = 21; p < 0,05 da semana 0), e uma média de uma redução de 27,26 % em níveis de insulina de jejum (n = 17; p < 0,05 da semana 0) quando comparado a medições de valor de referência tomadas antes do início do estudo.

[0234] TABELA 8: Resumo dos dados laboratoriais globais obtidos durante a experiência de 14 semanas com VFC (PGX[®])

Teste	Tamanho da amostra	Semana 0 Média & SD	Semana 14 Média & SD	Mudança & SD	% de mudança
*Colesterol total (mmol/L)	17	5,69 ± 1,07	4,60 ± 0,82	-1,09 ± 0,63	-19,26
**Triglicerídeos (mmol/L)	17	1,92 ± 0,98	1,52 ± 0,56	-0,40 ± 0,89	-20,97
**HDL (mmol/L)	17	1,48 ± 0,53	1,53 ± 0,77	0,05 ± 0,67	3,33

Teste	Tamanho da amostra	Semana 0 Média & SD	Semana 14 Média & SD	Mudança & SD	% de mudança
*LDL (mmol/L)	16	3,40 ± 0,96	2,53 ± 0,64	-0,87 ± 0,56	-25,51
*Glicose de jejum (mmol/L)	20	5,75 ± 0,78	5,34 ± 0,49	-0,40 ± 0,65	-6,96
*Glicose de 2 h (mmol/L)	21	6,09 ± 2,10	5,35 ± 1,81	-0,73 ± 1,43	-12,05
*Insulina de jejum (pmol/L)	17	89,41 ± 44,84	65,04 ± 33,21	-24,37 ± 36,29	-27,26
**Insulina de 2 h (pmol/L)	17	433,53 ± 270,32	355,76 ± 332,44	-77,76 ± 196,51	-17,94

[0235] p < 0,05 da semana 0; **NS (não significativa) a partir do valor de referência

[0236] Análise da eficácia usando escalas auto-relatantes: Em uma escala auto-relatante completada pelos participantes no final do estudo, 97,7 % dos usuários de VFC observaram que eles tiveram uma resposta positiva ao produto tanto em desejos por alimentos de restrição quanto no apetite.

[0237] Efeitos colaterais da preparação do teste: O uso de VFC foi geralmente bem tolerado pelos participantes, com menores sintomas gastrointestinais (GI) compreendendo a maioria de todas as queixas relatadas. Sessenta e oito por cento observaram que sintomas GI suaves (por exemplo, gás, inchaço, constipação, fezes soltas) foram resolvidos dentro de aproximadamente três semanas do VFC de origem. Trinta e dois por cento dos participantes descobriram que eles tiveram efeitos colaterais GI suaves por todo o programa, mas que estes não foram suficientes em severidade para que eles descontinuassem o uso. Um estudo controlado recente sobre a tolerância de VFC (PGX[®]) foi conduzido na França que também confirmou estas últimas descobertas (I.G. Carabin et al., Nutrition J. 8:9 (2008)).

[0238] Debate: O estudo de perda de peso medicamente supervisionado descrito neste exemplo demonstra que o uso de grânulos de VFC junto com mudanças gerais na dieta e atividade física durante um período de tempo de 14 semanas foi de benefício em modificar os fatores de risco cardiometabólicos em pacientes com

sobrepeso e obesos. Geralmente, houve uma redução significativa no peso do grupo ($-5,79 \pm 3,55$ kg), medições da cintura ($-12,07 \pm 5,56$ cm), e porcentagem de gordura corporal ($-2,43 \pm 2,39$ %) a partir do valor de referência. Além disso, estas últimas mudanças físicas foram comparadas por uma diminuição significativa em níveis de LDL de jejum ($-25,51$ %), glicose de jejum ($-6,96$ %), e insulina de jejum ($-27,26$ %) durante um intervalo de tempo relativamente curto de 14 semanas.

[0239] É interessante observar que homens perderam mais peso em média ($-8,30 \pm 2,79$ kg) do que as mulheres ($-5,14 \pm 3,49$ kg) durante o período de tempo de 14 semanas. Esta mudança pode ser atribuída às diferenças sexuais básicas observadas no gasto de energia no repouso. Dr. Robert Ferraro et al. mostraram que o gasto de energia de 24 horas de sedentarismo é de aproximadamente 5 a 10 % mais baixo em mulheres comparado a homens depois de ajustes estatísticos quanto à idade, atividade, e composição corporal. (R. Ferraro et al., J. Clin. Invest. 90:780-784 (1992)).

[0240] Os resultados obtidos por VFC em reduzir o peso corporal ($-5,79$ kg) são comparáveis àqueles que tomaram a medicação anti-obesidade orlistat (Xenical®, Alli®). Orlistat é um inibidor de lipase que reduz a absorção de gordura (J.B. Dixon et al., Aust. Fam. Physician 35:576-79 (2006)). Em um estudo controlado, 391 indivíduos com sobrepeso suave a moderado que utilizaram o medicamento orlistat em uma dose de 60 mg, três vezes por dia durante um período de tempo de 16 semanas, perderam 3,05 kg comparado a 1,90 kg no grupo de placebo (J.W. Anderson et al., Ann. Pharmacother. 40:1717-23 (2006)).

[0241] O uso de VFC também resultou na redução de outros fatores de risco associados com obesidade suave a moderada. Geralmente, uma redução significativa foi observada de níveis de colesterol total ($-19,26$ %; $-1,09$ mmol/L) e níveis de colesterol LDL ($-25,51$ %; $-0,87$ mmol/L) a partir de valores de referência ($p < 0,05$) depois de 14 semanas de terapia com VFC. A redução em valores de lipídeo obtidos com VFC foi comparável ao uso de tais medicamentos de estatina de primeira geração como lovastatina (Mevacor™). Por exemplo, um estudo observou que dentro de um mês do começo da terapia com lovastatina, o colesterol total e LDL foi diminuído em 19 % e 27 % respectivamente naqueles com níveis de colesterol elevados (W.B.

Kannel et al., Am. J. Cardiol. 66:1B-10B (1990)).

[0242] Além disso, como descrito nos Exemplos 1 e 2, o uso de VFC não apenas diminui níveis de lipídeo no sangue, mas também pode ser usado para melhorar o desenvolvimento e progressão da fase inicial da síndrome metabólica. Um aumento em níveis de obesidade visceral, glicose sérica, e insulina junto com hipertensão e dislipidemia são um grupo de condições clínicas que são coletivamente conhecidas como a síndrome metabólica (E.J. Gallagher et al., Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 37:559-79 (2008)). A pesquisa mostrou que aqueles que têm síndrome metabólica têm um risco maior em 50 % de experienciar um evento coronário maior (D.E. Moller et al., Annu. Rev. Med. 56:45-62 (2005)). Como tal, quaisquer reduções em peso, insulina de jejum, e glicose confeririam benefícios de saúde significantes nestes indivíduos assim afligidos.

[0243] Neste estudo de 14 semanas, o uso de VFC resultou em uma diminuição de níveis de insulina de jejum de $89,41 \pm 44,84$ pmol/L para $65,04 \pm 33,21$ pmol/L ($p < 0,05$). A redução em insulina de jejum reflete a sensibilidade à insulina melhorada e pode ser devido em parte à atividade de GLP-1 aumentada e hiperglicemia pós-prandial diminuída junto com as melhoras na sensibilidade à insulina que acompanha a perda de peso (ver G. Reaven et al., Recent Prog. Horm. Res. 59:207-23 (2004)).

[0244] Estas descobertas são compatíveis com os resultados obtidos no estudo do rato diabético Zucker descrito no Exemplo 1, e sugerem que o uso terapêutico de VFC de acordo com modificações do estilo de vida é de benefício prático àqueles que sofrem com obesidade e certos fatores de risco cardiometabólicos. Diferente de outros tipos de intervenções médicas padrão disponíveis para tratar a obesidade e níveis de colesterol elevados, o uso de VFC é associado com efeitos colaterais mínimos. Este perfil de segurança vantajoso, junto com sua eficácia terapêutica, sugere que VFC deveria ser considerado como uma terapia de primeira linha para aqueles que estão com sobrepeso/são obesos, têm níveis de colesterol elevados e/ou são resistentes à insulina.

EXEMPLO 4

[0245] Este exemplo descreve um estudo em adultos saudáveis com peso normal

mostrando níveis de PYY no plasma aumentados e ácidos graxos de cadeia curta fecais aumentados (SCFA) a seguir da suplementação com complexo de fibra viscosa (VFC) em comparação com pacientes de controle alimentados com leite em pó desnatado.

Análise racional:

[0246] Numerosas fibras dietéticas mostraram ter numerosos benefícios de saúde, incluindo realce da secreção de hormônios de saciedade intestinal e melhora da função intestinal (R.A. Reimer et al., *Endocrinology* 137:3948-3956 (1996); Reimer e Russell, *Obesity* 16:40-46 (2008); P.D. Cani et al., *Br. J. Nutr.* 92:521-526 (2004); T.C. Adam e R.S. Westererp-Plantenga, *Br. J. Nutr.* 93:845-851 (2005)). Peptídeo-1 semelhante a Glucagon (GLP-1) e peptídeo YY (PYY) são peptídeos anorexigênicos envolvidos em reduzir o consumo de alimento, enquanto grelina, o único peptídeo orexigênico conhecido, é associada com o apetite (Wren e Bloom, *Gastroenterology* 132:2116-2130 (2007)).

[0247] Embora os mecanismos que regulam estes benefícios de fibras dietéticas não sejam completamente entendidos, acredita-se que a produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) medeia alguns dos efeitos. SCFA, e sobretudo acetato, butirato, e propionato, são produzidos no intestino grosso por fermentação anaeróbica de fibras dietéticas fermentáveis, e foram ligados ao estímulo de hormônios da saciedade e modulação do colesterol sérico.

[0248] O objetivo deste estudo foi examinar os níveis do hormônio de saciedade intestinal GLP-1, PYY e grelina assim como as concentrações de SCFA fecais em pacientes saudáveis depois de consumir VFC (PGX®) ou controle (leite em pó desnatado) por 21 dias.

Métodos:

[0249] Pacientes: Participantes foram homens e mulheres saudáveis, não fumantes entre as idades de 18 e 55 anos com um BMI entre 18,5 e 28,4 kg/m² (isto é, peso normal).

[0250] Projeto de estudo: A experiência controlada por placebo, duplo-cega, randomizada foi realizada como segue:

[0251] Participantes foram aleatoriamente designados em dois grupos:

[0252] O Grupo 1 (n = 27) consumiu o produto de teste grânulos do complexo de fibra viscosa (VFC) (konjac/xantana/alginato (70:13:17)) (isto é, a combinação de fibra foi processada por granulação para formar um complexo, comercialmente conhecido como PGX[®] fornecido por Inovobiologic Inc., Calgary, CA).

[0253] O Grupo 2 (n = 27) consumiu o produto de controle (leite em pó desnatado, que foi de cor e textura similares como o produto de teste).

[0254] O produto de controle e de teste foram pré-misturados com 10 g de um cereal matinal comercial da CRID Pharma, França, e embalado com 135 ml de um iogurte natural comercialmente disponível. Participantes combinaram o iogurte e o produto pré-misturado antes da ingestão.

[0255] Para os primeiros sete dias do estudo, os participantes consumiram 2,5 g de produto (teste ou controle) duas vezes por dia como parte de duas refeições principais. Para os últimos 14 dias do estudo, os participantes consumiram 5 g de produto (teste ou controle) duas vezes por dia. Durante a duração do estudo, os participantes foram instruídos a abster-se de consumir alimentos ricos em fibra e limitar o consumo de fibra dietética para aproximadamente 10 g por dia. Com a exceção do produto pré-misturado e iogurte, todos os outros alimentos foram adquiridos e preparados pelos participantes como sua dieta de costume.

[0256] Avaliações: Participantes tiveram avaliações realizadas em quatro visitas separadas. A triagem (Visita 0, uma visita de triagem, "V0") envolveu uma exame física.

[0257] Amostras de sangue: Uma amostra de sangue de jejum foi coletada na Visita 1, dia 0 do estudo (valor de referência). Visita 2 = sete dias no estudo, a seguir de uma semana de 5 g de ingestão do produto. Visita 3 = 21 dias no estudo, depois de duas semanas de 10 g de ingestão do produto. Durante cada visita, o sangue foi coletado em um tubo tratado com EDTA com a adição de Diprotina A (0,034 mg/ml de sangue; MP Biomedicals, Illkirch, França) e centrifugado em 3000 rpm por 12 min a 4 °C. O plasma foi contado a -80 °C até a análise.

[0258] Coleta das fezes: Amostras fecais foram obtidas de pacientes no valor de

referência (V1, Dia 0), a seguir de uma semana de 5 g/d de ingestão do produto (V2, Dia 8 ± 1), e a seguir de duas semanas de 10 g/d de ingestão do produto (V3, Dia 22 ± 2). Os pacientes coletaram uma amostra fecal dentro de 48 horas antes de cada visita programada. Aproximadamente 5 g de amostra foram transportados em gelo seco para a análise.

Análise plasmática do sangue:

[0259] GLP-1: GLP-1 ativo foi quantificado usando um kit ELISA da LINCO research (Millipore, St. Charles, MO). De acordo com o fabricante, a sensibilidade do ensaio é de 2 pM para uma tamanho da amostra de 100 µl. O CV intra-ensaio é de 8 % e o CV inter-ensaio é de 13 % em 4 pM (Millipore, St. Charles, MO).

[0260] PYY e Grelina: PYY e Grelina foram quantificados usando kits ELISA da Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (Burlingame, CA). A sensibilidade do ensaio para PYY foi 0,06 ng/ml e 0,13 ng/ml para grelina. CV intra-ensaio foi < 5 % para ambos os ensaios e CV inter-ensaio < 14 % e < 9 % para PYY e grelina, respectivamente.

[0261] Insulina: Insulina foi medida usando um kit ELISA da Millipore (St. Charles, MO). A sensibilidade do ensaio é de 2 µU/ml com um CV intra-ensaio < 7 % e CV inter-ensaio < 11,4 %.

[0262] Análise estatística: Os resultados são apresentados como média ± SEM. Níveis de peptídeo nas três visitas foram analisados por ANOVA de medições repetidas com um ajuste de Bonferroni [análise de fator dois com o tempo (V1, V2, V3) e dieta como parâmetros]. As associações entre dois parâmetros foram computadas usando coeficientes de correlação de Pearson. A avaliação do modelo homeostático quanto à resistência à insulina foi calculada usando a fórmula [HOMA-IR= insulina de jejum (µU/ml) X glicose de jejum (mmol/l)/22,5]. Os dados foram analisados usando o software SPSS v 16.0 (SPSS Inc. Chicago IL).

[0263] Análise fecal: medições de SCFA foram realizadas de acordo com Van Nuenen et al., *Microbial Ecology in Health and Disease* 15:137-144 (2003). Brevemente, amostras fecais foram centrifugadas e uma mistura de ácido fórmico (20 %), metanol e ácido 2-etil butírico (padrão interno, 2 mg/ml em metanol) adicionada ao sobrenadante claro. Uma amostra de 0,5 ml foi injetada em uma coluna GC

(Stabilwax-DA, comprimento de 15 m, ID de 0,53 mm, espessura da película de 0,1 mm; Varian Chrompack, Bergen op Zoom, Países Baixos) em uma cromatografia gasosa CP9001 Chrompack usando um amostrador automático. Tanto L-lactato quanto D-lactato foram determinados enzimaticamente no sobrenadante claro por um auto analisador Cobas Mira plus (Roche, Almere, Países Baixos). O pH foi medido usando um microelétrodo. A matéria seca foi medida secando-se uma sub-amostra até a secura a 110 °C por um mínimo de 2 dias.

[0264] Análise estatística: Os resultados são apresentados como média \pm SEM. SCFA nas três visitas foram analisadas por ANOVA de medições repetidas com a visita (V1, V2, V3) como o fator interno do paciente e tratamento como o fator entre o grupo. Correlações entre SCFA e outros resultados medidos (hormônios de saciedade, glicose, insulina e HOMA-IR) foram determinados usando análise de correlação de Pearson. A significância foi ajustada em $P \leq 0,05$.

Resultados:

[0265] 54 pacientes (25 masculinos e 29 femininos) participaram no estudo e estiveram presentes em todas as quatro visitas (V0 a V3). Nenhum paciente retirou-se do estudo, e o produto foi bem tolerado. O grupo de controle que recebe o produto de controle (11 homens, 16 mulheres) tinha uma idade média de $30,9 \pm 10,8$ e BMI inicial de $22,8 \pm 2,4$. O grupo que recebe o produto de teste (VFC) tinha uma idade média de $32,3 \pm 10,3$ e BMI inicial de $22,7 \pm 2,1$. Não houve nenhuma diferença nas características clínicas e bioquímicas de valor de referência entre os grupos.

[0266] As contagens de peso corporal, glicose, insulina e HOMA-IR em V1, V2 e V3 são fornecidas abaixo na TABELA 9.

[0267] TABELA 9: Peso corporal, e parâmetros bioquímicos de participantes que consomem controle ou VFC.

	Grupo de controle (Leite em pó desnatado)			Grupo de teste (VFC)		
	V1 (dia 0)	V2 (dia 7)	V3 (dia 21)	V1 (dia 0)	V2 (dia 7)	V3 (dia 21)
Peso corporal	64,60 \pm	N/M	64,60 \pm	68,20 \pm	N/M	68,43 \pm

	Grupo de controle (Leite em pó desnatado)			Grupo de teste (VFC)		
	V1 (dia 0)	V2 (dia 7)	V3 (dia 21)	V1 (dia 0)	V2 (dia 7)	V3 (dia 21)
(kg)	1,57		1,52	1,71		1,67
Glicose (mmol/l)	4,60 ± 0,06	4,60 ± 0,07	4,62 ± 0,10	4,67 ± 0,09	4,60 ± 0,08	4,60 ± 0,08
Insulina (µU/ml)	5,32 ± 0,85	4,52 ± 0,33	5,19 ± 0,33	5,52 ± 0,56	4,52 ± 0,49	4,61 ± 0,47
HOMA-IR	1,11 ± 0,20	0,93 ± 0,07	1,07 ± 0,07	1,15 ± 0,11	0,96 ± 0,11	0,94 ± 0,10

[0268] Valores representam a média ± SEM (n = 27/grupo). N/M = não medido. Quando o gênero foi incluído como uma covariante no ANOVA de medições repetidas, a diferença entre as visitas foi significativa para HOMA-IR (p = 0,024) para o grupo de teste.

[0269] Como mostrado acima na TABELA 9, não houve nenhuma mudança significativa no peso corporal entre V1 e V3 nos grupos de controle e de teste. Glicose de jejum no plasma não diferiu com o passar do tempo ou entre os grupos. Embora houvesse uma redução de 14 % na insulina de jejum entre V1 e V3 no grupo de teste (isto é com PGX), esta diferença não foi estatisticamente diferente do grupo de controle. O bruto médio e a porcentagem de mudança para contagens de HOMA-IR foram de -0,04 ou -3,6 % para o grupo de controle e -0,21 ou -18,3 % no grupo de teste. A porcentagem de diminuição em HOMA-IR foi significativamente maior no grupo de teste do que o controle (P = 0,03). ANOVA de medições repetidas mostrou um P = 0,067 para o efeito de visita. Quando o gênero foi incluído como uma covariante na análise de medições repetidas, o efeito de visita foi estatisticamente significativo (P = 0,024). Quando analisados separadamente, os homens mostraram diminuições maiores em contagens de HOMA-IR do que as mulheres (P = 0,042) entre V1 e V3. A redução em HOMA-IR foi similar para o controle e teste em participantes masculinos (-0,36 ± 0,20 e -0,31 ± 0,18, respectivamente). Nas mulheres, entretanto,

contagens de HOMA-IR foram aumentadas no grupo de controle ($+0,18 \pm 0,17$) e diminuíram no grupo de teste ($-0,08 \pm 0,19$).

[0270] Não houve nenhuma diferença significativa em níveis de GLP-1 de jejum através das visitas ou entre os grupos (dados não mostrados).

[0271] A FIGURA 10A ilustra graficamente o efeito de controle versus VFC sobre níveis de PYY de jejum em adultos saudáveis para todos os participantes ($n = 54$) em V1 (dia 0), V2 (dia 14) e V3 (dia 21). Valores são média \pm SEM. Como mostrado na FIGURA 10A, a análise de medições repetidas mostrou um efeito estatisticamente significativo de visita ($P = 0,004$) para níveis de PYY de jejum. Quando os resultados mostrados na FIGURA 10A foram estratificados por BMI, aqueles participantes com um BMI < 23 mostraram uma diferença significativa em níveis de PYY como um efeito da visita ($P = 0,03$) e tratamento ($P = 0,037$), como mostrado na FIGURA 10B. A análise de variância mostrou um nível significativamente mais alto de PYY no grupo de teste versus no grupo de controle no final do estudo ($P = 0,043$). É observado que níveis de PYY aumentados são vantajosos, visto que ele é um hormônio anorexigênico que é associado com o consumo de alimento reduzido.

[0272] Como mostrado na FIGURA 10C, ANOVA de medições repetidas mostrou um efeito significativo da visita ($P < 0,001$) para níveis de grelina total de jejum e tratamento ($p = 0,037$). Como mostrado na FIGURA 10C, reduções de $89,7 \pm 20,0$ e $97,7 \pm 26,6$ pmol/l foram observadas nos grupos de controle e de teste tratados com VFC, respectivamente.

[0273] PYY foi negativamente correlacionado com glicose em V2 ($r = -0,27$, $P = 0,046$). Houve também correlações negativas significantes entre grelina e insulina em V1 e V2 ($r = -0,28$, $P = 0,038$ e $r = -0,31$, $P = 0,022$, respectivamente) e entre grelina e HOMA em V1 e V2 ($r = -0,27$, $P = 0,052$ e $r = -0,28$, $P = 0,041$, respectivamente).

SCFA fecal e Lactato:

[0274] Como mostrado abaixo na TABELA 10, concentrações de acetato foram significativamente mais altas com VFC (PGX[®]) versus o grupo de controle ($P = 0,01$). Não houve nenhuma diferença em concentrações de acetato entre os grupos em V1 (valor de referência; $p = 0,286$) ou V2 ($p = 0,096$), mas concentrações foram

significativamente mais altas com VFC (PGX®) do que o grupo de controle em V3 (p = 0,018). Não houve nenhuma diferença de tratamento significativa em concentrações de propionato, butirato, valerato, caproato, ou lactato entre os grupos. A análise de medições repetidas mostrou um efeito de tratamento significativo (P = 0,03) para SCFA total que foi identificado como SCFA total mais alto em V3 em pacientes que consomem VFC (PGX®) versus controle (P = 0,06). Houve um efeito significativo de visita para pH fecal (0,02) com ambos os grupos diminuindo entre V1 e V3.

Correlações com hormônios de saciedade, insulina e glicose

[0275] Os resultados da análise de níveis de grelina, PYY, GLP-1, insulina, glicose, e HOMA-IR no plasma são mostrados acima na TABELA 9. Como mostrado abaixo na TABELA 10, houve uma correlação negativa significativa entre grelina e propionato de jejum em V3 (r = -0,29; P = 0,03). A mudança no propionato entre valor de referência e a visita final foi calculada como V3-V1 e referida como delta propionato. Delta propionato foi negativamente associado com delta insulina (r = -0,26; P = 0,07) e HOMA-IR (r = -0,25; P = 0,07).

[0276] TABELA 10: Concentrações fecais de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) e lactato em pacientes a seguir da suplementação de VFC (PGX®) ou do produto de controle.

	Controle			VFC (PGX®)			valores de P		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3	Visita a	Tratament o	Visita x Tratament o
SCFA (mmol/g de fezes)									
Total	61,	59,	53,	66,	63,	66,	0,78	0,03	0,48
Acetato	1 ±	2 ±	5 ±	8 ±	5 ±	9 ±	0,51	0,01	0,40
Butirato	4,4	5,0	5,2 [†]	4,4	3,6	4,7	0,77	0,26	0,31
Propionat o	35,	33,	30,	39,	38,	39,	0,89	0,85	0,55
	8 ±	2 ±	3 ±	5 ±	7 ±	9 ±			

Valerato	2,4	2,5	2,7*	2,4	2,0	2,8	0,66	0,98	0,20
Caproato	10,	11,	9,5	12,	10,	11,	0,33	0,94	0,60
Lactato	0 ±	1 ±	±	4 ±	7 ±	6 ±	0,05	0,22	0,12
(mmol/g	1,1	1,5	1,2	1,3	0,9	1,0			
de fezes)	11,	10,	10,	10,	10,	11,			
pH	4 ±	8 ±	2 ±	9 ±	7 ±	5 ±	0,02	0,77	0,88
	1,2	1,1	0,4	0,8	0,8	1,0			
	3,1	3,7	3,0	3,4	3,1	3,3			
	±	±	±	±	±	±			
	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3			
	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5			
	8 ±	9 ±	1 ±	5 ±	1 ±	0 ±			
	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1			
	0	1	1	9	8	2			
	0,6	0,7	0,4	0,5	0,4	0,4			
	2 ±	4 ±	6 ±	2 ±	8 ±	6 ±			
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
	9	9	7	9	9	7			
	6,8	6,7	6,4	6,6	6,6	6,4			
	2 ±	1 ±	3 ±	9 ±	8 ±	0 ±			
	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0			
	9	6	5	9	9	8			

[0277] Os valores representam a média ± SEM (n = 27/grupo). O símbolo * representa uma diferença significativa entre controle e VFC (PGX®) na visita 3 (V3). O símbolo † representa uma tendência (p = 0,06) para uma diferença entre controle e VFC (PGX®) na visita 3 (V3).

Debate

Análise de níveis de PYY no plasma

[0278] Os resultados do estudo descrito neste exemplo demonstram que o uso de VFC aumenta níveis de PYY de jejum comparado ao produto de controle e isto é

estatisticamente significativa em participantes com um BMI < 23. As concentrações plasmáticas de PYY são tipicamente reduzidas em seres humanos com sobrepeso e obesos (R.L. Batterham et al., *Nature* 418:650-654 (2002)), e esta secreção prejudicada de PYY pode promover o desenvolvimento de obesidade e/ou impedir a perda de peso.

[0279] Embora os participantes no braço de controle deste estudo observassem uma redução modesta em PYY de jejum durante o curso do estudo de três semanas, os participantes que consomem VFC foram capazes de manter, e no caso daqueles com BMI < 23, de fato aumentam seus níveis de PYY. Foi recentemente mostrado que a fermentação microbiana de prebióticos é associada com um aumento na produção de GLP-1 e PYY em adultos saudáveis (P.D. Cani et al., *Am. J. Clin. Nutr.* (2009)). Em roedores, ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), que são os subprodutos da fermentação microbiana de fibra dietética, foram mostrados estimular diretamente a secreção de PYY (V. Dumoulin et al., *Endocrinology* 139:3780-3786 (1998)). Glucomanano de konjac, um dos materiais de partida de VFC, foi mostrado aumentar as concentrações fecais de acetato, propionato, e butirato em seres humanos (H.L. Chen et al., *J. Am. Coll. Nutr.* 27:102-108 (2008)). A viscosidade da fibra também foi mostrada independentemente afetar o consumo de alimento, e este efeito pode ser mediado por alterações na liberação do hormônio de saciedade.

[0280] Níveis de grelina de jejum foram suprimidos entre a visita 1 (dia 0) e a visita 3 (dia 21) tanto no grupo que consome o produto de teste contendo VFC quanto no grupo que consome o produto de controle. Porque a grelina estimula o consumo de alimento e promove a adiposidade (A.M. Wren et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:5992-5995 (2001); M. Tschop et al., *Nature* 407:908-913 (2000)), compostos que atenuam a elevação progressiva na grelina antes das refeições são atrativos. Embora a maior redução de 8 pmol/l em grelina observada no grupo de VFC versus o grupo de controle não fosse significativamente diferente neste estudo, outros mostraram reduções em grelina de jejum e relacionada à refeição com fibra dietética (ver por exemplo, Parnell e Reimer, 2009). Embora os mecanismos pelos quais os compostos dietéticos suprimem a grelina não sejam bem conhecidos, foi hipotetizado que a taxa

de absorção de nutrientes e a osmolaridade do lúmen intestinal pode desempenhar um papel (Overduin et al., *Endocrinology* 146:845-850 (2005)). Ainda sob este aspecto, é observado que VFC tem uma viscosidade 3 a 5 vezes maior do que qualquer polissacarídeo individual correntemente conhecido, e é portanto provavelmente para alterar a absorção de nutriente ao longo do intestino.

[0281] Neste estudo, não houve nenhuma diferença detectada em níveis de jejum de GLP-1 entre os dois grupos durante o curso das três semanas. Esta carência de mudança em GLP-1 foi observada com outras fibras dietéticas (T.C. Adam e R.S. Westererp-Plantenga, *Br. J. Nutr.* 93:845-851 (2005); K.S. Juntunen et al., *Am. J. Clin. Nutr.* 78:957-964 (2003)).

[0282] Embora as concentrações de glicose e insulina nos pacientes saudáveis que participaram neste estudo estivessem bem dentro de faixas normais, a redução de 14 % em insulina durante o curso do estudo no grupo de teste e a redução maior de 5,3 vezes em contagens de HOMA-IR no grupo de teste versus o grupo de controle podem ser indicativo de melhoras subjacentes na sensibilidade à insulina, o que é compatível com os resultados obtidos nos Exemplos 1 e 3. Em resumo, este estudo demonstra que VFC (PGX[®]) aumenta níveis de jejum de PYY, um peptídeo intestinal envolvido em reduzir o consumo de alimento, em participantes saudáveis.

Análise de níveis de SCFA fecais

[0283] Como descrito supra, fibras dietéticas fermentáveis mostraram reduzir o consumo de energia e aumentar a secreção de hormônios intestinais anorexigênicos. A geração de SCFA a partir da fermentação microbiana de fibras dietéticas no intestino distal é considerada desempenhar um papel nesta regulação. Recentemente, Cani et al., *Am J. Clin Nutr* 90:1236-1243 (2009) demonstraram uma correlação significativa entre a excreção de hidrogênio na respiração (medida da fermentação microbiana intestinal) e GLP-1 de plasma, um hormônio insulínico potente que também reduz o consumo de alimento. O presente estudo constrói sobre estes dados demonstrando-se um aumento significativo em concentrações fecais de SCFA total, e especificamente acetato, em pacientes que consomem até 10 g/d do novo complexo de fibra funcional, PGX[®].

[0284] Acetato, propionato, e butirato são o SCFA principal produzido no intestino distal. Os receptores de ácido graxo livre (FFAR) que percebem SCFA no intestino recentemente foram identificados como FFAR2 (também conhecido como GPR43) e FFAR3 (também conhecido como GPR41). Ver Ichimura A. et al., *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 89:82-88 (2009). FFAR2 é expressado em células enteroendócrinas que expressam PYY, que é compatível com dados que mostram que SCFA estimula a liberação de PYY (Ichimura et al., 2009). In vitro, acetato e propionato mostraram inibir a lipólise em adipócitos de 3T3-L1 por intermédio de ativação de FFAR2 e suprimir ácidos graxos livres no plasma (FFA) in vivo em camundongos. Ver Ge H et al., *Endocrinology* 149:4519-4526 (2008). FFA elevado foi associado com resistência à insulina e dislipidemia. Também houve evidência sugerindo que propionato oralmente administrado aumenta a leptina em camundongos por intermédio de FFAR3 (Ichimura et al., 2009). Dado que a leptina age centralmente para reduzir o consumo de alimento, é possível que SCFA produzido por fermentação microbiana de fibras dietéticas regulem o metabolismo do hospedeiro em parte através de FFAR2 e FFAR3.

[0285] Os resultados deste estudo demonstram um aumento significativo em acetato e SCFA total no final de três semanas de suplementação de VFC (PGX®). Embora não houvesse nenhuma mudança em peso corporal em nossos pacientes durante as três semanas de suplementação, é possível que o consumo da fibra de PGX® na dose final testada (10 g/d) pode diminuir a massa de gordura corporal como foi mostrado com outras fibras solúveis tais como oligofrutose durante um período de três meses. (Parnell J.A. et al., *Am J Clin Nutr* 89:1751-1759 (2009). A correlação negativa entre propionato e grelina ajusta-se com a redução global no consumo de alimento associado com fibras dietéticas, particularmente aquelas com viscosidade alta tal como VFC (PGX®). A correlação negativa com insulina e HOMA-IR é compatível com a capacidade desta fibra funcional para melhorar a saúde metabólica global e reduzir a resistência à insulina.

[0286] Em conclusão, os resultados deste exemplo mostram um aumento em acetato fecal em pacientes que consomem uma dose moderada do VFC (PGX®) de

fibra altamente viscosa e solúvel, durante um período de tempo de 3 semanas. O SCFA, propionato, foi negativamente correlacionado com grelina de jejum, insulina e HOMA-IR. Este é o primeiro relato para nosso conhecimento que mostra um aumento em concentrações de SCFA fecais com VFC (PGX[®]) que sugerem que sua fermentação no cólon pode provocar uma cascata de efeitos fisiológicos, potencialmente mediados por intermédio de FFAR2 e FFAR3.

EXEMPLO 5

[0287] Este Exemplo descreve a análise da estrutura primária de complexo de fibra viscosa granulada (VFC) (konjac/xantana/alginato (70:13:17) (isto é, a combinação de fibra foi processada por granulação para formar um complexo, comercialmente conhecido como PGX[®]).

Análise racional:

[0288] Polissacarídeos são polímeros de ocorrência natural compostos de açúcares (monossacarídeos) ligados através de seus grupos hidroxila glicosídicos. Eles podem ser ramificados ou lineares e podem ter pesos moleculares muito altos variando de vários milhares de Daltons a mais do que dois milhões. A estrutura primária de VFC granulada (70 % de konjac-manano, 17 % de goma xantana, 13 % de alginato de sódio) foi determinada usando análise de metilação, hidrólise e cromatografia e hidrólise e espectroscopia de RMN.

[0289] Glucomanano de konjac é um (1,4)- β -D-glucomanano parcialmente acetilado obtido dos tubérculos de *Amorphophallus konjac* ou raiz de Konnyaku (Bewley et al., 1985, *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*, Academic Press, Nova Iorque, pp. 289-304).

[0290] Goma xantana é um polissacarídeo microbiano produzido por *Xanthomonas campestris*. Ele tem propriedades reológicas e de formação de gel únicas. A estrutura de xantana é fundamentada em uma cadeia principal celulósica de unidades de glicose β -(1,4)-ligadas, que têm uma cadeia lateral de trissacarídeo de manose-ácido glicurônico-manose ligado a cada unidade de glicose secundária na cadeia principal. Algumas unidades de manose terminais são piruviladas, e algumas das unidades de manose internas são acetiladas (Andrew T. R., ACS Symposium

Series N° 45 (1977)).

[0291] Alginato de sódio é um sal de sódio de um polissacarídeo obtido das algas pardas (por exemplo *Laminaria hyperborea*, *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*). A estrutura química consiste em blocos de ácido (1,4) ligado- β -D-polimanurônico (poli M), ácido (1,4) ligado- α -L-poliglicurônico (poli G) e blocos alternados dos dois ácidos urônicos (poli MG). Grasdalen, H., et al., *Carbohydr Res* 89:179-191 (1981). Alginatos formam géis fortes com cátions metálicos bivalentes e o modelo de 'caixa de ovo' foi usado para descrever esta forma de gelificação. Ver Grant, G.T., et al., *FEBS Lett* 32:195-198 (1973).

Métodos:

[0292] Todos os polissacarídeos usados neste Exemplo foram fornecidos pela InovoBiologic Inc (Calgary, Alberta, Canadá). Polissacarídeos únicos foram: glucomanano de konjac (lotes n^{os} 2538 e 2681); goma xantana (lote n^{os} 2504 e 2505); e alginato de sódio (lote n^{os} 2455, 2638, e 2639). VFC granulado (PGX, lotes n^{os} 900495 e 2029070523) foi produzido combinando-se 70 % de konjac-manano, 17 % de goma xantana, e 13 % de alginato de sódio), adicionando 30 % a 60 % (p/p) de água à VFB e depois secando-se a água adicionada aplicando-se calor. Amostras da mesma mistura ternária (VFB não processada) foram tomadas antes do processamento (por exemplo, granulação), que são referidas como mistura ternária #1 (TM1, lotes n^{os} 900285, 900416, e 1112050809).

1. Análise de metilação

[0293] Análise racional: Análise de GCMS de acetados de alditol parcialmente metilados foi usada para revelar os componentes de monossacarídeo de polissacarídeos e suas posições de ligação (H. Björndal et al., *Carbohydrate Research* 5:433-40 (1967)). Portanto, a análise de metilação pode revelar novos e inesperados açúcares e posições de ligação que foram criados pelo processo de adicionar os três polissacarídeos (konjac-manano, goma xantana, e alginato) juntos e processá-los através de tratamento térmico e do processo de granulação. Entretanto, a análise de metilação não mostra como os açúcares são ligados entre si (α ou β). Análise de metilação é conhecido para ser insatisfatório para a análise de ácidos urônicos (por

exemplo, alginato de sódio), que não metilam e são resistentes à hidrólise (Percival et al., *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*, Academic Press 101 (1967)). Porque alginato de sódio é composto inteiramente de ácidos urônicos (ácidos manurônicos e glicurônicos), métodos adicionais foram necessários para analisar VFC, que envolveram a hidrólise e análise dos açúcares neutros e ácidos urônicos resultantes pela cromatografia de troca de ânion de alto desempenho com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) e espectroscopia de ¹H RMN, como descrito abaixo.

Métodos:

[0294] As amostras mostradas abaixo na TABELA 11 foram analisadas, que incluem cada componente individual de VFC (manano de konjac, alginato de sódio, goma xantana), VFB não granulada (referida como "mistura ternária #1" ou "TM1") e VFC granulada (referido como PGX[®]). Quantidades ponderadas de polissacarídeos únicos e misturas ternárias foram tomadas, e algumas gotas de sulfóxido de dimetila foram adicionadas a 450 µg de cada amostra. As amostras foram permetiladas usando hidróxido de sódio (NaOH/iodeto de metila (MeI)), as amostras foram agitadas depois sonificadas por um total de quatro vezes durante um período de duas horas. As amostras foram purificadas por extração com clorofórmio depois hidrolisadas com ácido trifluoroacético 2 M (TFA) por duas horas a 120 °C e reduzidas com borodeuteride de sódio (NaBD₄) em NH₄OH 2 M por duas horas na temperatura ambiente. O borato produzido na decomposição do borodeuteride foi removido por três adições de uma mistura de metanol em ácido acético glacial (90:10) seguido por liofilização. As amostras depois foram acetiladas usando anidrido acético (1 hora a 100 °C). As amostras acetiladas foram purificadas por extração em clorofórmio.

Resultados da Análise de Metilação:

[0295] TABELA 11: Tempos de retenção (em minutos) de PMAAs correspondendo aos açúcares e ligações em vários lotes de amostra identificados por GCMS (tr = traço, nd = não detectado)

Amostra	Lote N°	Manose ou Glicose Terminal	Manose 2-Ligada	Manose 4-Ligada	Glicose 4- Ligada	Hexose 3, 4- ligada
manano de konjac	2538	12,52	nd	13,78	13,86	nd
alginato de sódio	2455	nd	nd	13,78	nd	nd
goma xantana	2504	12,54	13,68	nd	13,85	14,65
VFB não granulada (TM1)	900285	nd	traço (13,65)	13,77	13,85	14,65
VFB não granulada (TM1)	1112050809	12,47	traço (13,62)	13,74	13,83	traço (14,63)
VFC granulado (PGX®)	2029070523	12,51	traço (13,66)	13,78	13,86	14,65
VFC granulado (PGX®)	2029070523	12,48	nd	13,74	13,83	traço (14,62)

[0296] "TM1": mistura ternária #1

[0297] A Tabela 11 fornece um resumo dos resultados observados em cromatogramas de íon reconstruídos (não mostrados) da análise da ligação realizada em acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAAs) derivados das sete amostras. Como mostrado na Tabela 11, a amostra de alginato de sódio apenas forneceu um sinal fraco para glicose 4-ligada. Uma comparação dos sinais observados em cada amostra de polissacarídeo mostra que componentes encontrados no pó de manano de konjac foram compatíveis com a estrutura relatada, isto é, glicose e manose ligadas através da posição 4 com cadeias laterais terminais curtas. A amostra de goma

xantana forneceu um sinal fraco para manose 2-ligada além de sinais fortes para manose terminal e/ou glicose terminal e glicose 4-ligada. Um sinal eluindo em 14,65 minutos forneceu um padrão de fragmentação compatível com uma hexose ramificada 3, 4-ligada. Todos os sinais de goma xantana são compatíveis com a estrutura relatada. Os sinais presentes em cerca de 14,65 minutos na goma xantana e todas as amostras de VFB e VFC são compatíveis com o ponto de ramificação de hexose 3, 4-ligada observado na amostra de goma xantana.

[0298] Em resumo, o perfil global de sinais designáveis nas amostras contém componentes compatíveis com manano de konjac, e eles também contém componentes que podem ser designados a goma xantana (o ponto de ramificação). Estes resultados de metilação são compatíveis com as conclusões seguintes. Primeiro, tanto a VFB não granulada (TM1) quanto o VFC granulado (PGX®) contém tanto manano de konjac (manose 4-ligada) quanto goma xantana (glicose ramificada 3, 4-ligada). Os outros açúcares metilados no espectro podem emanar de qualquer um destes biopolímeros. Segundo, outros biopolímeros comuns são ausentes (por exemplo, nenhuma evidência para galactomananos, carragenina, ou semelhantes), glicose 6-ligada (amidos), etc. Terceiro, não existe nenhuma evidência destes resultados de que novas estruturas semelhantes a açúcar foram formadas (por exemplo, nenhuma massa compatível com outros açúcares, tanto VFC granulado quanto VFB não granulada têm espectros de massa similares). Quarto, esta análise não é capaz de identificar o componente de alginato de sódio devido ao fato de que ácidos urônicos nativos não metilam (Percival et al., *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*, Academic Press 101 (1967)). A análise de alginato de sódio é tratada usando hidrólise e cromatografia e hidrólise e espectroscopia de RMN, como descrito abaixo.

2. Hidrólise e Análise de GCMS

Análise racional:

[0299] Goma xantana e alginato de sódio ambos contêm ácidos urônicos, isto é, glicurônico (goma xantana) e manurônico e gulurônico (alginato de sódio). Estas características estruturais são difíceis para identificar devido à resistência hidrolítica

extrema de ácidos urônicos em polissacarídeos causada pelo grupo carboxila de remoção de elétron, que torna-se muito difícil obter o primeiro estágio em hidrólise catalisada por ácido, isto é, protonação do átomo de oxigênio glicosídico (Percival et al., Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides, Academic Press 104 (1967)). Isto tem o efeito de tornar estes polissacarídeos muito estáveis para atacar. Métodos de hidrólise de alginato de sódio na literatura mais antiga descreve o tratamento com 90 % de H₂SO₄ por várias horas seguido por ebulição por 24 horas depois da diluição (Fischer et al., Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 302:186 (1955)). Mais recentemente, entretanto, um ácido volátil forte, ácido trifluoroacético (TFA) foi usado e descoberto hidrolisar as ligações muito resistentes em poliuronides com a vantagem adicionada de volatilidade para facilidade de remoção (L. Hough et al., Carbohydrate Research 21:9 (1972)).

[0300] Este Exemplo descreve um novo método analítico que foi desenvolvido para a hidrólise de VFB e VFC (também referida como "VFB/C") e a caracterização de todos os produtos da hidrólise (glicose, manose, ácido glicorônico, ácido manurônico, e ácido glicurônico) através do uso de Cromatografia e uso opcional de RMN.

Métodos:

[0301] Análise de GCMS: Os acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAAs) foram separados e identificados por Cromatografia gasosa-Espectroscopia de massa (GCMS). A separação de GC foi realizada com uma coluna DB5, injeção em coluna a 45 °C e um programa de temperatura de 1 min a 40 °C, depois 25 °C/min até 100 °C, depois 8 °C/min a 290 °C, e finalmente mantendo a 290 °C por 5 minutos. A identificação de MS foi realizada com uma voltagem de ionização de 70 eV em modo de varredura em uma faixa de massa de 50 a 620 Daltons com resolução unitária.

[0302] Condições de hidrólise parcial: Hidrólise: As condições foram planejadas para hidrólise do ácido trifluoroacético (TFA) de VFB/C que hidrolisaria os polissacarídeos tão completamente quanto possível sem atacar os açúcares a um tal grau que os resultados seriam mascarados por produtos de degradação indesejados.

[0303] A hidrólise de TFA foi realizada em amostras de 30 mg mostradas na TABELA 11 que foram colocadas em tubos selados com TFA 2 M e aquecidas até 100

°C por 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, e 72 h. As amostras foram removidas do calor nos tempos estabelecidos, o TFA foi evaporado no secador por congelamento e a amostra foi examinada por Cromatografia de camada fina (TLC) (solvente: butanol:etanol:água, 5:3:2) em placas de gel de sílica (gel de sílica de TLC Merck a 60 °F (15,5 °C)). Manchas foram visualizadas usando ácido sulfúrico (5 %) em metanol. Foi determinado que as melhores condições para hidrolisar os polissacarídeos em VFB/C tão completamente quanto possível nos açúcares constituintes sem atacar os açúcares a um tal grau que os resultados sejam mascarados pelos produtos de degradação indesejados foi a incubação de TFA 2 M por 72 h a 100 °C, filtrados, secos por congelamento x2. Os resultados são resumidos na TABELA 12.

Resultados da análise de hidrólise:

[0304] TABELA 12: Resultados da hidrólise de TFA

Amostra	lote nº	Resultados do hidrolisado de TFA
konjac-manano	2538	mistura de glicose e manose
alginato de sódio	2638	mistura dos ácidos manurônico e gularônico
goma xantana	2504	glicose, manose, ácido glicurônico
grânulos de VFC (konjac/xantana/alginato (70:13:17))	PGX® lote nº 2029070523	glicose, manose e ácidos urônicos

Cromatografia:

[0305] Tendo estabelecido condições de hidrólise que liberam os açúcares constituintes dos três polissacarídeos, um método cromatográfico foi desenvolvido que é capaz de separar ambos os açúcares neutros (glicose, manose) dos ácidos urônicos (ácido glicurônico, ácido manurônico, e ácido gularônico).

[0306] Cromatografia de ácido Dionex é um método cromatográfico que foi usado extensivamente em açúcares e compostos relacionados. Este método de detecção é muito mais sensível quando comparado a muitos dos métodos que foram empregados no passado tal como o Índice Refrativo.

Métodos:

[0307] Equipamento: Sistema IC de bomba dupla Dionex ICS-3000, detector eletroquímico, sistema de dados Chromeleon.

[0308] Materiais: Água (desionizada e filtrada), hidróxido de sódio (solução a 50 %, Grau Eletroquímico de HPLC), acetato de sódio, anidro ($\geq 99,5$ %).

[0309] TABELA 13: Condições cromatográficas:

Aparelho	sistema de cromatografia líquida Dionex adaptado com detector de PAD		
Coluna	Dionex CarboPac PA1 (250 x 4 mm) Dionex CarboPac PA1 Guard (50 x 4 mm)		
Eluente	A: água B: 500 mM de acetato de sódio em 100 mM de NaOH C: 100 mM de NaOH		
Gradiente	Tempo	% de B	% de C
	0	0	15,5
	20	0	15,5
	21	50	0
	32	50	0
	32,5	0	100
	42	0	100
	42,5	0	15,5
	52	0	15,5
Taxa de fluxo	1 ml/min		
Volume de injeção	10 μ l		
Temperatura da Coluna	30 °C		

Tempo de execução	52 min
-------------------	--------

Preparação das Amostras: (concentração ~0,02 mg/ml)

[0310] Soluções da amostra foram preparadas em concentrações de aproximadamente 0,02 mg/ml a partir de uma concentração inicial em D2O de 30 mg/ml (amostras de RMN). Alíquotas (15 µl) de hidrolisado e soluções padrão foram dissolvidas em água desionizada (30 mg/ml) e diluídas a 0,0225 mg/ml com água desionizada para a análise. Soluções padrão de cada um dos componentes de hidrolisado esperados dos três polissacarídeos: glicose e manose (de glucomanano de konjac e goma xantana), ácido glicurônico (de goma xantana) e ácidos manurônico e gulurônico (de alginato de sódio) foram similarmente preparados.

[0311] As amostras foram injetadas em uma coluna Dionex CarboPac PA1 (250 x 4 mm) com coluna de guarda (50 x 4 mm) a 30 °C. A coluna foi eluída com um gradiente de solvente formado com A: água desionizada; B: 50 mM de acetato de sódio (anidro ≥ 99,5 %) em 100 mM de NaOH (grau eletroquímico de HPLC) e C: 100 mM de NaOH em uma taxa de fluxo de 1 ml min⁻¹, como mostrado na TABELA 13.

Resultados da análise cromatográfica:

[0312] A TABELA 14 mostra os resultados da Cromatografia de Íon Dionex de hidrolisados das várias amostras de fibra.

[0313] TABELA 14: Resultados de Cromatografia de Íon Dionex de Hidrolisados

Amostra	Tempo de retenção (minutos)/ altura (nC)/Área rel (%)
Padrões:	
glicose	13,98 min/175,56 nC/99,95 %
manose	15,22 min/56,23 nC/99,61 %
ácido glicurônico	25,58 min/214,36 nC/94,79 %
ácido manurônico	25,75 min/327,64 nC/97,95 %
ácido gulurônico*	25,13*
Amostras de teste (hidrolisados)	
manano de konjac (Lote#:	13,98 min/45,26 nC/41,05 % (glicose)

Amostra	Tempo de retenção (minutos)/ altura (nC)/Área rel (%)
2538)	15,22 min/57,94 nC/57,27 % (manose)
goma xantana (Lote#: 2504)	13,98 min/6,49 nC/46,99 % (glicose) 15,22 min/3,99 nC/29,93 % (manose) 25,58 min/2,73 nC/4,87 % (ácido glicorônico)
alginato de sódio (Lote#: 2638)	13,95 min/0,428 nC/3,89 % (glicose) 15,23 min/0,275 nC/1,90 % (manose) 25,13 min/7,06 nC/14,95 % (ácido gulurônico) 25,75 min/35,03 nC/75,37 % (ácido manurônico)
VFB não granulada (TM1) Lote #900416	13,98 min/15,79 nC/40,94 % (glicose) 15,20 min/18,76 nC/52,42 % (manose) 25,58 min/1,44 nC/0,83 % (ácido glicurônico) 25,75 min/3,09 nC/1,96 % (ácido manurônico)
VFC granulado (PGX®) Lote # 900495	13,98 min/15,70 nC/40,62 % (glicose) 15,20 min/18,76 nC/52,50 % (manose) 25,58 min/1,42 nC/0,82 % (ácido glicurônico) 25,75 min/3,15 nC/2,03 % (ácido manurônico)

[0314] *o uso de ácido gulurônico como um padrão foi determinado a partir da hidrólise de alginato de sódio (supondo que o segundo pico significante fosse ácido gulurônico).

[0315] TABELA 15: Biopolímeros comerciais e seus componentes de monossacarídeo

Nome do biopolímero comercial	Perfil do açúcar
Amido	glicose
carragenina	galactose
alginato de sódio	ácido manurônico, ácido gulurônico
LBG/goma guar	galactose, manose
glucomanano de konjac	glicose, manose

Nome do biopolímero comercial	Perfil do açúcar
Manano de jarina	manose
goma xantana	glicose, manose, ácido glicurônico
Arabinogalactano de lariço	arabinose, galactose
Éteres de celulose	glicose
Gomas acácia (Arábica, etc)	mistura complexa
VFC (PGX®)	glicose, manose, ácido glicurônico, ácido manurônico

[0316] Como mostrado na TABELA 14, os resultados da Análise de GCMS indicam que os açúcares constituintes e ácidos de açúcar foram bem separados em uma rodada de 35 minutos. Como mostrado ainda na TABELA 14, a hidrólise de TFA de VFB/C fornece um perfil único em que quatro dos monossacarídeos possíveis, isto é, glicose, manose, ácido glicurônico, e ácido manurônico, foram claramente observados nos traços de Dionex. Estes resultados são compatíveis com a composição de VFB/C compreendendo glucomanano de konjac (manose, glicose), goma xantana (glicose, manose, ácido glicurônico), e alginato de sódio (ácido manurônico e ácido gulurônico).

[0317] A TABELA 15 mostra os componentes de monossacarídeo de vários biopolímeros comerciais, mostrando que VFC (PGX®) tem um perfil único de componentes de monossacarídeo. Portanto, estes resultados demonstram que uma hidrólise de TFA e separação de GCMS podem ser usadas para distinguir VFC de outras combinações de monossacarídeos.

[0318] Em resumo, a Análise de GCMS dos PMAAs de glucomanano de konjac e goma xantana demonstrou a presença dos açúcares e ligações característicos esperados de suas estruturas primárias conhecidas. Glucomanano de konjac forneceu picos de GC correspondendo à glicose 4-ligada, manose 4-ligada, e glicose e/ou manose terminais (principalmente de cadeias laterais). A goma xantana forneceu picos fortes correspondendo à manose e/ou glicose terminais (de cadeias laterais) e

glicose 4-ligada (na cadeia principal), mais um pico para hexose 3, 4-ligada (glicose) e um pico fraco para manose 2-ligada (ambas de cadeias laterais). Virtualmente todos estes picos também foram detectados na Análise de GCMS dos PMAAs de TM1 e VFC granulado (PGX[®]), como mostrado na TABELA 11, mostrando que eles igualmente contêm glucomanano de konjac e goma xantana. O pico traço eluindo na posição de manose 2-ligada do componente de goma xantana foi muito fraco para designar categoricamente a partir do espectro de massa, mas os sinais nos tempos de retenção de cerca de 12,47 e 14,65 minutos foram compatíveis com a manose terminal e a hexose 3, 4-ligada (glicose), respectivamente, de goma xantana. Importaneamente, estas análises não revelaram quaisquer açúcares ou ligações de açúcar inesperados adicionais em TM1 ou VFC granulado (PGX[®]) que poderiam ter emanado de outros biopolímeros constituintes, ou de quaisquer novos açúcares ou ligações de açúcar que poderiam possivelmente ter se formado durante o processamento. Como esperado, a Análise de GCMS dos PMAAs de TM1 e VFC granulado não foi capaz de identificar componentes de alginato de sódio.

[0319] Quanto à análise de HPAEC-PAD, a TABELA 14 mostra os tempos de retenção medidos dos padrões compreendendo os componentes de hidrolisado esperados de TM1 e VFC granulado junto com um resumo dos cromatogramas obtidos para os hidrolisados de TM1 e VFC granulado. Como mostrado na TABELA 14, quatro dos componentes possíveis (glicose, manose, ácido glicurônico e ácido manurônico) foram detectados em hidrolisados de TM1 e VFC granulado. O quinto componente, ácido gulurônico, não foi detectado nesta análise, provavelmente devido ao teor de alginato de sódio relativamente baixo das misturas. Nenhum componente de hidrolisado inesperado foi detectado. Estes resultados foram compatíveis com os resultados obtidos da Análise de GCMS de PMAAs, sustentando a conclusão de que TM1 e VFC granulado contêm glucomanano de konjac e goma xantana quimicamente inalterados. Além disso, a detecção de ácido manurônico nos hidrolisados sugere a presença adicional de alginato de sódio quimicamente inalterado.

3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de polímeros intactos e parcialmente hidrolisados, e padrões monoméricos

Análise racional:

[0320] A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta valiosa para a análise de moléculas orgânicas, visto que os espectros contêm uma vasta quantidade de informação sobre sua estrutura primária através do local dos prótons (átomos de hidrogênio) na molécula. Assim, em um nível básico, a energia dos espectros de ^1H RMN é para fornecer níveis adequados de informação estrutural primária que pode 'identificar' vários aspectos usando regras bem estabelecidas nas substituições químicas e integrais dos compostos padrão e desconhecidas nas misturas de interesse. Os carboidratos têm vários aspectos característicos na RMN que os tornam úteis para análise. Os dois principais aspectos característicos dos espectros de RMN de carboidratos são (i) as assim chamadas ressonâncias "anoméricas", que são prótons associados com C1 no anel de açúcar, e que tipicamente ocorrem em um campo inferior do que o outro aspecto principal; (ii) que é o "envelope do anel" de prótons associados com o restante do anel de açúcar. Por exemplo, para a glicose, as ressonâncias alfa e beta anoméricas estão em 5,2 e 4,6 ppm, respectivamente, e o envelope protônico do anel está entre 3,1 e 3,9 ppm, respectivamente.

[0321] Interessantemente, os ácidos urônicos têm espectros de RMN que são um pouco diferentes do que o espectro de hexose típico descrito acima, e suas ressonâncias são preferivelmente agrupadas no campo levemente mais alto do que aqueles para glicose e manose (3,9 a 5,6 ppm). Santi et al., 12th Int. Electronic Conf on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-12):1-30 (2008). Portanto, os espectros de RMN dos hidrolisados dos polissacarídeos de interesse (por exemplo, VFB/C) podem ser usados para determinar a identidade digital das unidades estruturais (glicose, manose, ácido urônico, etc.) nos polímeros.

[0322] No estudo descrito neste exemplo, os espectros de RMN foram usados para identificar as misturas complexas que resultam da hidrólise dos vários polissacarídeos e VFB. É observado que polissacarídeos integrais não podem ser examinados na RMN no nível de polímero devido a problemas com características físicas tais como viscosidade.

Métodos:

[0323] Amostras de polissacarídeos únicos e misturas ternárias foram parcialmente hidrolisadas com TFA 2 M a 100 °C por quatro horas e 24 horas. Amostras de hidrolisado filtradas (30 mg) foram dissolvidas em D₂O (1 ml) e secas por congelamento antes de redissolver em D₂O e colocar em tubos de RMN. Soluções padrão dos dois monossacarídeos e três ácidos urônicos esperados foram similarmente preparadas.

[0324] Espectros de RMN foram adquiridos em soluções de hidrolisado e padrão em 298,1 K com um espectrômetro Bruker 400 MHz Advance III com uma sonda multinuclear de faixa ampla de auto-tune e software Bruker Topspin em andamento acessório de temperatura variável. 16 varreduras foram conduzidas na maioria das amostras exceto para a amostra de ácido gulurônico que foi fornecida com 256 varreduras.

Resultados da análise de RMN:

[0325] Os espectros de ¹H RMN para os padrões de monossacarídeo e ácido urônico foram bem resolvidos, e suas substituições químicas características foram encontradas tanto nos hidrolisados de goma xantana e alginato de sódio, quanto no hidrolisado de VFC (PGX[®]) (dados não mostrados). As substituições químicas observadas para glicose e manose a partir de goma xantana podem ser resolvidas em ressonâncias anoméricas (4,6 a 5,2 ppm) e em ressonâncias de anel de açúcar (3 a 4 ppm). As substituições químicas observadas para os ácidos manurônico e gulurônico a partir de alginato de sódio foram muito próximas (entre 3,6 e 5,2 ppm). As ressonâncias ácido urônico encontradas em hidrolisados de VFC granulado (PGX[®]) foram claramente uma combinação daquelas encontradas em hidrolisados de goma xantana e alginato de sódio, suportando ainda a presença de alginato de sódio quimicamente inalterado em VFC granulado (PGX[®]).

[0326] Em resumo, os espectros de RMN de padrões puros, hidrolisados constituintes, e hidrolisados de VFC demonstram que VFC (PGX[®]) é composto de polissacarídeos inalterados em características estruturais primárias de componentes de monossacarídeo com ligações glicosídicas inalteradas.

Conclusões globais:

[0327] Os resultados descritos neste exemplo demonstram que a estrutura química primária de VFC granulado (PGX[®]) foi essencialmente inalterada quando comparada à VFB não processada/não granulada, pré-formulada (TM1). Como descrito neste exemplo, foi mostrado pelo método clássico de metilação que os componentes de glucomanano de konjac e goma xantana continham as unidades e ligações esperadas, e que não houve nenhum componente estrutural adicional inexplicado que poderia ter sido introduzido pela mistura entre si ou processamento dos componentes de VFB/C.

[0328] Porque alginato de sódio, um dos componentes de VFB/C, é resistente à metilação, outros métodos foram empregados para concluir a análise estrutural, incluindo hidrólise parcial, cromatografia e RMN, de modo a fornecer ainda evidência de suporte para a natureza inalterada da estrutura química primária de VFB/C.

[0329] Em resumo, os estudos descritos neste Exemplo sustentam a conclusão de que VFC granulado (PGX[®]) não é modificado quimicamente em suas características primárias pelo processo de granulação.

EXEMPLO 6

[0330] Este exemplo descreve a análise do comportamento de fluxo e propriedades macromoleculares de grânulos de complexo de fibra viscosa granulada (VFC) (konjac/xantana/alginato (70:13:17)), (isto é, a combinação de fibra foi processada por granulação para formar um complexo, comercialmente conhecido como PGX[®]). Os resultados descritos neste Exemplo demonstram que uma interação está ocorrendo entre os componentes de VFC granulada no nível de polímero para estabelecer redes e zonas de junção para formar um novo polissacarídeo com a seguinte nomenclatura: α -D-glucurono- α -D-mano- β -D-mano- β -D-gluco),(α -L-gulurono- β -D-mannurono), β -D-gluco- β -D-manano.

Análise racional:

[0331] Os estudos descritos neste Exemplo foram realizados para investigar se a mistura de VFB/C granulada ternária incluindo manano de konjac, goma xantana, e alginato de sódio contém redes e zonas de junção envolvendo todos os três

componentes, que resultam em propriedades de fluxo de solução que são únicas para VFC processado/granulado quando comparado à VFB não processada/não granulada, ou os componentes individuais manano de konjac, goma xantana, ou alginato de sódio. A presença de interações macromoleculares não covalentes entre os três polissacarídeos em VFC granulado (PGX[®]) na solução foi investigada com as técnicas descritas abaixo. Visto que interações binárias entre glucomanano de konjac e goma xantana foram esperadas a partir dos resultados do estudo descrito no Exemplo 5, outra análise foi realizada para especificamente provar qualquer participação do terceiro polissacarídeo, alginato de sódio, em interações ternárias possíveis.

1. Medições reológicas

[0332] No primeiro estudo, curvas de fluxo foram produzidas em várias concentrações de VFB não processada/não granulada (Mistura Ternária #1, referida como "TM1") e VFC granulado (PGX[®]), e estas foram comparadas com curvas de fluxo para soluções de cada componente único de VFB/C sozinho nas mesmas concentrações para revelar os efeitos sinérgicos no comportamento de fluxo de soluções aquosas de misturas ternárias.

[0333] TABELA 16: Amostras usadas no estudo reológico

Amostra	Lote N°
VFC granulado (PGX [®])	2029070523
VFC granulado (PGX [®])	900495
VFB não granulada (TM1)	1112050809
VFB não granulada (TM1)	900416
Alginato de sódio	2638
Alginato de sódio	2639
Goma xantana	2504
Goma xantana	2505
Glucomanano de konjac	2538
Glucomanano de konjac	2681

Preparação da amostra:

[0334] Polissacarídeos únicos e misturas ternárias foram estudados em solução em água destilada desionizada. Amostras precisamente pesadas foram dispersas em concentrações de 0,1 g, 0,2 g, e 0,5 g em 100 g de água (0,1 %, 0,2 %, e 0,5 %, respectivamente) a 25 °C e deixadas hidratar por duas horas com agitação em que uma quantidade pesada de água foi colocada em um agitador magnético e um turbilhão criado antes das amostras, que pesaram até quatro pontos decimais, foram lentamente vertidas no centro do turbilhão. Depois de duas horas, as soluções foram cisalhadas com um misturador de alta velocidade (misturador de cisalhamento IKA (15K rpm)) por 1 minuto para garantir que todo o material particulado fosse completamente misturado. As amostras depois foram agitadas ainda por 1 hora antes de serem consideradas adequadas para a análise.

Medição da curva de fluxo:

[0335] O comportamento de fluxo da solução foi medido com um Reômetro Bohlin Gemini usando um sistema de medição cilíndrico concêntrico C14 DIN 53019 a $25,0 \pm 0,1$ °C. taxas de cisalhamento no estado estacionário foram medidas em uma série de forças de cisalhamento aplicadas constantes ascendendo de 0,1 Pa a 10 Pa. O comportamento de fluxo foi caracterizado inicialmente usando curvas de fluxo de viscosidade logarítmica versus taxa de cisalhamento logarítmica.

Resultados:

[0336] As FIGURAS 13A, 13B, e 13C ilustram graficamente as curvas de fluxo de glucomanano de konjac, goma xantana, e alginato de sódio, respectivamente, em 0,1 %, 0,2 %, e 0,5 % p/p como medido a 25 °C. As curvas de fluxo para as soluções dos polissacarídeos individuais mostrados nas FIGURAS 13A-C mostram que goma xantana é o agente viscosificante mais potente (FIGURA 13B), seguido por glucomanano de konjac (FIGURA 13A) e finalmente por alginato de sódio (FIGURA 13C). Pouca diferença foi observada no comportamento de fluxo entre as soluções de lotes diferentes do polissacarídeo único de amostra. Soluções de goma xantana também tiveram as regiões de pseudoplasticidade mais extensa através de muitas décadas de taxa de cisalhamento onde os mapas logarítmicos foram lineares.

[0337] As FIGURAS 11A-C ilustram graficamente a comparação de curva de fluxo de VFB não processada/não granulada (TM1) e VFC granulado (PGX[®]) em 0,5 % (p/p) (FIGURA 11A), 0,2 % (p/p) (FIGURA 11B) e 0,1 % (p/p) (FIGURA 11C).

[0338] Os dados mostrados nas FIGURAS 11A-C foram examinados ainda ajustando-se cada curva de fluxo a uma relação de lei da potência entre viscosidade η e taxa de cisalhamento D como segue:

$$\eta = KDn^{-1}$$

[0339] Onde K é o índice de consistência (fornecendo um valor global de espessura) e n é o índice de comportamento de fluxo (indicando o desvio do comportamento Newtoniano) derivado da intercepção e grau de inclinação, respectivamente, de um mapa logarítmico de viscosidade contra taxa de cisalhamento que é linear para um fluido de lei da potência. O valor de K indica a consistência global e n indica o desvio do comportamento Newtoniano ($n = 1$). Um fluido Newtoniano tem um valor de n de 1 e, conforme n diminui abaixo de 1, o fluido torna-se crescentemente pseudoplástico.

[0340] Como mostrado nas FIGURAS 11A-C, todas as amostras de VFB não processada/não granulada (TM1) e VFC granulado (PGX[®]) forneceram curvas de fluxo muito similares em cada concentração, indicando que uma atividade bom baixo teor de água no processamento ou em um envelhecimento anterior da pré-mistura influenciou as propriedades das misturas. É observado que o processamento estava em uma atividade em água global muito mais baixa do que as condições de solução diluída do tratamento térmico. As curvas de fluxo das misturas de VFB/C foram mais próximas àqueles de goma xantana; elas corresponderam à lei da potência e mostraram comportamento pseudoplástico extenso, mas a magnitude das viscosidades e o grau de pseudoplasticidade em cada concentração foram de fato mais altos do que aqueles da goma xantana sozinha. Isto é claramente mostrado pelas diferenças nos valores de K e n da lei da potência entre as soluções das misturas de VFB/C e goma xantana, como mostrado na FIGURA 12A.

[0341] A FIGURA 12A ilustra graficamente a comparação de lei de potência K de VFB não processada/não granulada (TM1), VFC granulado (PGX[®]), e goma xantana.

Como mostrado na FIGURA 12A, as amostras de VFB não processada/não granulada (TM1) e VFB granulada (PGX[®]) forneceram valores de K muito similares em cada concentração, e o valor de K aumentou com a concentração. É observado que valores de K mais altos correspondem a viscosidades maiores, e valores de η mais baixos correspondem a graus maiores de pseudoplasticidade sobre a faixa de concentração.

[0342] A FIGURA 12B ilustra graficamente a comparação de lei de potência η de VFB não processada/não granulada (TM1), VFC granulada (PGX[®]) e goma xantana. Como mostrado na FIGURA 12B, os valores de η também foram similares para todas as amostras de VFC em cada concentração, mas pareceram sugerir a presença possível de um valor de η mínimo, ou máximo no grau de pseudoplasticidade, na região de 0,30 a 0,35 %.

[0343] Com base nas proporções usadas para gerar o VFC granulada (70 % de glucomanano de konjac, 17 % de goma xantana, e 13 % de alginato de sódio), o comportamento de fluxo da mistura seria esperado ser amplamente similar àquele de 100 % de glucomanano de konjac, não assumindo nenhuma interação entre os polissacarídeos. Entretanto, dado que o glucomanano de konjac é o polissacarídeo predominante nas misturas ternárias, e goma xantana e alginato de sódio são ambos componentes menores, o comportamento de fluxo de soluções de VFB não processada/não granulada (TM1) e VFC granulada (PGX[®]) fornece uma indicação clara de uma interação entre os polissacarídeos nestas misturas.

Sumário:

[0344] Comparar as curvas de fluxo do VFC granulada (PGX[®]) mostrado na FIGURA 11 com as curvas de fluxo dos componentes individuais mostrados nas FIGURAS 13A-13C, estes resultados sugerem que uma interação ocorreu entre os polissacarídeos em VFC granulada, dando origem a viscosidades e graus maiores de comportamento pseudoplástico do que seria esperado para a composição ternária particular presente em VFB não processada/não granulada (TM1) ou VFC granulada (PGX[®]). O comportamento de fluxo global das amostras de VFC granulada (PGX[®]) foi mais próximo àquele de goma xantana, mas surpreendentemente, viscosidades de VFC granulada (PGX[®]) foram de fato mais altas do que aquelas de goma xantana

sozinha. Isto é mostrado nas FIGURAS 12A e 12B, que realçam os valores de K mais altos, e abaixo da concentração de aproximadamente 0,45 %, mais baixos os valores de comparação de η para VFC granulado (PGX[®]) quando comparado com goma xantana. Considerando que o teor de goma xantana de VFB não processada/não granulada (TM1) e VFC granulado (PGX[®]) seja apenas 17 %, e os 83 % remanescentes compreendem os viscosificadores menos potentes manano de konjac e alginato de sódio, estes resultados fornecem evidência clara de uma interação que ocorreu entre os polissacarídeos nas amostras de VFC granulado (PGX[®]).

2. O efeito da concentração de alginato de sódio e/ou estudos de tratamento térmico

[0345] Experimentos adicionais foram realizados para determinar o efeito de várias concentrações de alginato de sódio e o efeito de tratamento térmico sobre o comportamento de fluxo e propriedades macromoleculares de VFB/C como segue.

Métodos:

[0346] Misturas de glucomanano de konjac, goma xantana e alginato de sódio foram preparadas. As misturas continham glucomanano de konjac (KM) e goma xantana (XG) em uma razão constante (KM:XG = 4,12:1) e quantidades variáveis de alginato de sódio (A0 a A33) (0 %, 2 %, 5 %, 8 %, 11 %, 13 %, 17 %, 21 %, 24 %, 27 %, 30 %, e 33 %). Todas as amostras foram primeiro preparadas como misturas secas das combinações de fibra de duas vias (glucomanano de konjac e goma xantana) ou três vias (glucomanano de konjac, goma xantana, e alginato). Cada amostra (mistura) foi pesada até quatro pontos decimais (secos), completamente misturada usando um agitador de pulso, e mantida a -19 °C até que fosse necessário. Soluções aquosas de cada composição foram preparadas em uma concentração única de 0,5 % adicionando-se 5,0 g de cada amostra (mistura) a 1 kg de água desionizada com agitação por um agitador magnético (isto é, um turbilhão foi primeiro criado na água desionizada e as amostras foram lentamente vertidas no centro do turbilhão) e deixadas hidratar até homogêneas durante quatro horas. As soluções aquosas das misturas foram mantidas a 5 °C até que todas as amostras fossem preparadas.

Tratamento térmico

[0347] Alíquotas de 20 ml de cada solução depois foram tomadas e tratadas como

segue: (i) incubada na temperatura ambiente (22 °C) (não aquecida), ou (ii) aquecida a 90 °C em um forno com controle termostático (amostras estavam em recipientes selados para evitar perdas devido à evaporação e periodicamente agitadas para garantir a hidratação completa) por uma hora (A0H a A33H) ou quatro horas (A0H4 a A33H4).

[0348] As curvas de fluxo a 25 °C das soluções aquosas das misturas de glucomanano de konjac, goma xantana, e alginato de sódio, contendo glucomanano de konjac (KM) e goma xantana (XG) em uma razão constante (KM:XG = 4,12:1) e quantidades variáveis de alginato de sódio (0 %, 2 %, 5 %, 8 %, 11 %, 13 %, 17 %, 21 %, 24 %, 27 %, 30 %, e 33 %) foram medidas em uma concentração única de 0,5 %. Como descrito acima, as soluções foram não aquecidas, aquecidas por uma hora, ou aquecidas por quatro horas.

Resultados:

[0349] As curvas de fluxo (medidas a 25 °C) para as misturas de duas vias não aquecidas (A = 0), e misturas ternárias são mostradas na FIGURA 14A. As curvas de fluxo (medidas a 25 °C) para as misturas de duas vias e ternárias que foram aquecidas por uma hora são mostradas na FIGURA 14B. As curvas de fluxo (medidas a 25 °C) para as misturas de duas vias e ternárias que foram aquecidas por quatro horas são mostradas na FIGURA 14C.

[0350] Como mostrado na FIGURA 14A, para as misturas não aquecidas, as viscosidades pareceram diminuir com um aumento no teor de alginato de sódio, como seria esperado se os dois viscosificadores mais potentes (KM e XG) estivessem sendo substituídos pelo viscosificador mais fraco alginato de sódio.

[0351] Como mostrado na FIGURA 14B, para as misturas aquecidas por uma hora, as misturas ternárias com um teor de alginato de sódio aumentado mantiveram sua viscosidade a níveis mais altos do que as misturas com a mesma razão de alginato que não foram aquecidas (mostrado na FIGURA 14A). Como mostrado na FIGURA 14C, as viscosidades das misturas que foram aquecidas por 4 horas foram similares às aquelas observadas depois de aquecer por uma hora. Estes resultados indicam que o aquecimento da mistura ternária compreendendo alginato de sódio

resultou em uma interação ternária entre os polissacarídeos.

[0352] As FIGURAS 15A e 15B ilustram a dependência tanto de K quanto de η sobre a proporção de alginato de sódio na mistura para soluções aquosas a 0,5 % de misturas de glucomanano de konjac, goma xantana, e alginato de sódio em uma razão de KM:XG constante (4,12:1) e quantidades variáveis de alginato (0 a 33 %). A FIGURA 15A ilustra graficamente a dependência do valor de K de lei da potência sobre misturas ternárias não aquecidas e aquecidas do teor de alginato. As curvas de fluxo para soluções das misturas ternárias que não foram tratadas com calor corresponderam à lei da potência e principalmente mostraram uma diminuição na viscosidade com aumento no teor de alginato de sódio. Como mostrado na FIGURA 15A, para soluções não aquecidas, o valor de K de lei da potência mostrou um aumento inicial pequeno com o aumento no teor de alginato de sódio, mas isto foi seguido por uma diminuição maior. Pareceu haver um valor de K máximo em cerca de 3 a 5 % de teor de alginato de sódio. Como mostrado na FIGURA 15B, o valor de η aumentou (para o comportamento Newtoniano), com um aumento no teor de alginato de sódio na mistura. Isto indicou uma progressão de uma mistura de glucomanano de konjac e goma xantana binária altamente viscosa e pseudoplástica (sem nenhum alginato de sódio) para uma mistura ternária significativamente menos viscosa e menos pseudoplástica em 33 % de alginato de sódio. Estes resultados indicam que o alginato de sódio estava agindo como um viscosificador mais fraco.

[0353] O declínio em K e o aumento em valores de η acima de cerca de 5 % de alginato de sódio, como mostrado na FIGURA 15A e FIGURA 15B seriam esperados quando os dois viscosificadores mais potentes (glucomanano de konjac e goma xantana) estavam sendo substituídos por um viscosificador mais fraco, menos pseudoplástico (alginato de sódio). Como mostrado na FIGURA 15A, dados similares foram obtidos para soluções aquecidas por uma hora, indicando um declínio inicial no valor de K devido ao tratamento térmico no teor de alginato de sódio abaixo de cerca de 5 %, mas em 11 % e acima, o declínio no valor de K foi muito menos pronunciado do que aquele observado para as soluções não aquecidas. Um máximo no valor de K ocorreu nas soluções tratadas com calor no teor de alginato de sódio levemente mais

alto de 8 % a 11 % nas misturas ternárias. Como mostrado na FIGURA 15B, o valor de η de soluções tratadas com calor permaneceu baixo e inalterado através da faixa de teores de alginato de sódio. Para o número limitado de soluções aquecidas por quatro horas, os valores de K e η foram similares àqueles obtidos para as mesmas soluções aquecidas por apenas uma hora (dados não mostrados).

Resumo dos Resultados:

[0354] Geralmente, estes resultados indicam que o tratamento térmico da solução ternária significativamente aumentou o nível global de interações macromoleculares. Ao contrário da situação durante o processamento onde o comportamento de fluxo antes e depois do processamento foi similar, estas amostras foram tratadas com calor em solução diluída e foram preparadas de componentes recentemente misturados. Visto que o valor de K para soluções de misturas em pó contendo entre 0 % e cerca de 5 % de alginato de sódio de fato declinou depois do tratamento térmico, este nível mais alto de interações foi improvavelmente devido a um realce da interação entre glucomanano de konjac e goma xantana. Preferivelmente, parece que o tratamento térmico realçou a interação de alginato de sódio com um ou ambos do glucomanano de konjac e goma xantana.

[0355] Geralmente, estes dados sugerem que depois do tratamento térmico da mistura, alginato de sódio restaurou e fortaleceu a interação entre glucomanano de konjac e goma xantana, ou tornou-se envolvido por si só em interações com os outros dois polissacarídeos em solução. Portanto, estes resultados sugerem que alginato de sódio pode ser adicionado a glucomanano e goma xantana em níveis acima de 8 % a 20 % em combinação com o tratamento térmico sem significativamente comprometer a reologia da mistura binária.

3. Sedimentação na ultracentrífuga analítica

Análise racional:

[0356] A viscosidade inesperadamente alta de grânulos de VFC (konjac/xantana/alginato (70:13:17)) (isto é, a combinação de fibra foi processada por granulação para formar um complexo, comercialmente conhecido como PGX®), também referido como PolyGlycopleX® (α -D-glicurono- α -D-mano- β -D-mano- β -D-

gluco), (α -L-gulurono- β -D mannurono), β -D-gluco- β -D-manano (PGX[®]), nos levou a investigar as propriedades hidrodinâmicas de misturas de glucomanano de konjac, xantana, e alginato, como manifestado por seu comportamento de velocidade de sedimentação na ultracentrífuga analítica, de modo a procurar por interações no nível molecular que podem fornecer uma base molecular por trás destas observações macroscópicas. Neste estudo, a técnica de velocidade de sedimentação na ultracentrífuga analítica foi usada como a prova para investigar as propriedades de misturas em que glucomanano foi o componente dominante, suplementado por xantana e alginato.

Métodos:

Polissacarídeos

[0357] Todos os polissacarídeos usados no estudo foram fornecidos por InovoBiologic Inc, (Calgary, Alberta, Canadá) isto é: glucomanano de konjac, lote N^o 2538; goma xantana, lote N^o 2504; e alginato de sódio, lote N^o 2455/2639. Os polissacarídeos foram estudados individualmente e como misturas ternárias compreendendo VFC granulado (referido neste estudo como "PGX[®]"), e VFB não granulada (referida neste estudo como "TM1"). Amostras foram dissolvidas em água destilada desionizada e depois dialisadas em soluções de força iônica 0,0001 M, 0,001 M, 0,01 M, 0,1 M, e 0,2 M em tampão de cloreto de fosfato no pH ~6,8. Forças iônicas > 0,05 M foram suplementadas pela adição de NaCl.

Ultracentrifugação analítica

[0358] A técnica de velocidade de sedimentação na ultracentrífuga analítica foi usada como a prova para os estudos de interação. Este método de solução livre tem a vantagem sobre outros métodos visto que ele não precisa de colunas, materiais de membrana, outros meios de separação ou imobilização que poderiam de outro modo interromper ou interferir com os fenômenos de interação (S.E. Harding Analytical Ultracentrifugation Techniques and Methods, pp. 231-252, Cambridge: Royal Society of Chemistry (2005)). Uma ultracentrífuga Beckman XL-I foi usada equipada com óptica de interferência de Rayleigh. Os dados foram capturados usando um sistema de câmera CCD. Varreduras iniciais foram feitas em uma velocidade de rotor baixa de

3000 rpm para monitorar quanto à presença de particulados de peso molecular muito alto (que não foram detectados), antes do ajuste a uma velocidade de rotor de 45000 rpm. Coeficientes de sedimentação s foram corrigidos a condições padrão da densidade e viscosidade de água a 20,0 °C para produzir $s_{20,w}$. Varreduras foram tomadas em intervalos de dois minutos por um tempo de execução de ~12 horas. Os dados foram analisados em termos de distribuições de distribuição de coeficiente de sedimentação $g(s)$ vs. s (ver, por exemplo, S.E. Harding, Carbohydrate Research 34:811-826 (2005)) usando o algoritmo SEDFIT dos "quadrados mínimos $g(s)$ " (Dam & Schuck, Methods in Enzymology 384:185 (2003)) com base no método de análise elementar finito de Claverie et al., Biopolymers 14:1685-1700 (1975). A análise da mudança em distribuições do coeficiente de sedimentação foi usada para verificar a presença de uma interação. Uma concentração de carga total de 2,0 mg/ml ou 0,5 % (0,5 g em 100 g de água) foi empregada para os controles e misturas.

Resultados e Debate

Integridade dos reagentes

[0359] Glucomanano de konjac, xantana, e alginato foram primeiro caracterizados separadamente pela ultracentrífuga analítica para estabelecer sua integridade molecular.

[0360] A FIGURA 16 ilustra graficamente a distribuições de concentração de sedimentação aparente $g^*(s)$ vs. coeficiente de sedimentação (s) para glucomanano (FIGURA 16A), alginato de sódio (FIGURA 16B) e xantana (FIGURA 16C) em uma concentração de carga de 2 mg/ml e em $I = 0,0$. Velocidade de rotor de 45000 rpm, temperatura = 20,0 °C. A ordenada é expressada em unidades de franja por Svedberg (S), e a abscissa é em unidades de Svedberg.

[0361] A FIGURA 17 ilustra graficamente as distribuições de concentração de sedimentação aparente para VFB não processada/não granulada (TM1) em forças iônicas de 0 a 0,2 M (FIGURA 17A); TM1 em forças iônicas de 0 a 0,01 M (FIGURA 17B); VFC granulada (PGX[®]) em forças iônicas de 0 a 0,01 M (FIGURA 17C); e VFC granulada (PGX[®]) em forças iônicas de 0 a 0,2 M (FIGURA 17D). Velocidade de rotor de 45000 rpm, temperatura = 20,0 °C.

[0362] A FIGURA 18 ilustra graficamente o efeito da força iônica (expressada em unidades de concentração molar M) sobre a quantidade de material com um coeficiente de sedimentação $> 3,5S$ para VFB não processada/não granulada (TM1) (FIGURA 18A); ou VFC granulada (PGX[®]) (FIGURA 18B). Para facilitar a escala logarítmica o valor de $I = 0,00$ é reapresentado em $I = 0,00001$ M.

[0363] Mapas unimodais foram observados em todos os casos para as distribuições aparentes do coeficiente de sedimentação (FIGURAS 16A, B, C). Sob estas condições, glucomanano de konjac tem um coeficiente de sedimentação médio ponderado aparente $s_{20,w}$ de $\sim 1,6S$, alginato de $\sim 1,3S$, e xantana de $\sim 3,5S$, onde $1S = 10^{-13}$ s.

Formação do complexo e o efeito do eletrólito adicionado

[0364] Mapas de distribuição de coeficiente de sedimentação depois foram gerados para as seguintes misturas ternárias: VFB não processada/não granulada/não aquecida (TM1) (FIGURAS 17A, B) e VFC granulada/aquecido (PGX[®]) (FIGURAS 17C, D) na mesma concentração de carga total usada nos controles (2 mg/ml), até um máximo de 10S. Como nosso critério para interação, nós estimamos a quantidade de material com coeficientes de sedimentação aparentes maiores do que aquele das espécies de sedimentação mais alta nos controles - xantana: material de sedimentação em $> 3,5S$ é considerado como um produto de interação.

[0365] A Tabela 17 mostra a concentração do material de sedimentação $> 3,5S$. A concentração de carga de célula de ultracentrífuga em cada caso foi 2,0 mg/ml.

[0366] TABELA 17: Concentração do material de sedimentação $> 3,5S$

Amostra	$c > 3,5S$ (unidades de franja)
Glucomanano	0
Alginato	0
Xantana	$0,1 \pm 0,1$
TM1 (VFB não processada/não granulada)	$3,4 \pm 0,1$
PGX [®] (VFC granulada)	$0,8 \pm 0,1$

[0367] A TABELA 17 mostra o aumento claro na concentração de material de

sedimentação tanto para as misturas de TM1 quanto de VFC granulado, em comparação aos componentes individuais, embora exista ainda uma proporção considerável de material não reagido particularmente em coeficientes de sedimentação baixos ($\sim 2S$). A FIGURA 18 e a Tabela 18 também mostram o efeito de um aumento na força iônica sobre a aparência do material de sedimentação mais alta.

[0368] A TABELA 18 mostra os resultados do efeito de força iônica sobre TM1 (VFB não processada/não granulada). A concentração de carga de célula de ultracentrífuga em cada caso foi 2,0 mg/ml.

[0369] TABELA 18: Efeito da força iônica sobre TM1 (VFB não granulada)

Força iônica (M)	c > 3,5S (unidades de franja)
0,0	3,4 ± 0,1
0,0001	3,2 ± 0,1
0,001	3,4 ± 0,1
0,01	0
0,05	0
0,1	0
0,2	0

[0370] A TABELA 19 mostra os resultados do efeito de força iônica sobre PGX[®] (VFC granulado). A concentração de carga de célula de ultracentrífuga em cada caso foi 2,0 mg/ml.

[0371] TABELA 19: Efeito da força iônica sobre PGX[®] (VFB granulada)

Força iônica (M)	c > 3,5S (unidades de franja)
0,0	0,8 ± 0,1
0,0001	2,8 ± 0,1
0,001	2,7 ± 0,1
0,01	0
0,05	0
0,1	0

0,2	0
-----	---

[0372] Pode ser observado que, tanto para misturas granuladas quanto não granuladas, quantidades significantes de material de sedimentação mais alta foram observadas até uma força iônica de 0,01 M acima da qual o aparecimento de tal material foi suprimido (FIGURAS 18A, B). A FIGURA 18A ilustra graficamente o efeito da força iônica (expressada em unidades de concentração molar M) sobre a quantidade de material com um coeficiente de sedimentação > 3,5S para VFB não processada/não granulada (TM1). A FIGURA 18B ilustra graficamente o efeito da força iônica (expressada em unidades de concentração molar M) sobre a quantidade de material com um coeficiente de sedimentação > 3,5S para VFC processado (por exemplo, granulado) (PGX®).

Distribuição dos coeficientes de sedimentação de misturas ternárias

[0373] Distribuições do coeficiente de sedimentação para misturas contendo uma razão de glucomanano:goma xantana fixa e concentrações de alginato variadas (de 0 % a 33 %). As misturas foram não aquecidas (0) ou tratadas com calor por uma hora (H1) ou quatro horas (H4).

[0374] As distribuições do coeficiente de sedimentação foram determinadas a partir das amostras em água destilada desionizada em uma concentração de carga total de 5 mg/ml (0,5 %). Os resultados para as amostras não aquecidas são mostrados na FIGURA 19A. Os resultados para as amostras tratadas com calor são mostrados na FIGURA 19B. Como mostrado na FIGURAS 19A e B, na ausência de alginato, nenhum produto de interação significativa é observado para a mistura binária de glucomanano:xantana dominada por glucomanano para amostras não aquecidas (A0) ou tratadas por uma hora (A0H1) ou quatro horas (A0H4), com uma distribuição do coeficiente de sedimentação essencialmente aquela do controle de glucomanano (ver Abdelhameed et al., Carbohydrate Polymers, 2010). Entretanto, a situação é diferente na presença de alginato. Como mostrado na FIGURA 19A, a mistura ternária não aquecida mostrou alguma interação de um teor de alginato de 13 %, 17 %, 21 %, até 24 %, com base na aparência do material de coeficiente de sedimentação mais

alto, mas nenhum efeito significativo foi observado acima de uma concentração de alginato de 27 %. Para as amostras tratadas com calor, como mostrado na FIGURA 19B, complexos foram observados acima de uma concentração de alginato de cerca de 8 %, compatível com as medições reológicas. É observado que algumas das amostras de teor de alginato mais alto que foram tratadas com calor por uma hora, tal como A21H1 (21 % de mistura de alginato, aquecida por uma hora), A24H1, A27H1, A30H1 e todas as amostras tratadas por quatro horas contendo alginato formaram géis depois do processo de tratamento com calor e não podem ser analisadas pelo método de velocidade de sedimentação. Isto implica na presença de interações nas soluções originais de resistência suficiente para alternar estas no estado de gel. Ao contrário, as interações moleculares nas amostras não aquecidas foram insuficientes para promover um tal fenômeno de gelificação.

Conclusões

[0375] Misturas de glucomanano, xantana, e alginato mostram a presença de produtos de interação que são removidos na adição de quantidades moderadas de eletrólito. Estas observações são compatíveis com uma interação dentro das misturas ternárias que podem ser suprimidas por inclusão de um eletrólito de sustentação além de uma força iônica de 0,01 M. A interação não é estequiométrica, visto que existe uma proporção considerável de material que sedimenta em coeficientes de sedimentação mais baixos ($< 3,5S$, sob as condições que nós estudamos).

4. Tratamento comparativo de VFC e alginato de sódio com cloreto de cálcio

Análise racional:

[0376] VFC granulado (PGX[®]) produz soluções altamente viscosas em água mas não forma géis coesivos. Os resultados descritos acima são compatíveis com a formação de interações complexas dos três componentes (manano de konjac, goma xantana, e alginato) no nível de polímero. De modo a determinar se alginato pode ser separado do VFC, um experimento foi realizado para testar se o alginato pode ser separado de VFC em solução por íons cálcio. Alginatos são conhecidos ter precipitação mediada por cálcio e características de gelificação (K. Clare, "Algin," em Whistler R.L. e BeMiller J.N. Eds., Industrial Gums, Academic Press 116 (1993); A.

Haug et al., Acta Chem. Scand. 19:341-351 (1965)). Soluções puras de alginato de sódio reagem forte e instantaneamente à adição de íons cálcio para formar precipitados ou géis dependendo do modo de adição de cálcio (Clare et al. (1993); Haug et al. (1965)). Assim, em uma reação de gelificação típica, um sal de cálcio insolúvel tal como fosfato de dicálcio anidro é adicionado a uma solução de alginato de sódio seguido por um ácido de liberação lenta tal como glucono deltalactona que faz com que os íons Ca^{++} sejam liberados lentamente para fazer com que um gel homogêneo se forme. Se, entretanto, íons Ca^{++} são adicionados rapidamente, como no caso de cloreto de cálcio, então um precipitado instantâneo ocorre. Os segmentos de poliguluronato da macromolécula de alginato são conhecidos ligar-se mais fortemente com íons Ca^{++} (Kohn et al., Acta Chemica Scandinavica 22:3098-3102 (1968)), mas se estes segmentos tivessem que tornar-se menos acessíveis devido às interações com um ou ambos os outros dois polissacarídeos, a precipitação de alginato de cálcio poderia ser restrita.

Métodos:

[0377] Alíquotas de soluções de VFB não processada (TM1) e VFC processado/granulado (PGX[®]) em água destilada desionizada em 0,5 % (0,5 g em 100 g de água) foram diluídas a 0,1, 0,05, e 0,01 % p/p. Em cada concentração, 5 ml de solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 10 % foram adicionados e completamente misturados na solução para obter uma concentração de íon Ca^{2+} de 0,5 %. A mesma adição de íons Ca^{2+} também foi feita a (1) uma série paralela de soluções de controle de alginato de sódio sozinho contendo as mesmas concentrações de alginato como aquelas das soluções de VFB não processada (TM1) e VFC processado/granulado (PGX[®]); e (2) soluções de misturas binárias de glucomanano de konjac ou goma xantana com alginato de sódio contendo as mesmas concentrações de alginato de sódio (medidas em g em 100 g de água) e as mesmas proporções relativas dos dois polissacarídeos como nas soluções a 0,5 % da VFB não processada (TM1) e VFC processado/granulado (PGX[®]). As soluções foram deixadas repousar por 30 minutos antes da inspeção visual quanto à presença/ausência de um precipitado.

Resultados:

[0378] Os resultados são mostrados abaixo na TABELA 20.

[0379] TABELA 20: Concentrações da amostra e resultados

% de VFC (granulada PGX®) (lote nº 900495)	Precipitação de cálcio (Y/N)	% de Alginato (lote nº 2638)	Precipitação de cálcio (Y/N)
0,5	N	0,075	Y
0,1	N	0,015	Y
0,05	N	0,0075	Y
0,01	N	0,001	N

[0380] Como mostrado nos resultados resumidos na TABELA 20, está claro que na presença de 0,5 % de íons Ca⁺⁺, que precipitará alginato de cálcio abaixo de um nível de pelo menos 0,0075 %, não existe nenhuma indicação de precipitação em soluções de VFC granulado (PGX®) abaixo do nível de alginato equivalente. A descoberta é compatível com os componentes de VFB/C que interagem em solução para formar zonas e redes de junção (isto é, nos níveis secundários e terciários das estruturas de polissacarídeo) que depois impedem os componentes individuais de exibir as propriedades que eles mostrariam em um estado puro. Precipitados de alginato de cálcio foram formados nas soluções de alginato de sódio correspondentes exceto para a solução mais diluída que continha alginato insuficiente para ser precipitado por 0,5 % de íons Ca⁺⁺.

Conclusão:

[0381] Neste estudo do comportamento de alginato em VFC granulado (PGX®) foi demonstrado que nenhuma precipitação ou formação de gel ocorreu quando íons cálcio foram rapidamente introduzidos pela adição de cloreto de cálcio. Em um experimento de controle paralelo, cloreto de cálcio foi adicionado às soluções puras de alginato de sódio de concentração diminuída, que produziu um precipitado instantâneo de alginato de cálcio, mesmo em concentrações de alginato muito baixas. Estes resultados sugerem que os segmentos de poliguluronato da macromolécula de

alginate que normalmente ligam-se fortemente com íons Ca^{++} em solução foram menos disponíveis (ou indisponíveis) para tal interação nas soluções de VFB/C onde alginate de sódio estava na presença de glucomanano de konjac e goma xantana. Isto pode ser devido a estes segmentos da macromolécula sendo menos acessíveis ou não acessíveis a íons Ca^{++} devido a interações alternativas com um ou ambos os outros dois polissacarídeos. Precipitados de alginate de cálcio foram observados quando íons Ca^{++} foram adicionados às soluções binárias de glucomanano de konjac ou goma xantana com alginate de sódio, que sugerem que o alginate de sódio requer a presença de ambos os outros dois polissacarídeos para interagir.

Debate dos resultados globais

[0382] Os resultados da análise estrutura primária de VFB/C descrito no Exemplo 5 mostram que depois da granulação, as estruturas primárias dos polissacarídeos constituintes presentes em VFC granulado permanecem inalteradas, e que nenhuma interação covalente ocorreu antes (TM1) ou depois de um processamento envolvendo entrada de calor (VFC granulado). Entretanto, os resultados da análise de associações macromoleculares descritas neste exemplo revelam que interações não covalentes ocorrem, resultando em um novo complexo de polissacarídeo que é produzido no nível macromolecular em VFB/C. Os estudos reológicos claramente mostram que as viscosidades da solução tanto de VFB não processada/não granulada (TM1) quanto de VFC granulado (PGX[®]) são significativamente mais altas do que seria esperado da combinação dos comportamentos de viscosificação dos polissacarídeos individuais na mistura. As características de fluxo globais de VFC em solução são mais próximas àqueles de goma xantana sozinha, mas a viscosidades de VFC é ainda mais alta do que aquela de goma xantana. Considerando que a forma de realização de VFC testado neste exemplo (70 % de KM, 17 % de xantana, 13 % de alginate de sódio) apenas contém 17 % do viscosificador mais forte, goma xantana, e 83 % dos dois viscosificadores mais fracos, manano de konjac (70 %) e alginate de sódio (13 %), seria esperado que seu comportamento de fluxo em água seria similar àquele de manano de konjac. Entretanto, foi determinado que o comportamento de fluxo da solução de VFC foi de fato mais próximo àquele de goma xantana sozinha, e suas

viscosidades foram ainda mais altas do que a goma xantana.

[0383] Outros estudos do comportamento reológico e de sedimentação de soluções de misturas ternárias contendo teor de alginato variável preparadas no laboratório confirmaram uma interação ternária, e esta foi realçada por tratamento com calor das soluções, particularmente quando o teor de alginato de sódio da mistura foi maior do que cerca de 5 %. Além disso, experimentos de adição de íon Ca^{++} mostraram que a presença tanto dos outros dois polissacarídeos foi necessária para impedir a precipitação de alginato de cálcio.

[0384] Estes resultados demonstram que, em solução, alginato de sódio é integrado com glucomanano de konjac e goma xantana para estabelecer redes e zonas de junção para formar um novo complexo de complexo de polissacarídeo com a seguinte nomenclatura: $\alpha\text{-D-glucurono-}\alpha\text{-D-mano-}\beta\text{-D-mano-}\beta\text{-D-gluco}$), ($\alpha\text{-L-gulurono-}\beta\text{-D-mannurono}$), $\beta\text{-D-gluco-}\beta\text{-D-manano}$.

[0385] Como descrito nos Exemplos 1 a 4, foi determinado que a administração de VFC granulado (PGX[®]) é útil para a prevenção, tratamento, ou melhora de um ou mais sintomas associados com uma doença ou distúrbio metabólicos, tais como síndrome metabólica, diabetes tipo I, diabetes tipo II, doença pancreática, ou hiperlipidemia, em um paciente em necessidade deste.

[0386] Embora formas de realização ilustrativas fossem ilustradas e descritas, será avaliado que várias mudanças podem ser feitas nesta sem divergir do espírito e escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma composição de fibra dietética de polissacarídeo altamente viscosa compreendendo uma combinação de fibra viscosa ou complexo desta, compreendendo de 48% a 90% (p/p) de glucomanano, de 5% a 20% (p/p) de goma xantana, e de 5% a 30% (p/p) de alginato, e macronutriente selecionado do grupo consistindo em proteína, carboidrato, e gordura, caracterizado pelo fato de que a composição de fibra dietética é usada para a fabricação de um alimento medicinal composto para fornecer uma dosagem de 20 g/dia a 35 g/dia da composição de fibra dietética para a prevenção, tratamento, ou melhora de um ou mais sintomas associados com uma doença ou distúrbio metabólicos..

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição de fibra dietética compreende de 60% a 80% (p/p) de glucomanano, de 10% a 20% (p/p) de goma xantana, e de 10% a 20% (p/p) de alginato.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio metabólicos são selecionados do grupo consistindo em síndrome metabólica, diabetes tipo I, diabetes tipo II, doença pancreática, e hiperlipidemia.

4. Uso de uma composição de fibra dietética de polissacarídeo altamente viscosa compreendendo uma combinação de fibra ou complexo desta, compreendendo de 48% a 90% (p/p) de glucomanano, de 5% a 20% (p/p) de goma xantana, e de 5% a 30% (p/p) de alginato, caracterizado pelo fato de que a composição de fibra dietética é usada para a fabricação de um medicamento composto para fornecer uma dose de 20 g/dia a 35 g/dia da composição de fibra dietética de polissacarídeo altamente viscosa para prevenir, tratar, ou melhorar um ou mais sintomas associados com uma doença ou distúrbio metabólicos em um indivíduo humano.

5. Uso de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio metabólicos são selecionados do grupo consistindo em síndrome metabólica, diabetes tipo I, diabetes tipo II, doença pancreática, e hiperlipidemia.

6. Uso de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o indivíduo está sofrendo de, ou em risco para, desenvolver resistência à insulina, ou está sofrendo de, ou em risco para, desenvolver um dano em órgão induzido por glicose.

7. Uso de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o uso é uma vez por dia por um período de tempo de duas semanas.

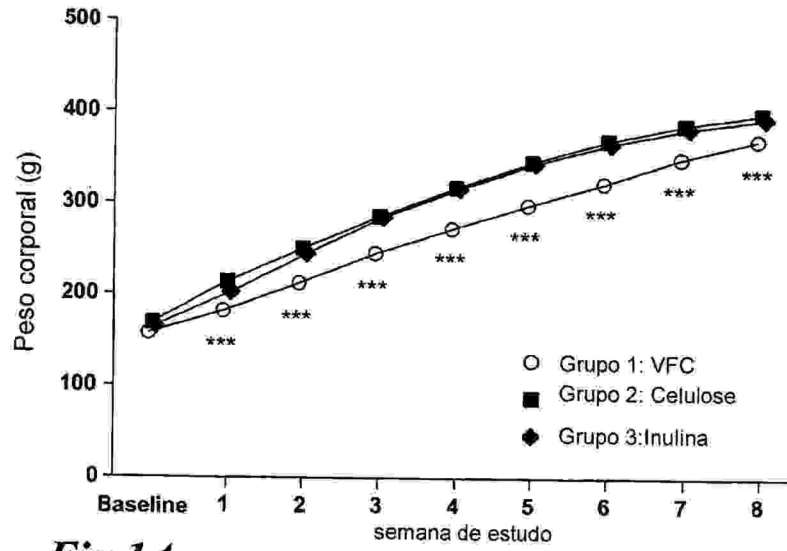


Fig.1A.

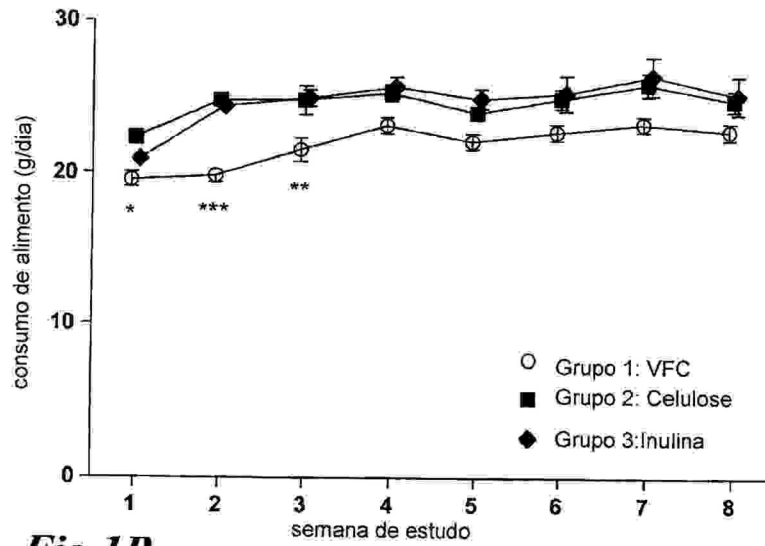


Fig.1B.

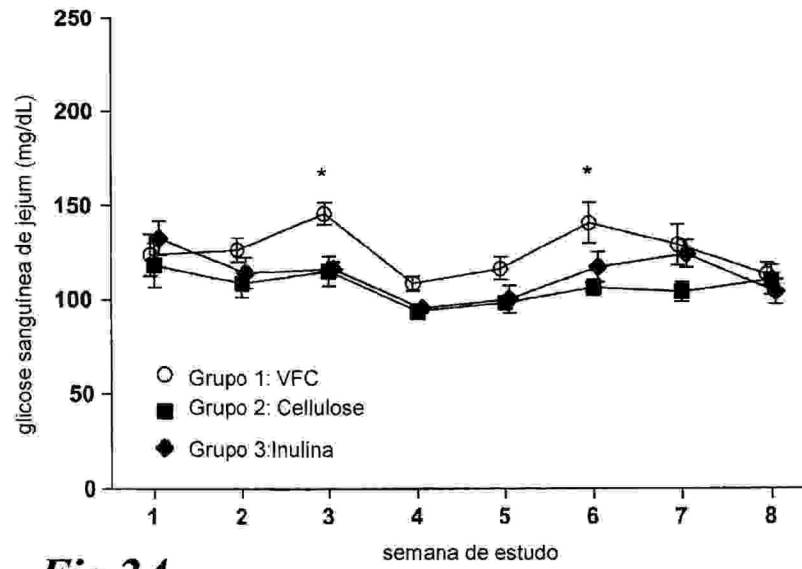


Fig.2A.

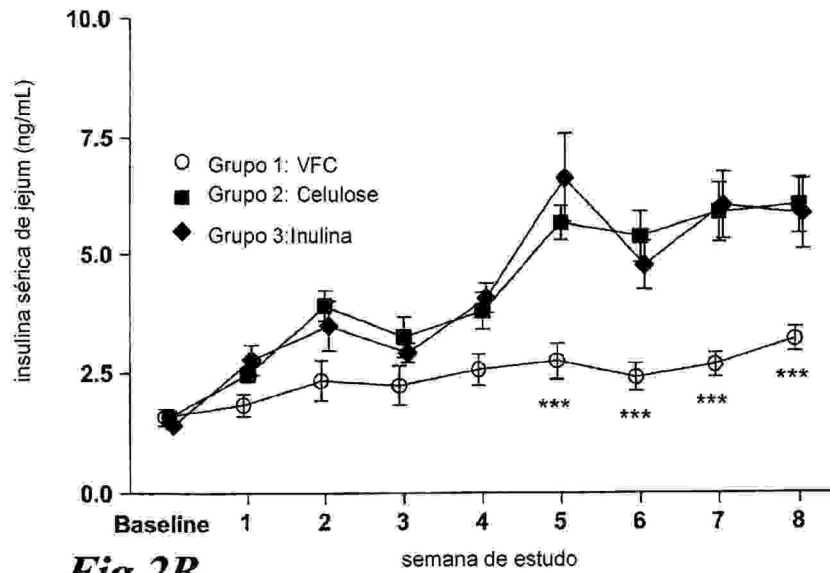


Fig.2B.

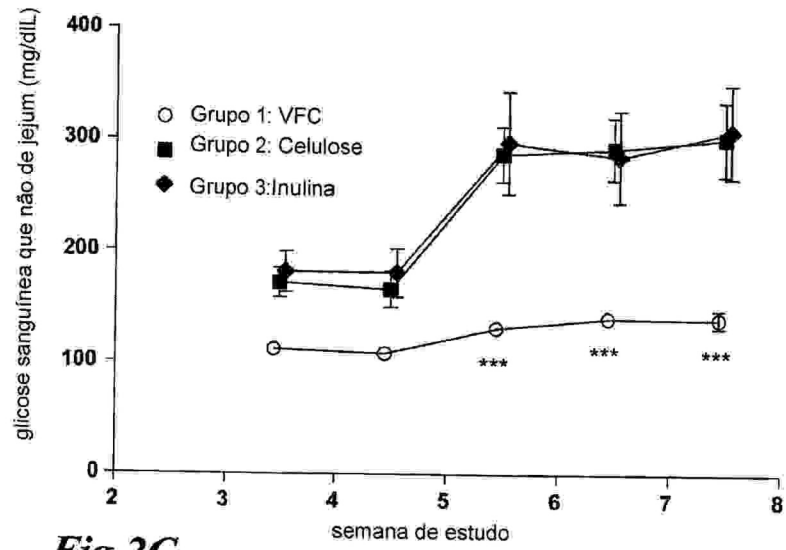


Fig. 2C.

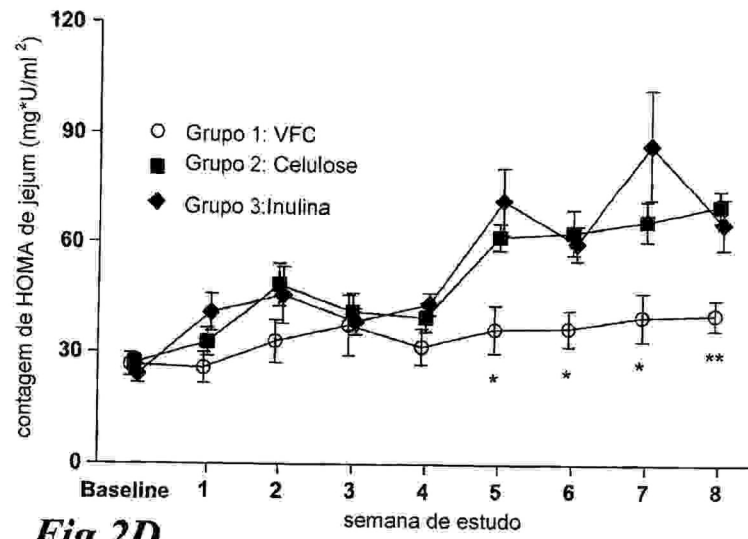


Fig. 2D.

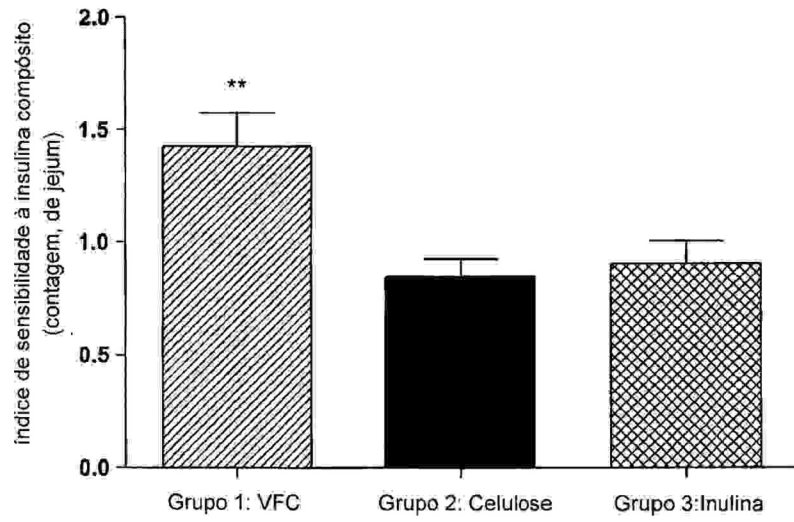


Fig.3A.

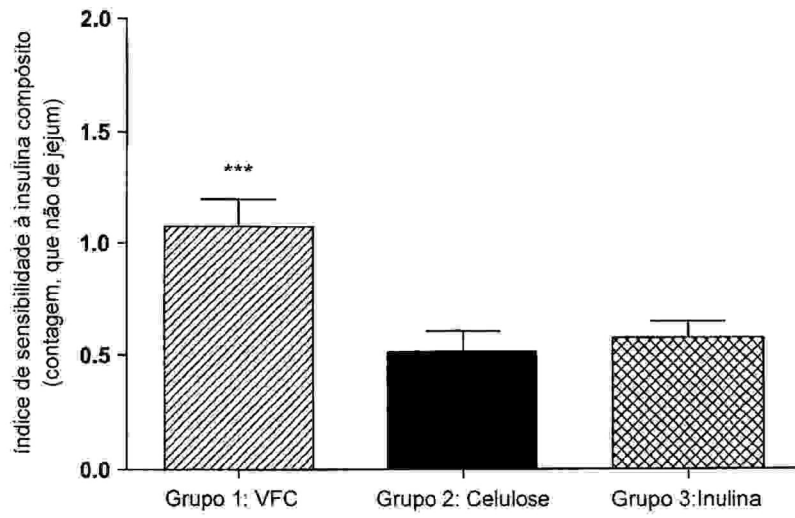


Fig.3B.

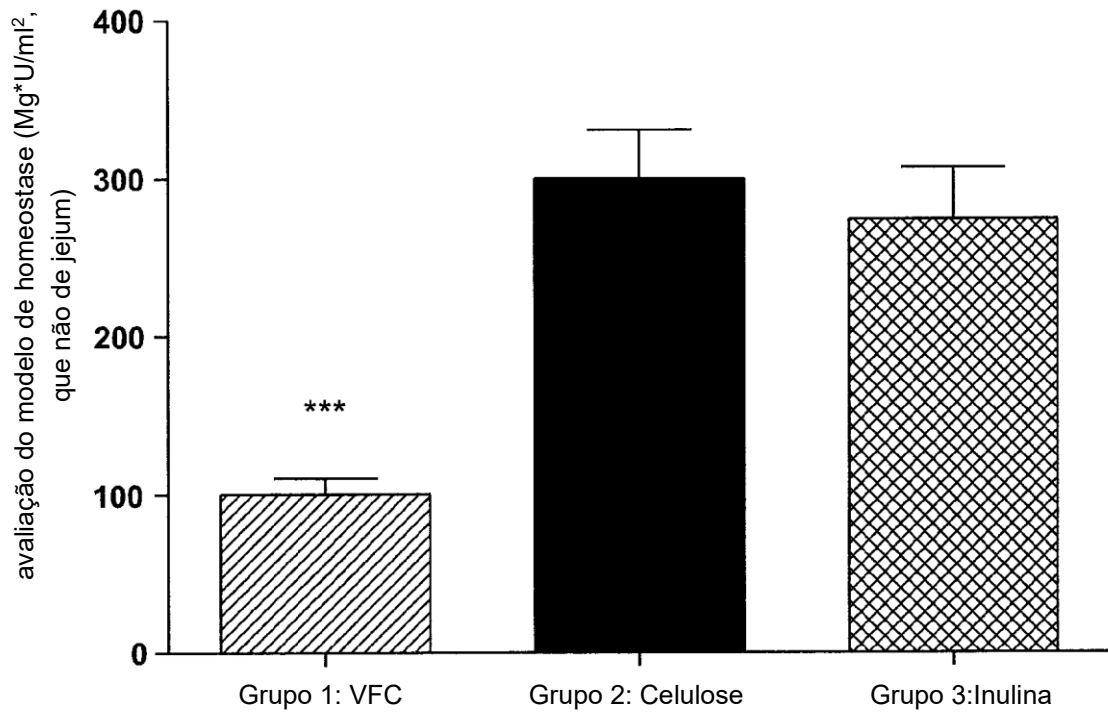


Fig.3C.

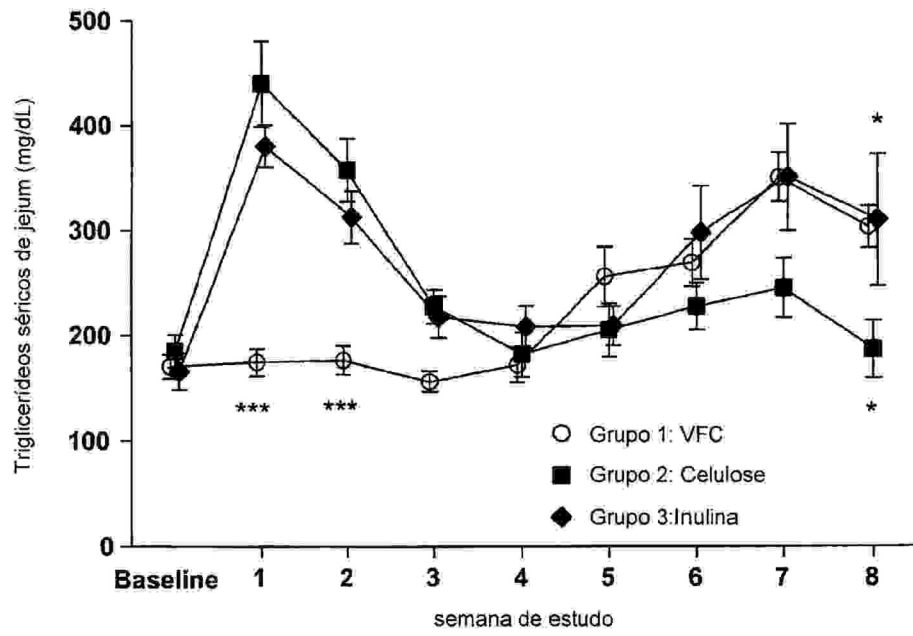


Fig.4.

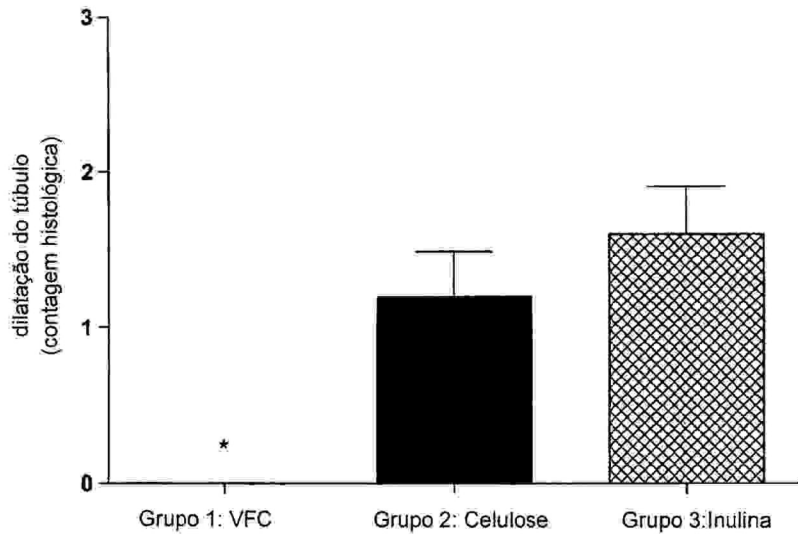


Fig.5A.

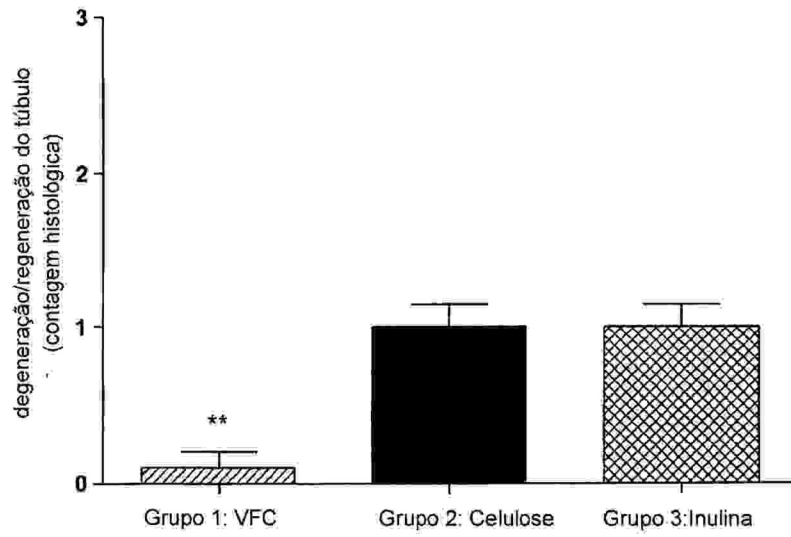


Fig.5B.

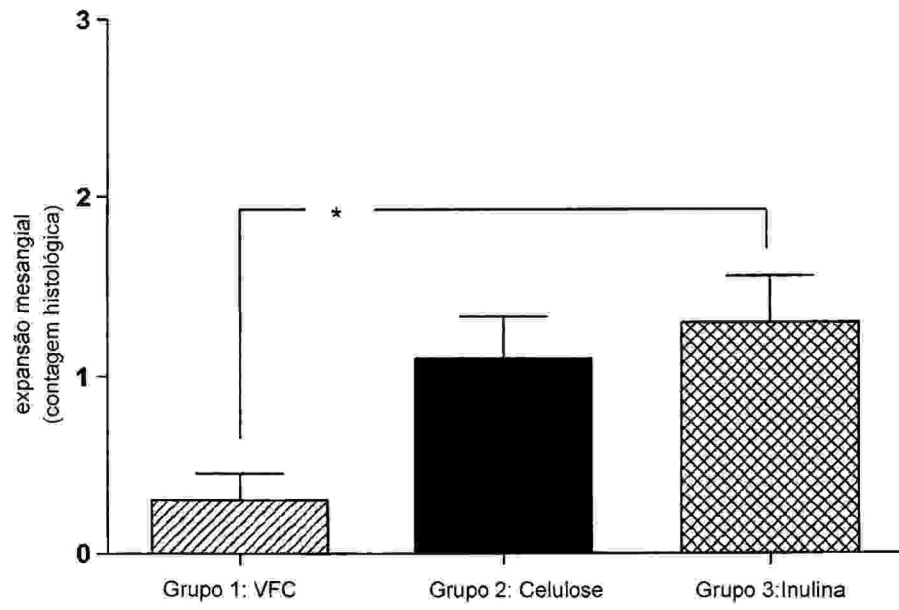


Fig.5C.

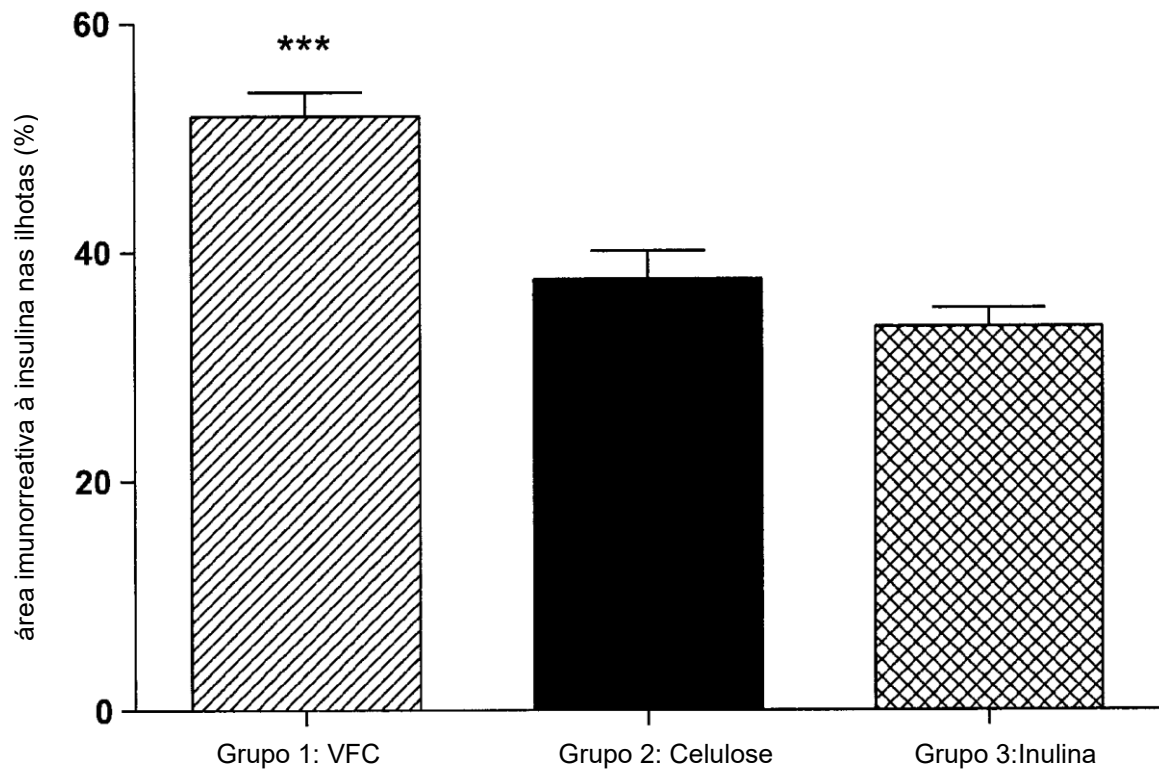


Fig. 6.

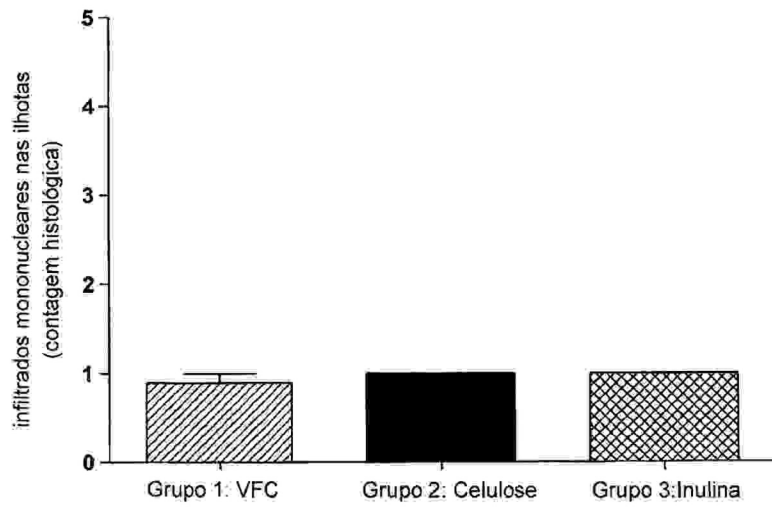


Fig. 7A.

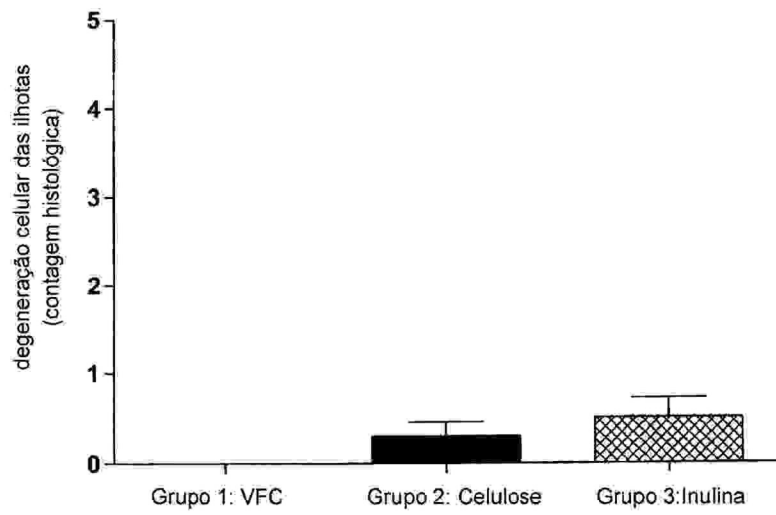


Fig. 7B.

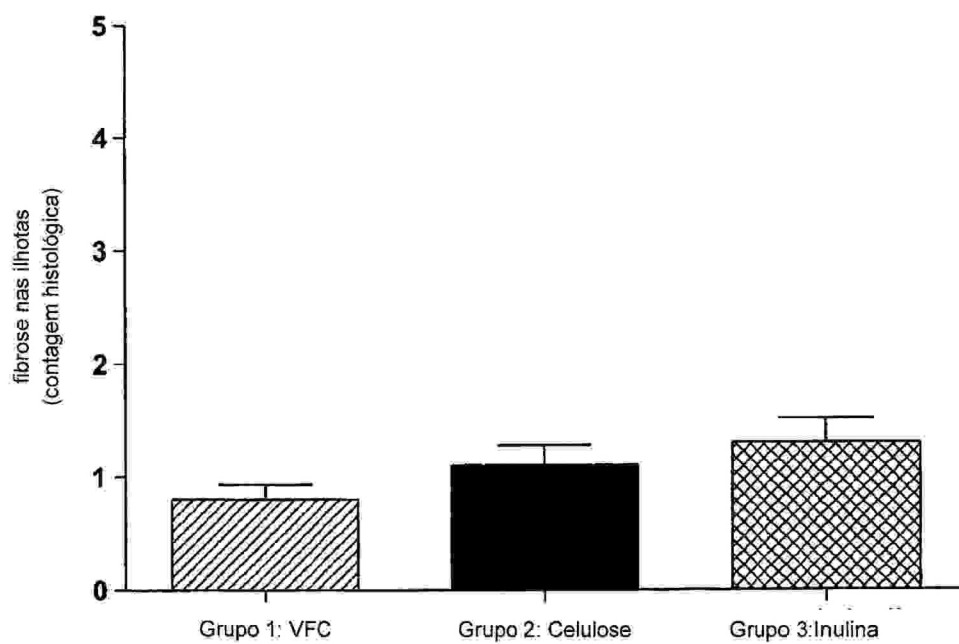
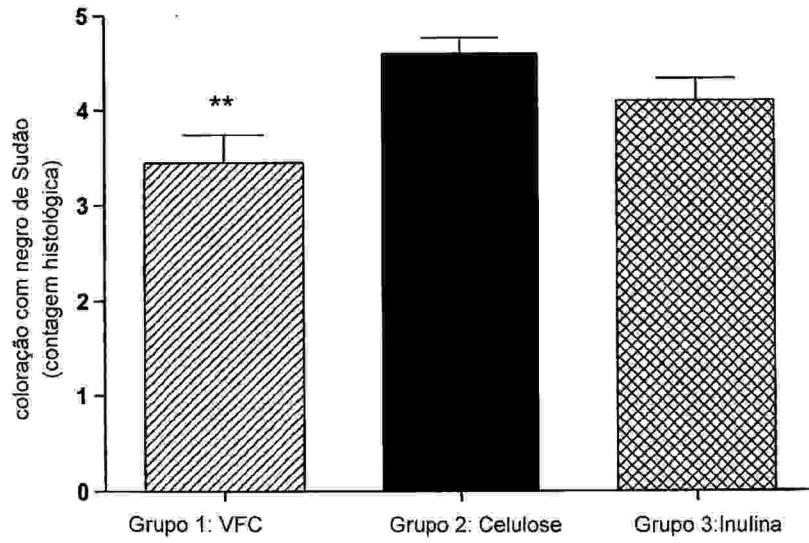
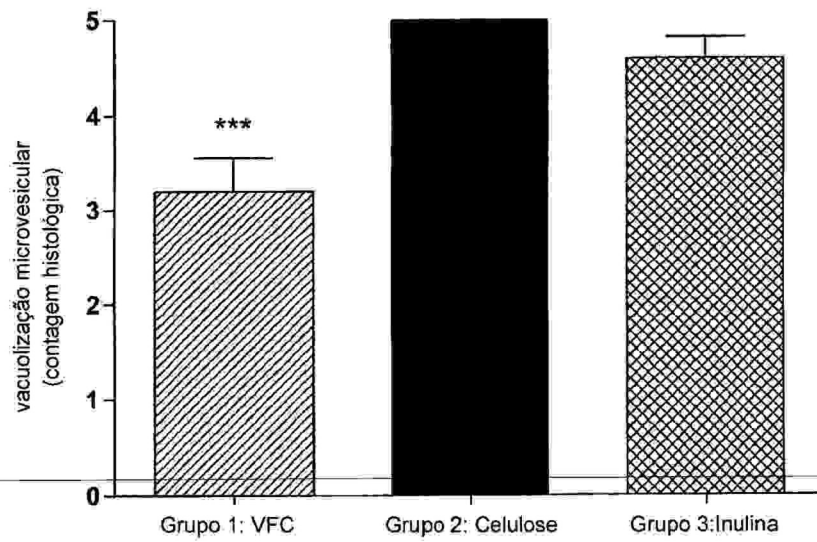


Fig. 7C.

*Fig.8A.**Fig.8B.*

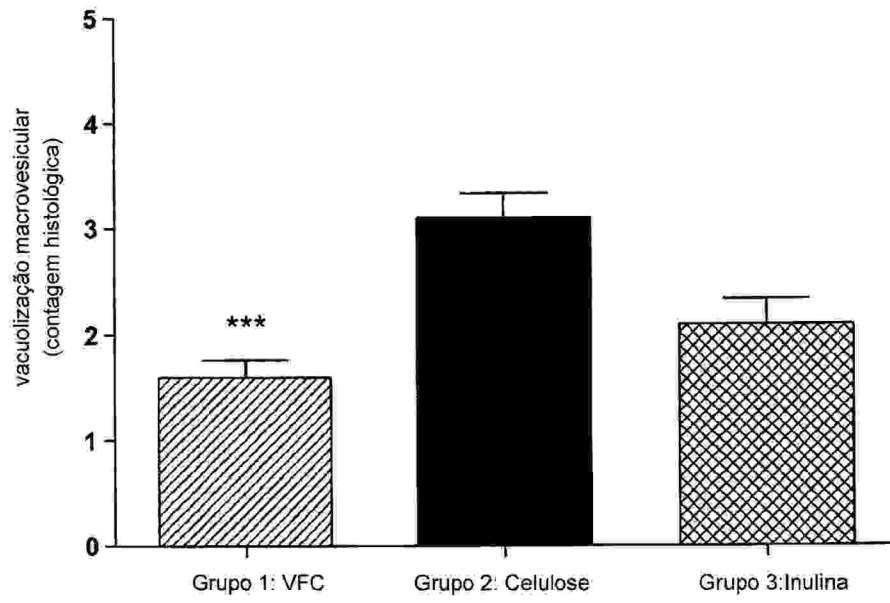


Fig.8C.

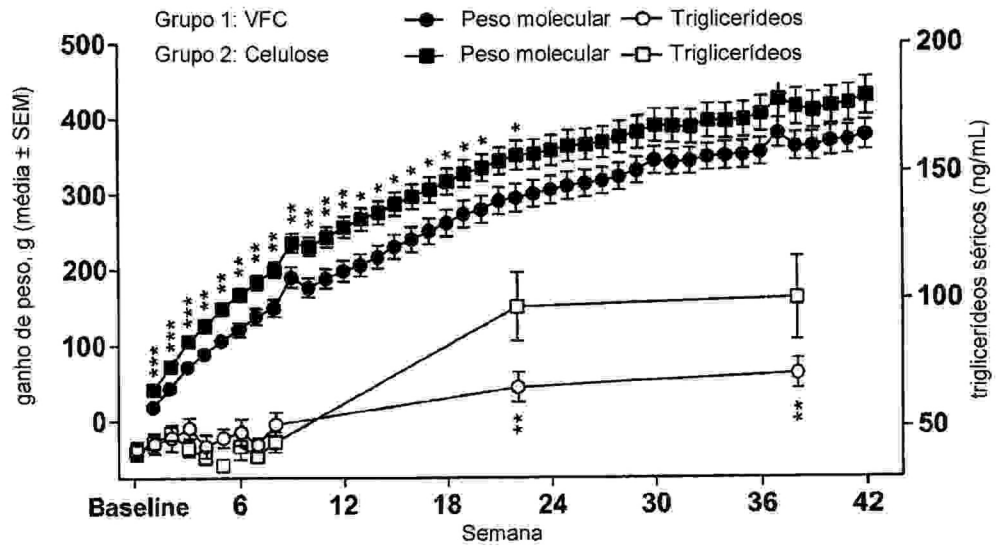
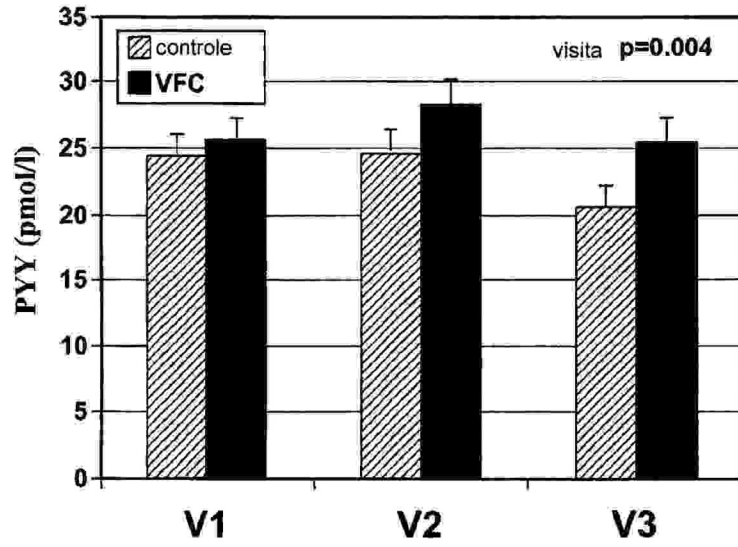
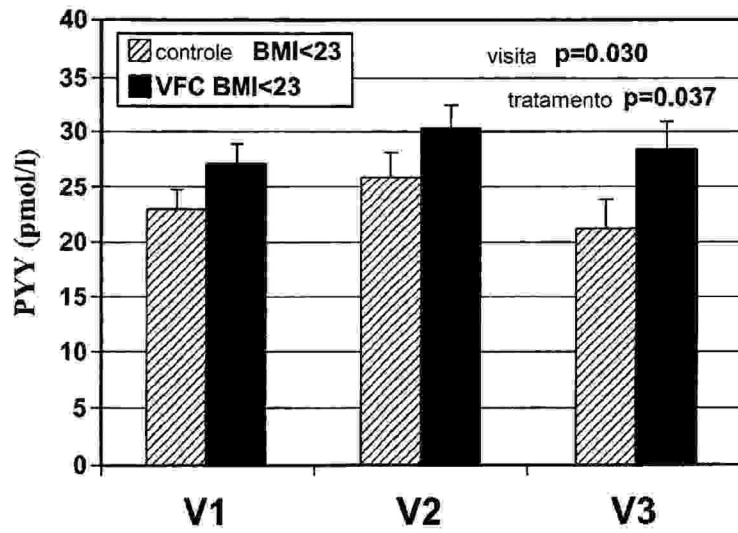
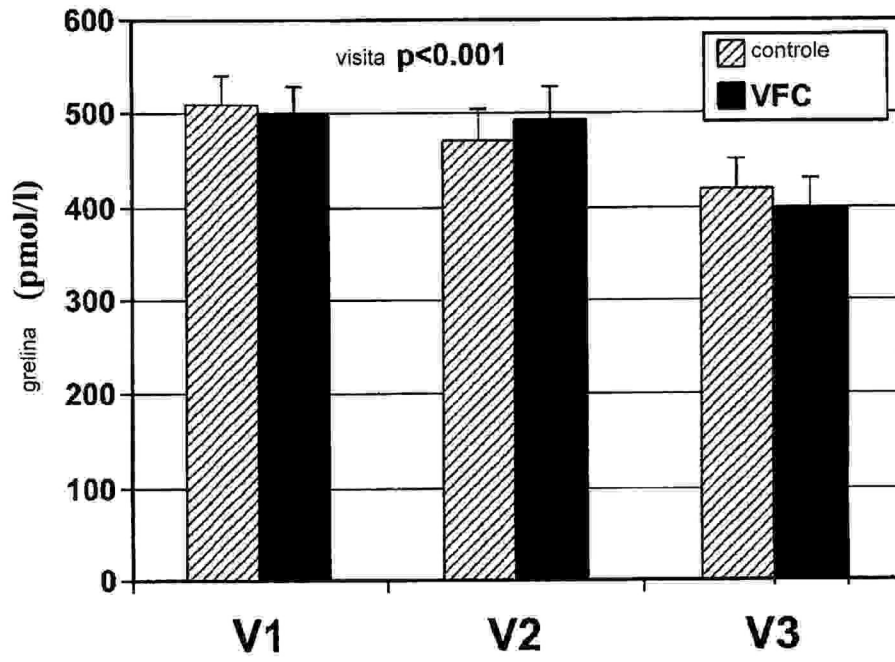


Fig. 9.

*Fig.10A.**Fig.10B.*

*Fig.10C.*

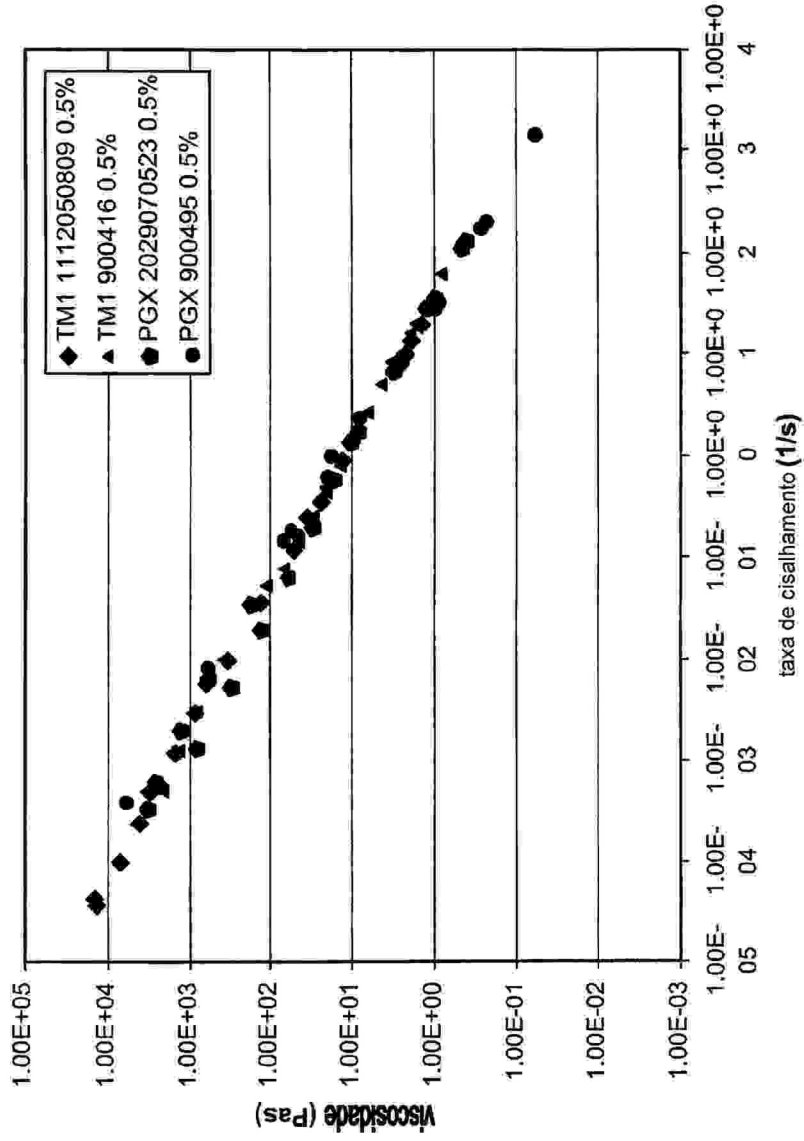


Fig. 11A.

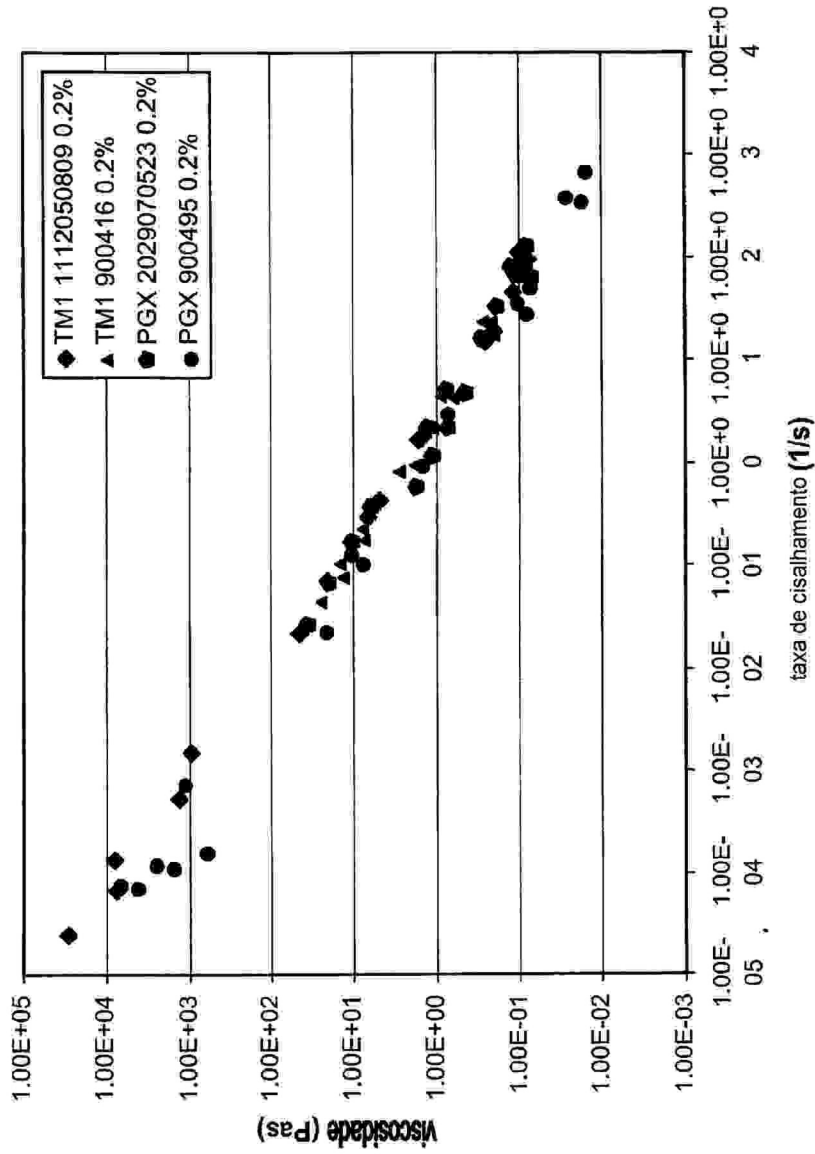


Fig. IIB.

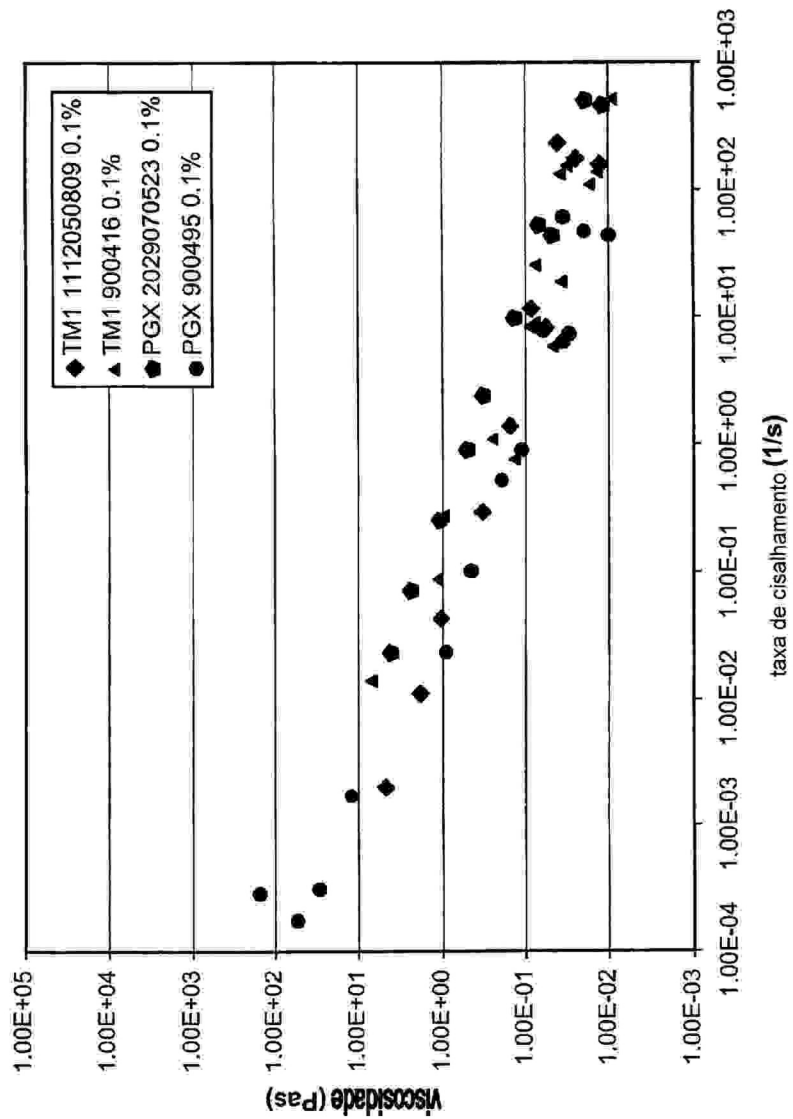
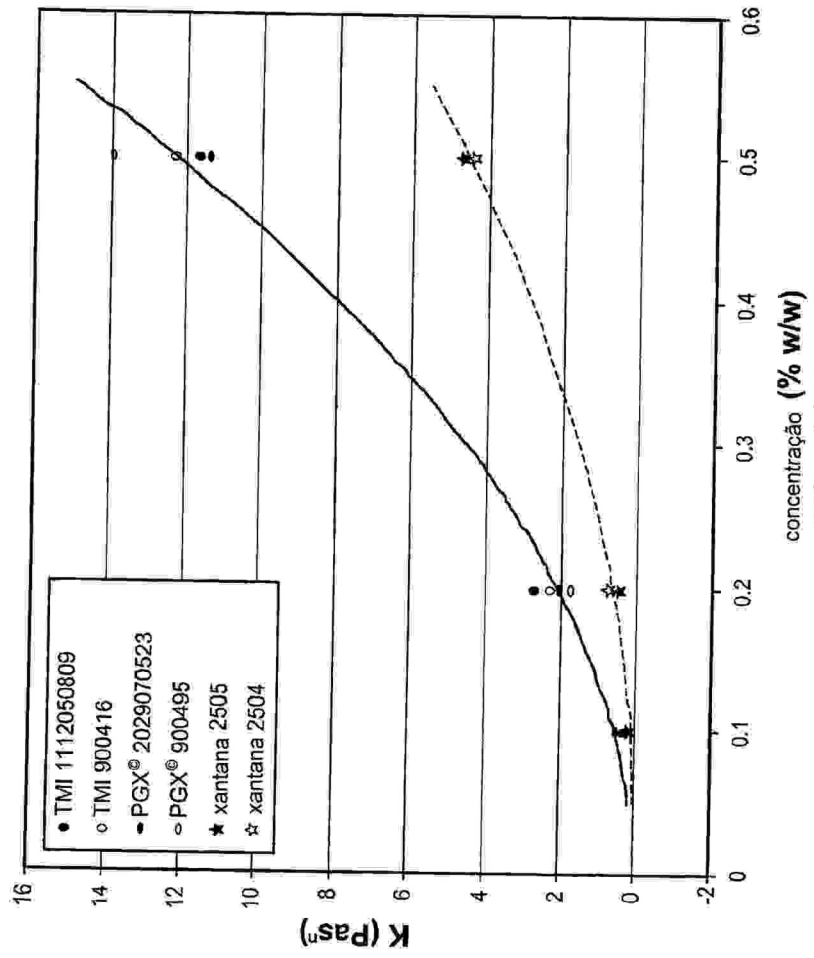


Fig.11C.



concentração (% w/w)

Fig. 12A.

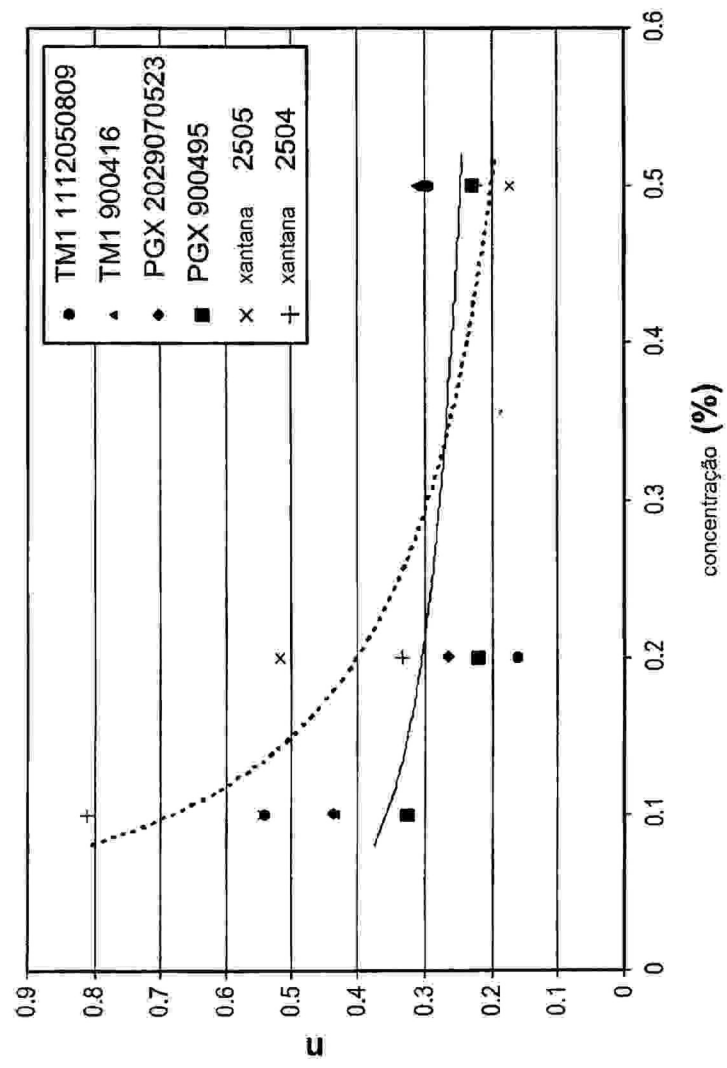


Fig. 12B.

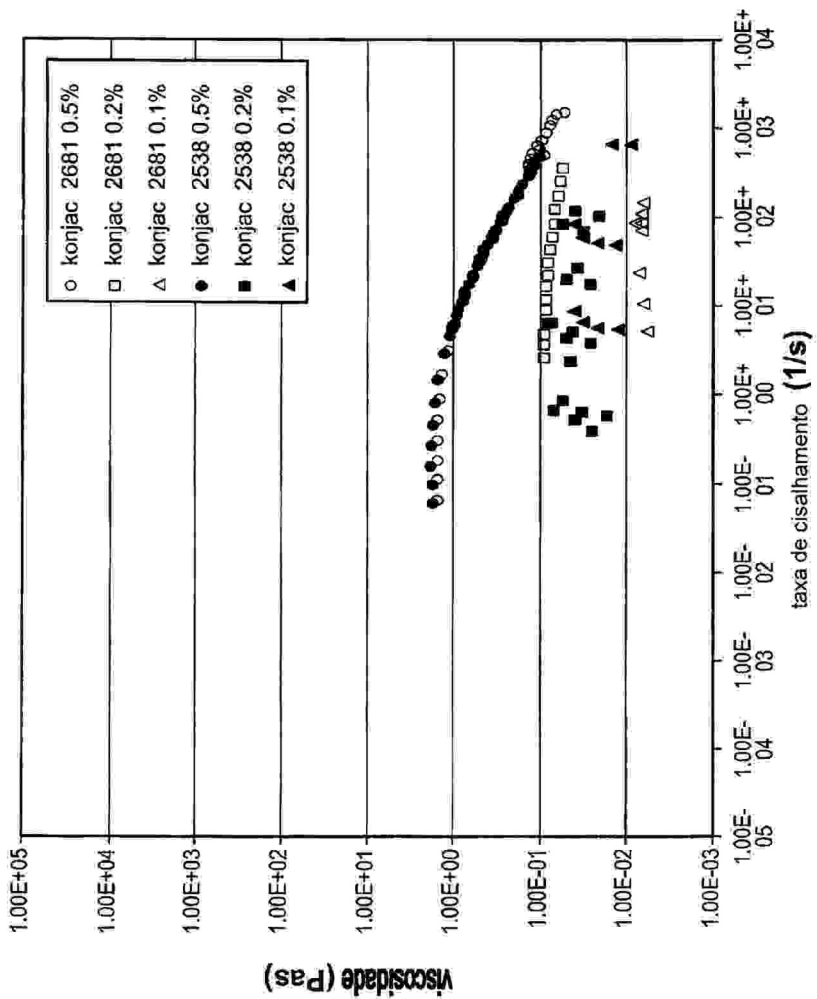


Fig.13A.

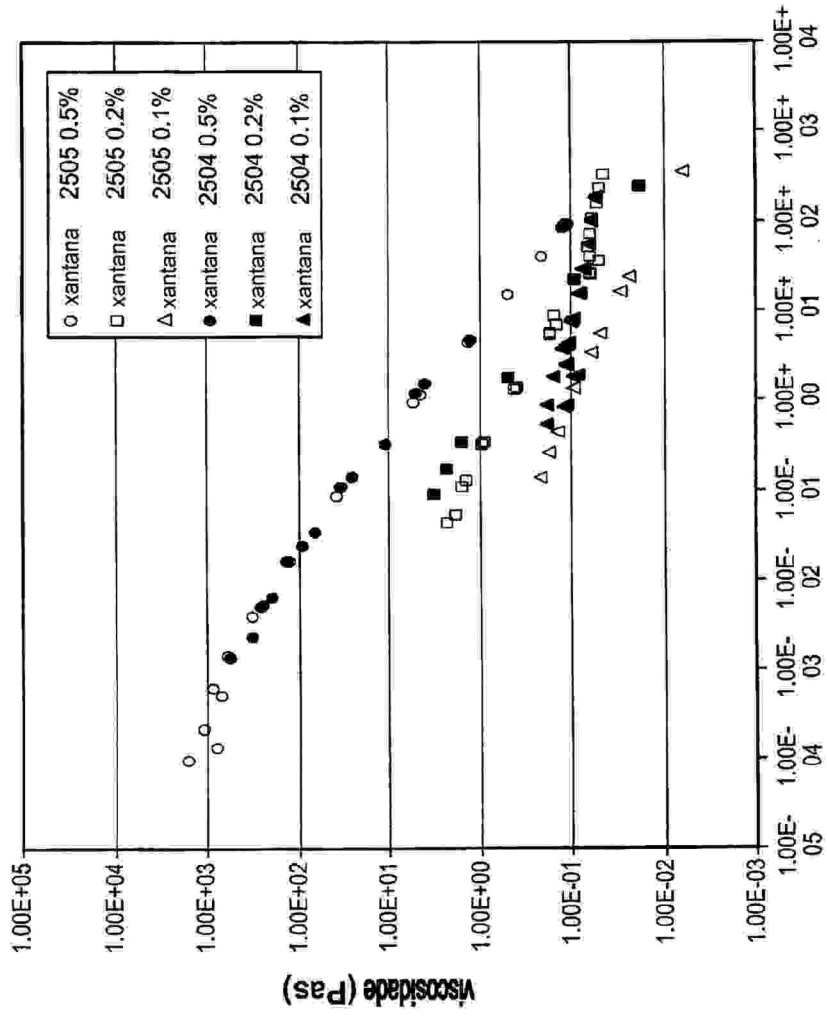


Fig.13B.

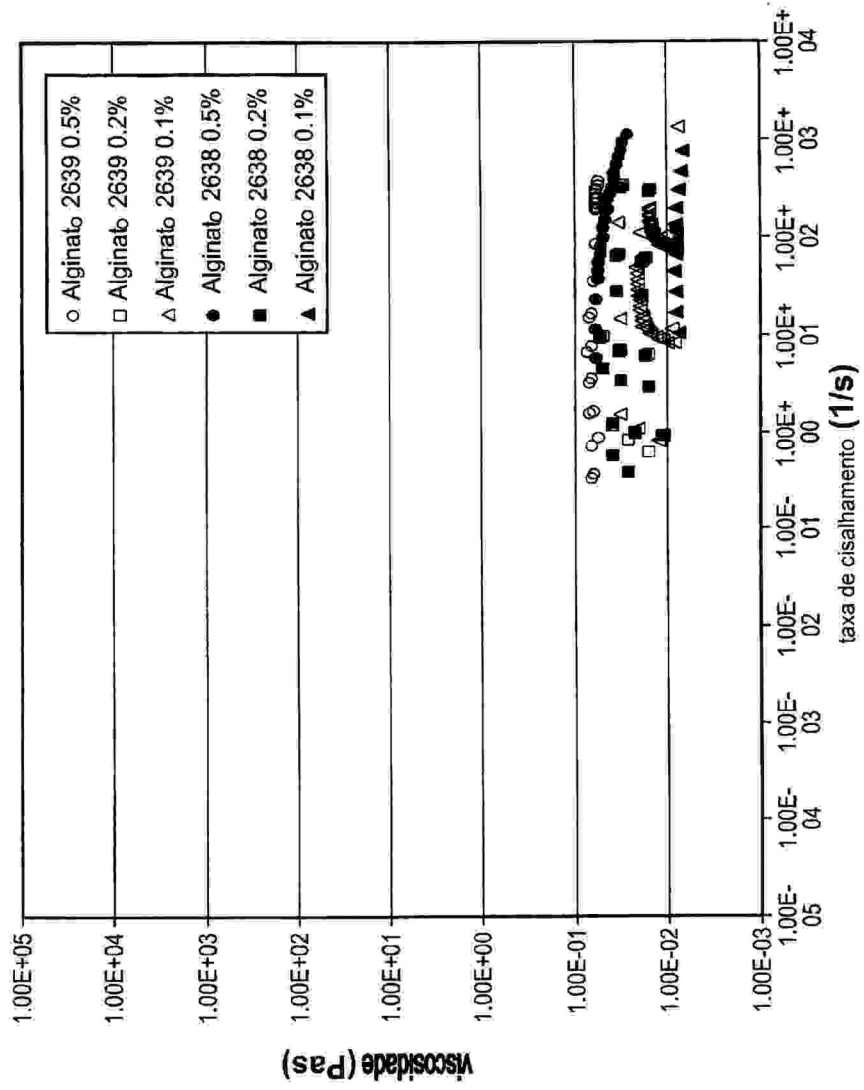


Fig.13C.

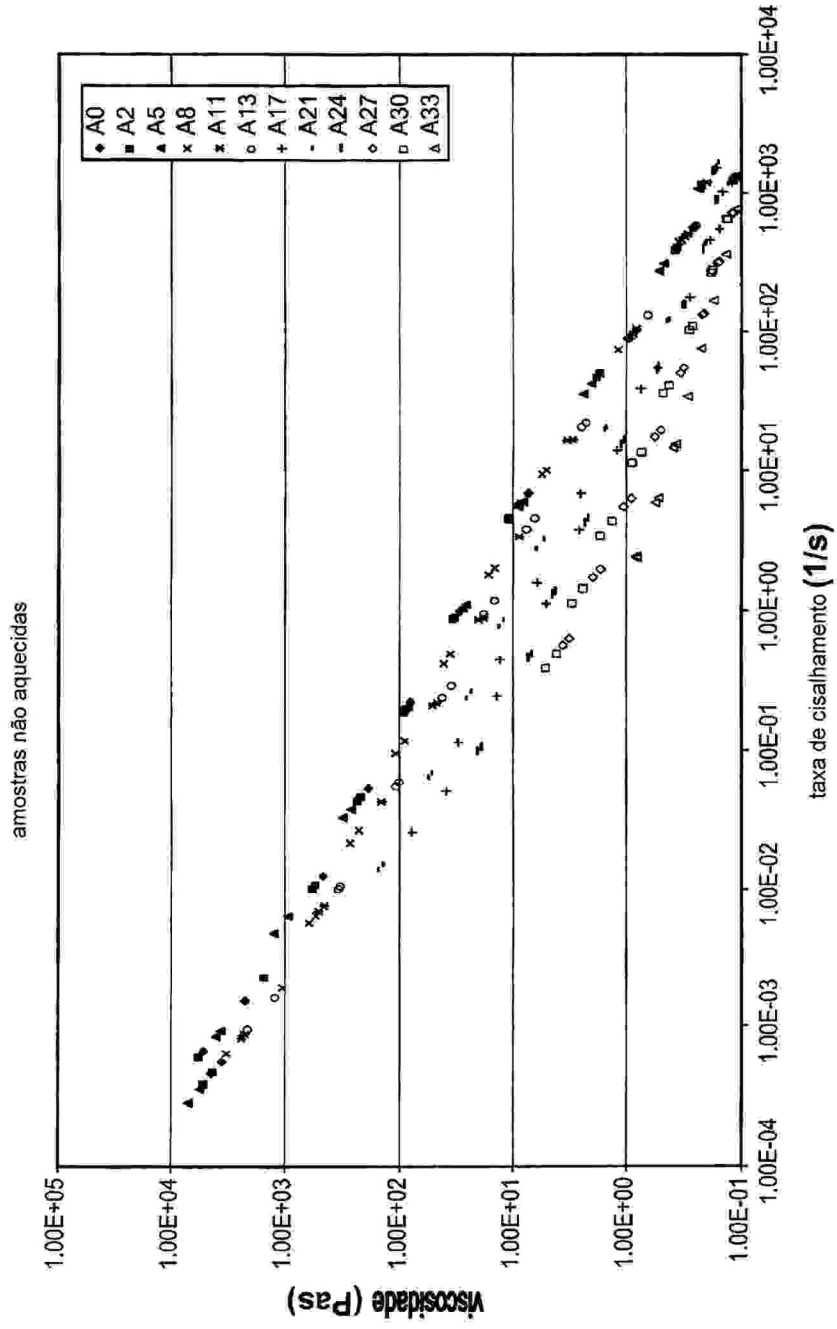


Fig.14A.

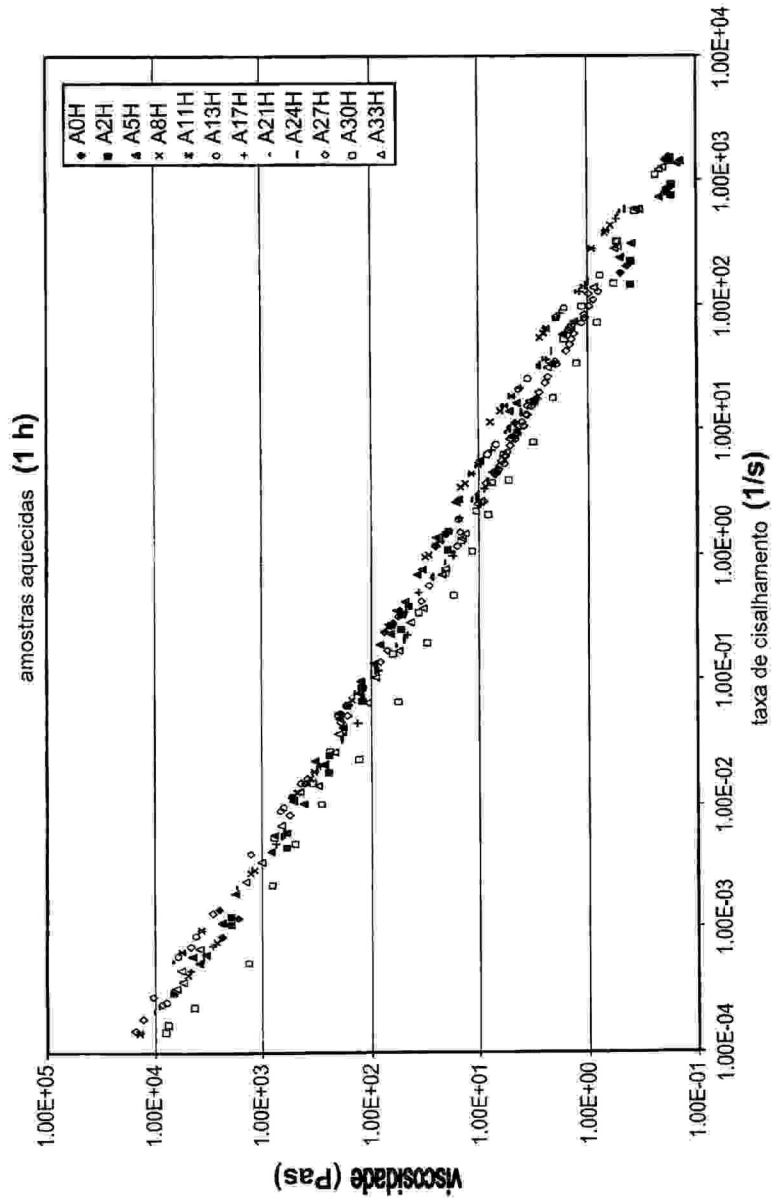


Fig. 14B.

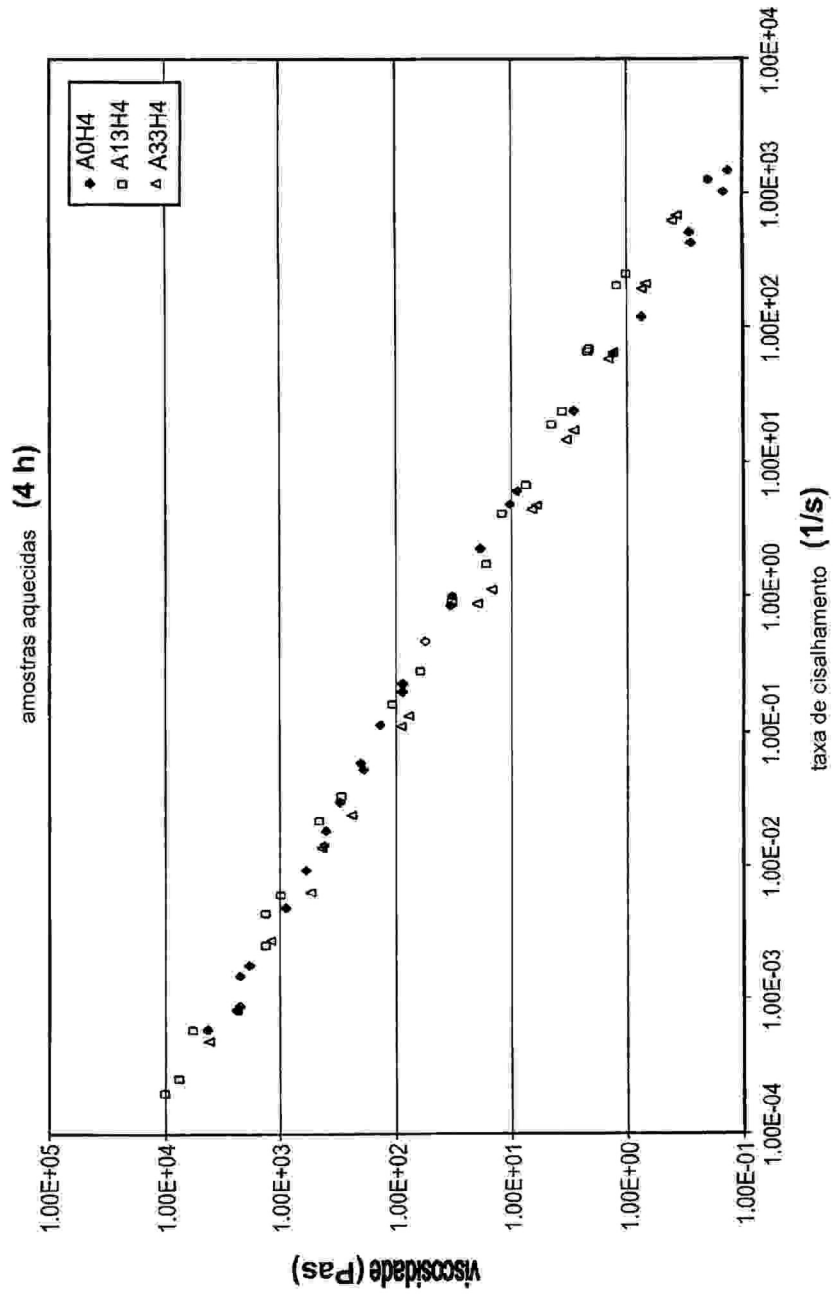


Fig.14C.

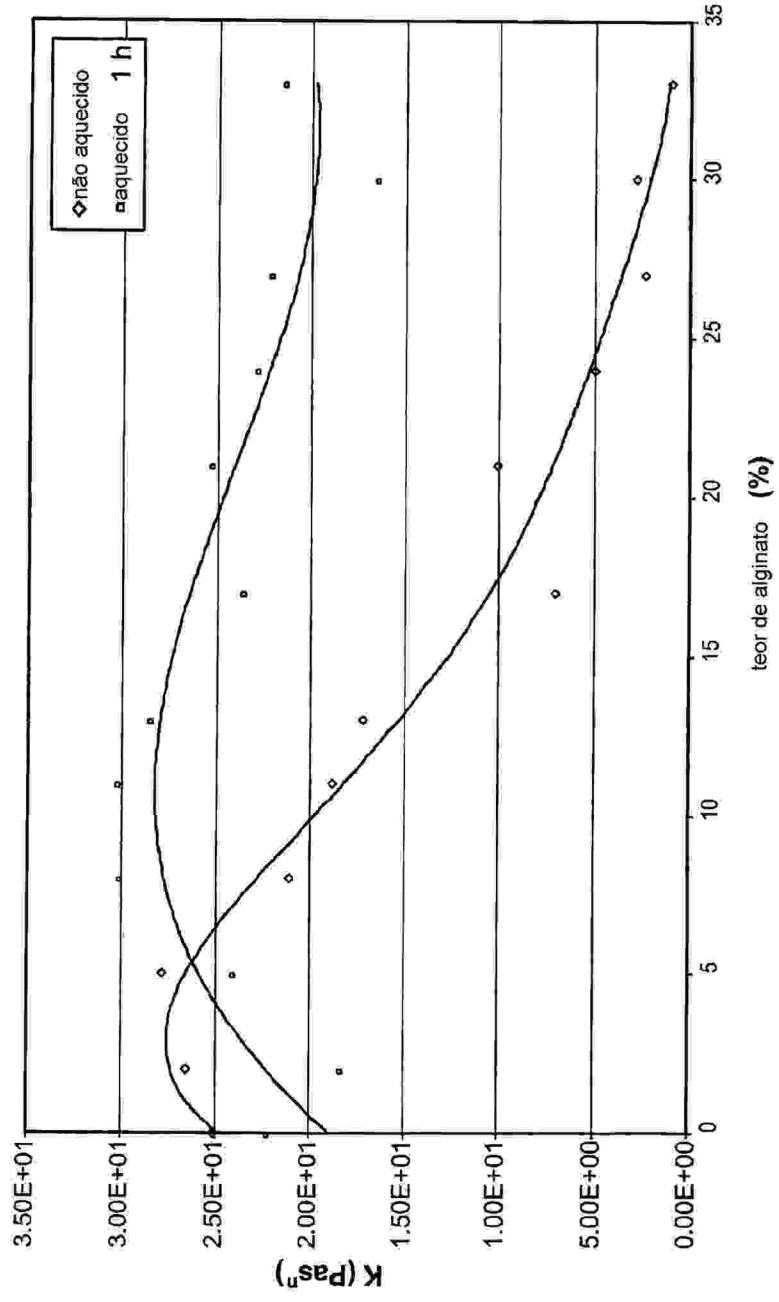


Fig. 15A.

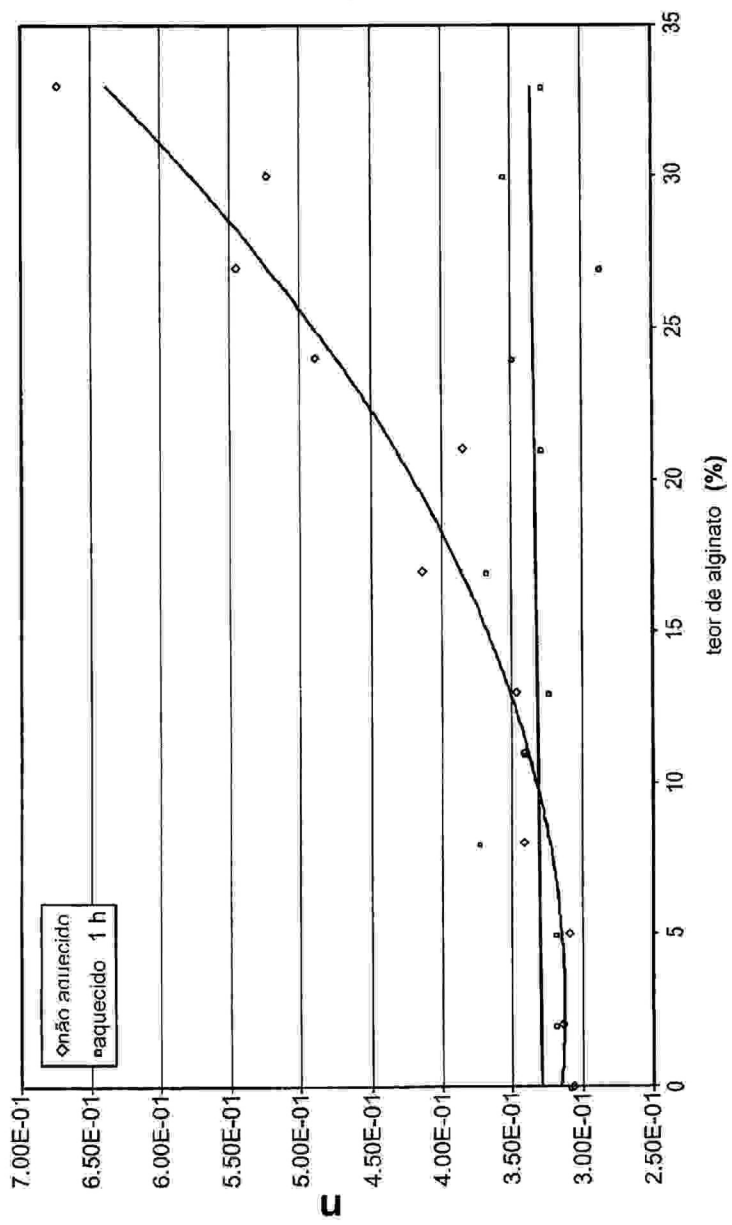
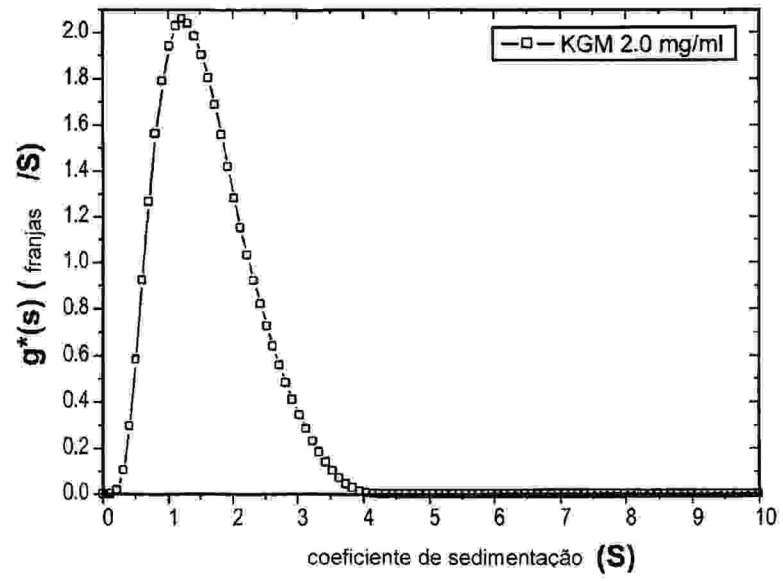
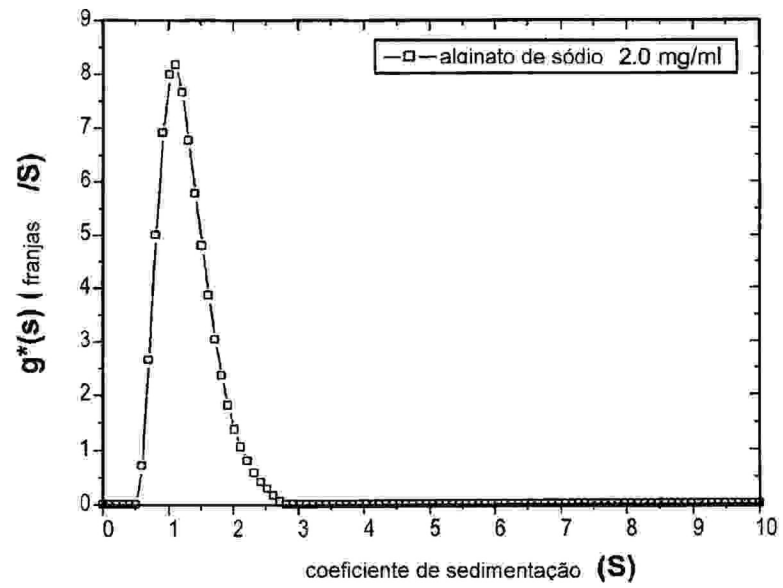


Fig.15B.

*Fig.16A.**Fig.16B.*

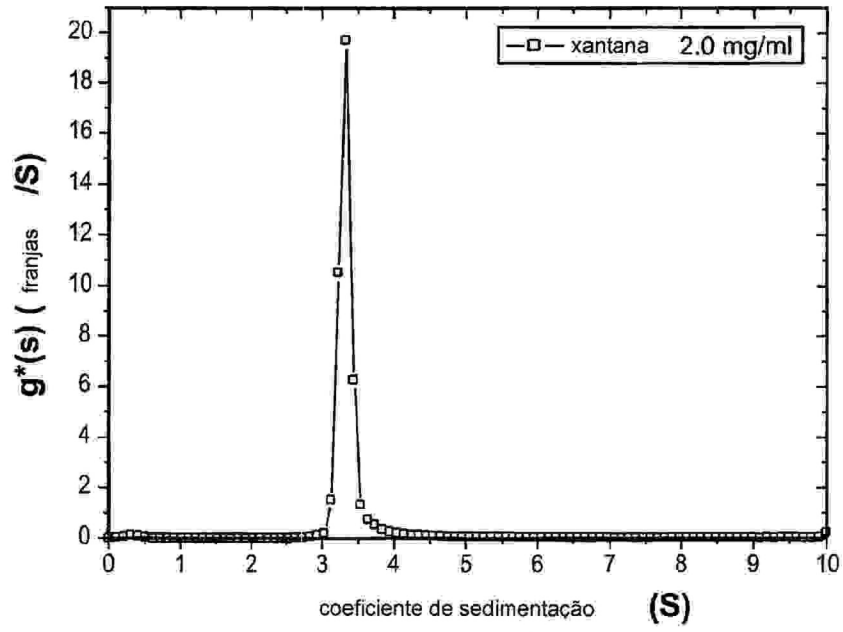


Fig.16C.

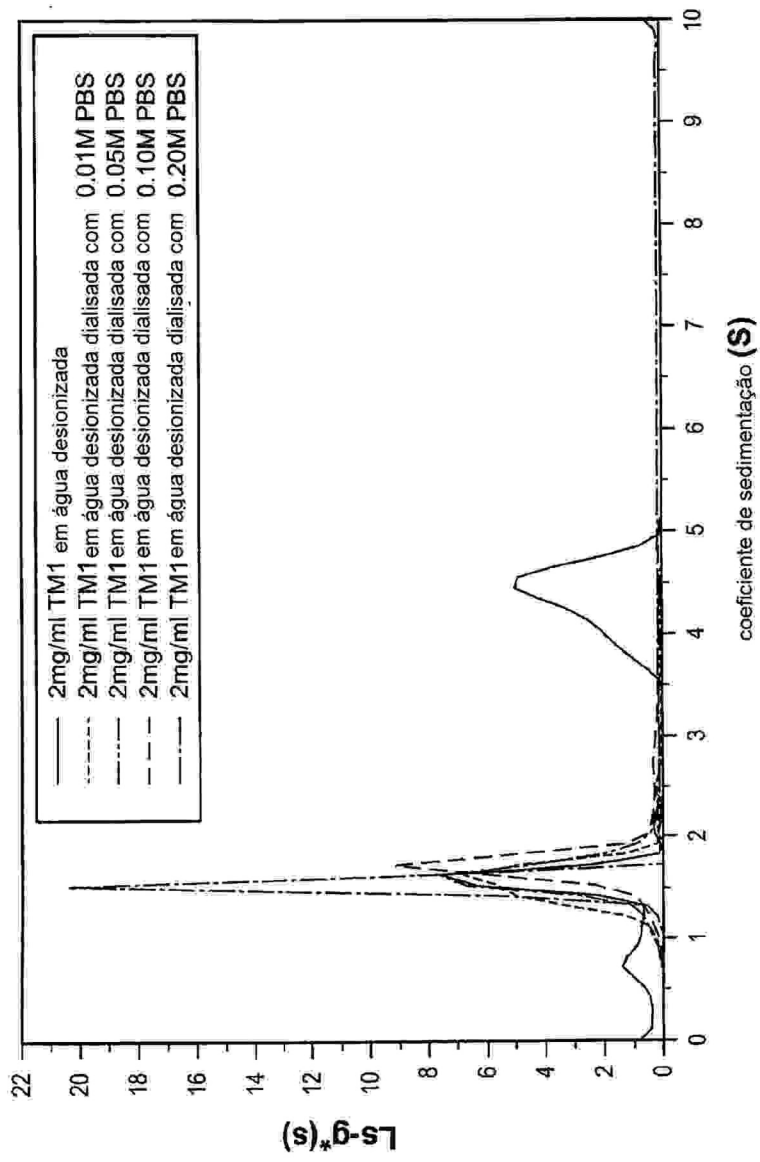


Fig.17A.

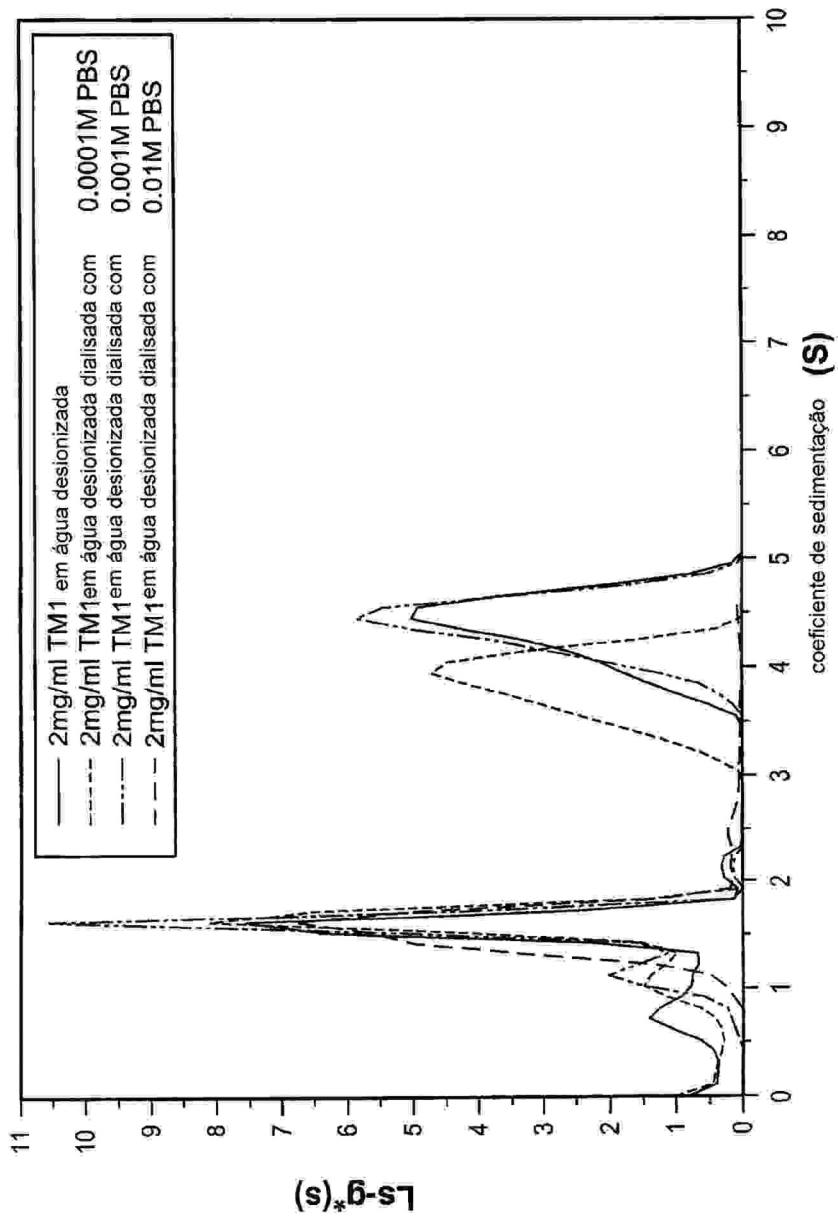
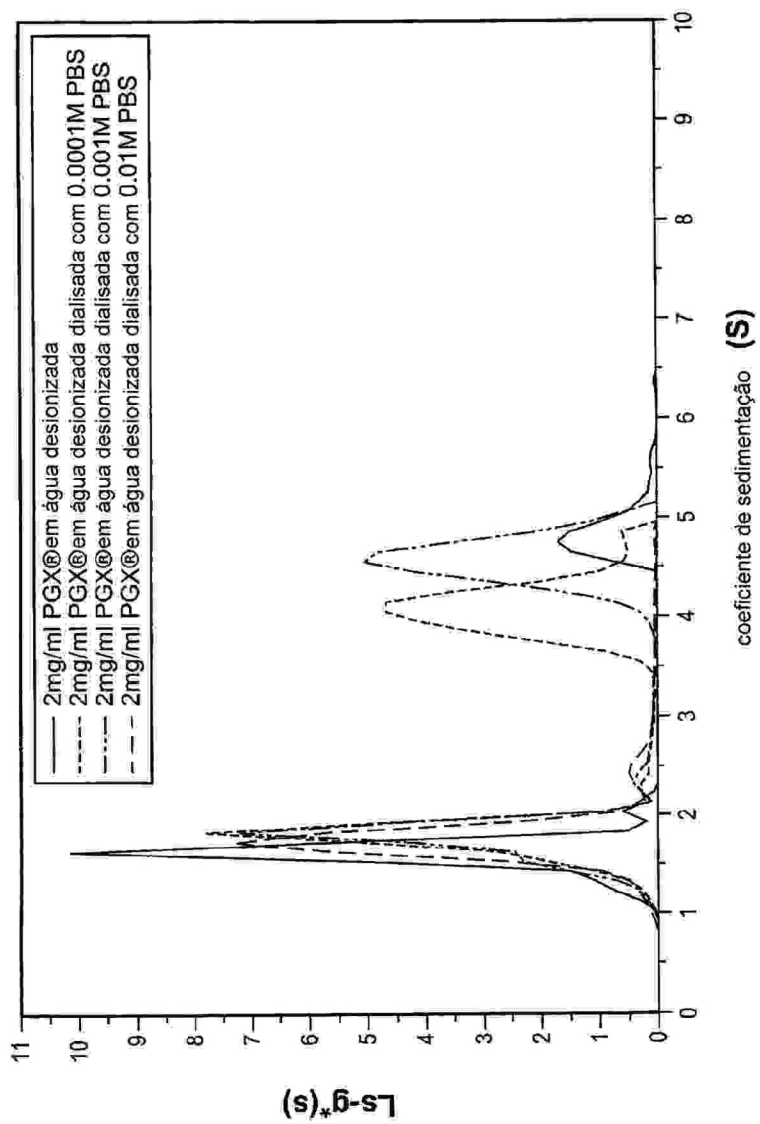
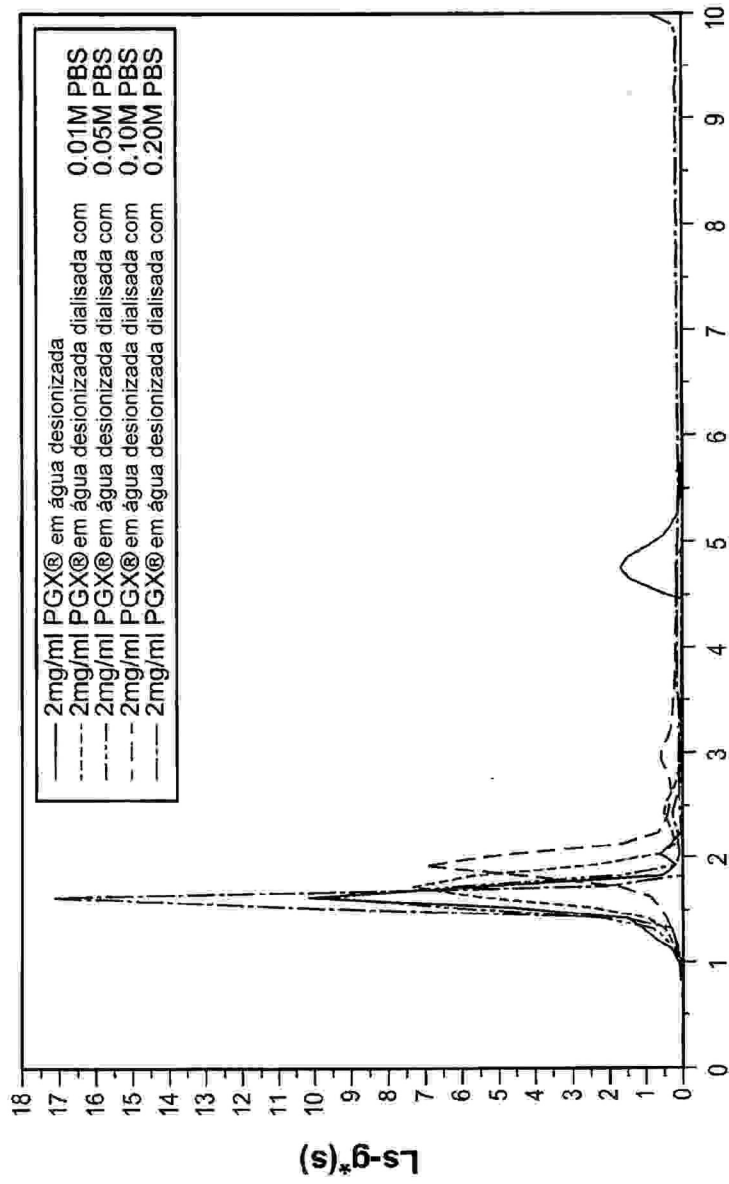


Fig.17B.



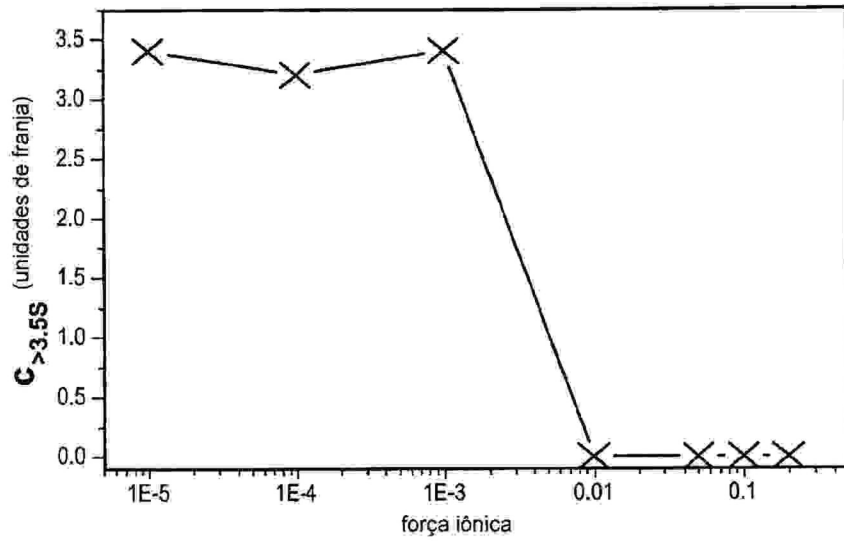
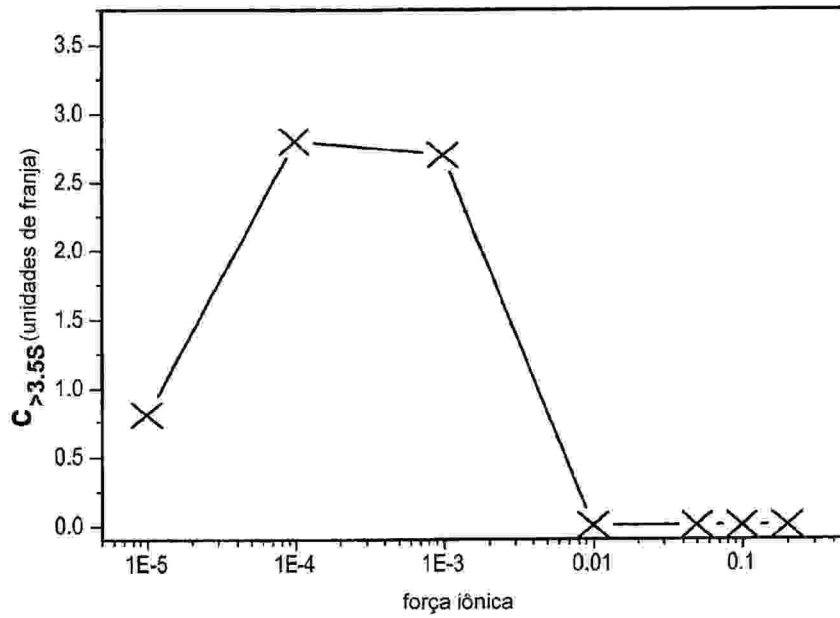
coeficiente de sedimentação (s)

Fig.17C.



coeficiente de sedimentação (s)

Fig.17D.

*Fig.18A.**Fig.18B.*

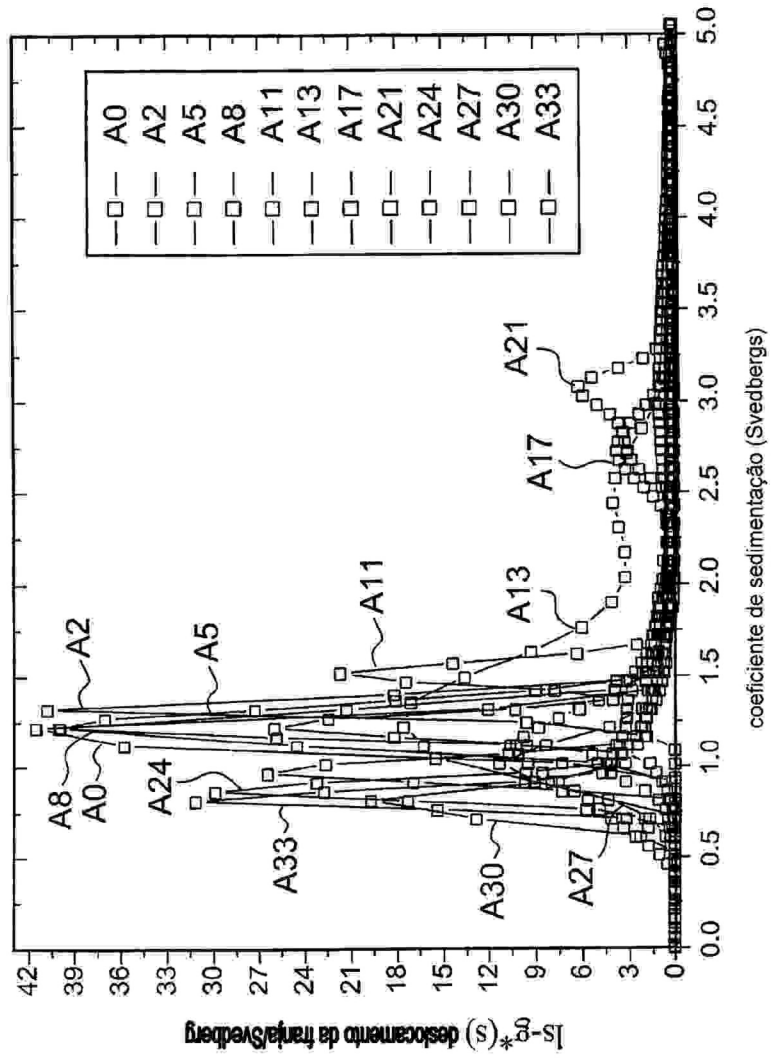


Fig. 19A.

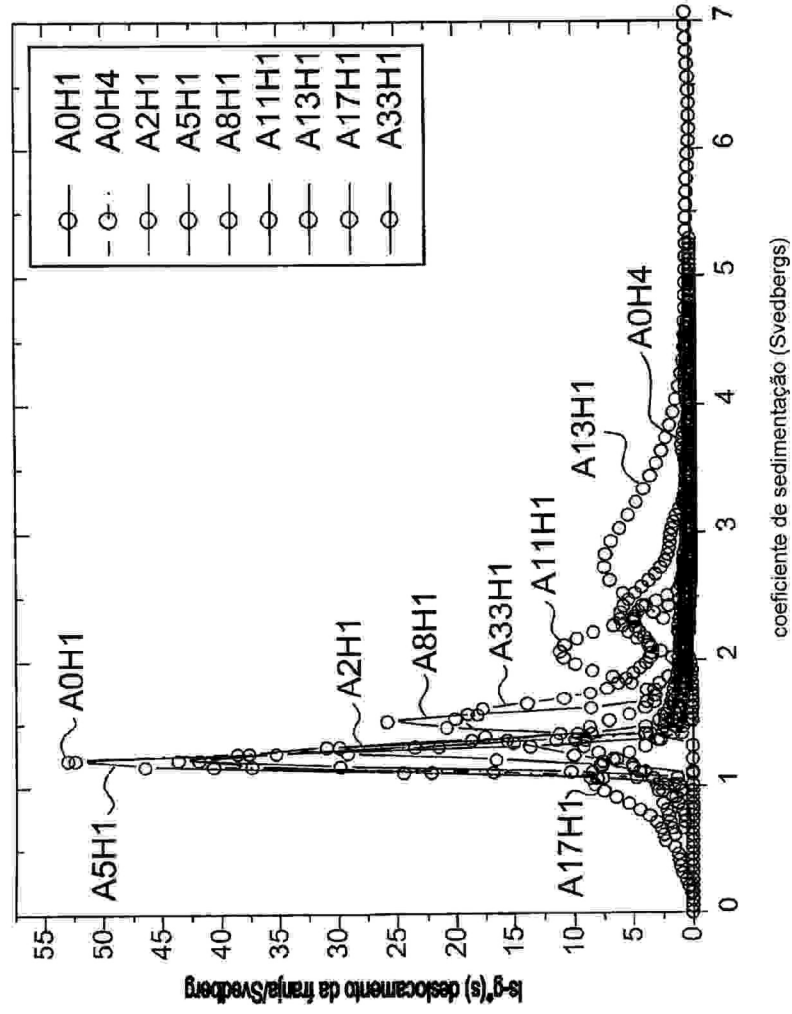


Fig. 19B.