



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1513418 E**

(51) Classificação Internacional:

A23L 1/29 (2006.01) **A61K 31/715** (2006.01)
A23L 1/54 (2006.01) **C08L 5/00** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2003.05.27**

(30) Prioridade(s): **2002.06.12 US 0167912**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.03.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.19**
001/2007

(73) Titular(es):

ABBOTT LABORATORIES

DEPT. 377/AP6D-2, 100 ABBOTT PARK ROAD
ABBOTT PARK, IL 60064

US

(72) Inventor(es):

BRYAN W. WOLF

US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA

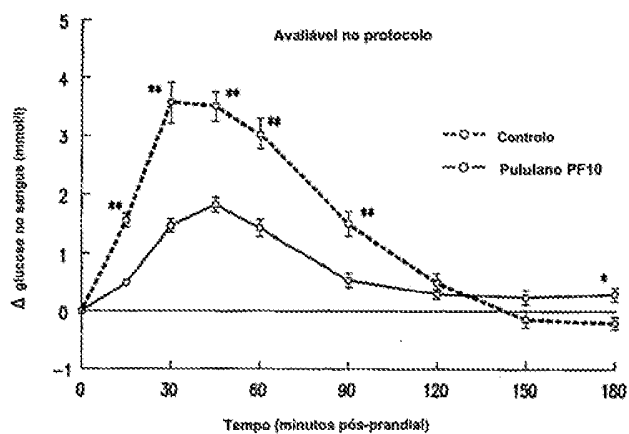
PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE PULULANO COMO HIDRATO DE CARBONO DE DIGESTÃO LENTA**

(57) Resumo:

RESUMO**"Utilização de pululano como hidrato de carbono de digestão lenta"**

O presente invento é dirigido à utilização de pululano como um hidrato de carbono de digestão lenta e à sua incorporação em produtos alimentares, especialmente bebidas e produtos de substituição de refeições.



Os valores representam a Média \pm EP, n=28, *P<0,05, **P<0,01

DESCRIÇÃO**“Utilização de pululano como hidrato de carbono de digestão lenta”**

Este pedido de patente é dirigido à utilização de um novo hidrato de carbono de digestão lenta, pululano, na gestão dietética de diabéticos em particular para produzir uma resposta glicémica atenuada num paciente diabético.

Antecedentes

O principal tratamento para a intolerância à glucose é o rigoroso cumprimento de uma dieta que minimize a resposta de glucose pós-prandial e, em muitos casos, a utilização de medicações (insulina ou agentes hipoglicémicos orais).

Antes de 1921, a inanição era o único tratamento reconhecido da diabetes *mellitus* (DM). Desde a descoberta da insulina exógena, a dieta tem sido um objecto principal de terapia. As recomendações para a distribuição de calorias de hidrato de carbono e gordura têm evoluído ao longo dos últimos 75 anos. Com base nas opiniões da época, listam-se na Tabela 1 a seguir as melhores misturas para promover o controlo metabólico.

Tabela 1

História da distribuição calórica recomendada para pessoas com DM

| Ano | Hidrato de carbono (%) | Proteína (%) | Gordura (%) |
|------|------------------------|--------------|-------------|
| 1921 | 20 | 10 | 70 |
| 1950 | 40 | 20 | 40 |
| 1971 | 45 | 20 | 35 |
| 1986 | 50-60 | 12-20 | 30 |
| 1994 | * | 10-20 | *^ |

* com base em avaliação nutricional

^ <10% de gordura saturada

As recomendações iniciais limitavam o hidrato de carbono dietético, porque o controlo glicémico era geralmente melhor com este tipo de regímen. Contudo, ao longo dos anos, os investigadores constataram que dietas de baixo teor em

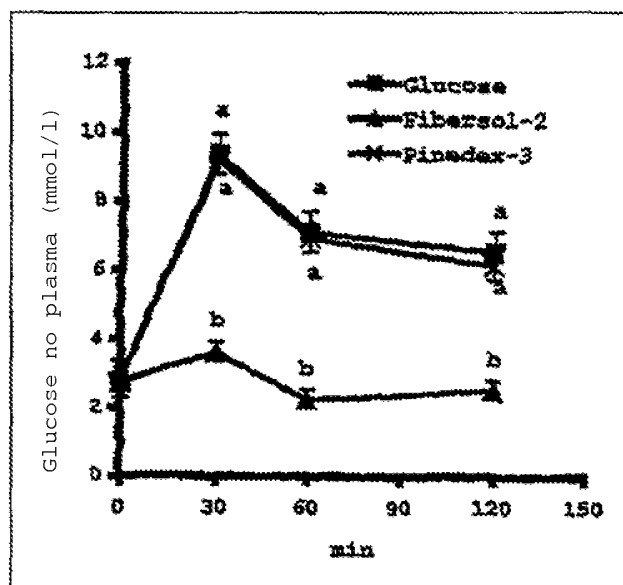
hidrato de carbono e de alto teor em gordura estavam associadas com dislipidemias e doença cardiovascular. Em 1950, a American Diabetes Association (ADA) recomendou aumentar a proporção de calorias proporcionadas por hidrato de carbono para diminuir o risco cardiovascular. À medida que a comunidade médica ganhava uma maior compreensão sobre a diabetes, as recomendações dietéticas continuaram a evoluir sugerindo um consumo acrescido de hidratos de carbono.

Parte desta evolução tem origem na descoberta de que nem todos os hidratos de carbono produzem uma resposta glicémica equivalente. Os açúcares simples, tais como glucose, são rapidamente absorvidos por um humano e produzem um pico imediato nos níveis de glucose no sangue de um diabético. Hidratos de carbono mais complexos, tais como amidos, não produzem um tal pico imediato. Os hidratos de carbono complexos não são absorvidos directamente. Estes são convertidos enzimaticamente em glucose, e noutros açúcares simples, durante o processo de digestão. Assim, os hidratos de carbono complexos produzem uma resposta glicémica atenuada em diabéticos, porque eles são gradualmente convertidos em glucose e absorvidos a uma velocidade reduzida.

Outros hidratos de carbono complexos, tais como fibras, são considerados indigestíveis. Estes hidratos de carbono indigestíveis são tipicamente polissacáridos poliméricos. Estes contêm ligações glicosídicas que as enzimas humanas não são capazes de clivar. Assim, embora os polissacáridos produzam um sentimento de enfiamento no paciente, eles não são digeridos e não conduzem em última instância a uma absorção de glucose.

Tsuji *et al.* demonstraram graficamente qual o impacto que um polissacárido indigestível tinha nos níveis de glucose no sangue num modelo de rato em *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 2253. Este gráfico é a seguir reproduzido para conveniência do leitor:

Esquema 1



Como revisão deste gráfico, a administração oral de glucose produziu um aumento significativo nos níveis de glucose no sangue (um aumento de aproximadamente 5 vezes). Por contraste, o polissacárido indigestível que Tsuji estava a caracterizar, FibersolTM, não produziu essencialmente qualquer alteração nos níveis de glucose no sangue dos animais.

Assim, a expressão "polissacárido indigestível" é um termo da especialidade para cientistas alimentares e nutricionais. É usada para descrever um hidrato de carbono que as enzimas digestivas de um humano são incapazes de converter em glucose, ou noutros açúcares simples. Vários polissacáridos indigestíveis têm sido descritos na literatura. Estes incluem pectinas, celulosas, gomas de plantas (e.g. goma de guar), hemicelulose, polidextrose, goma de xantano, inulina, exudatos de plantas, polissacáridos de algas, celulosas modificadas, amidos modificados (e.g. FibersolTM 2), etc.

Outro hidrato de carbono indigestível está disponível na Hayashibara Co., Ltd., de Okayama, Japão, e é designado por pululano. Hayashibara refere que o pululano é um plástico comestível possuindo propriedades adesivas. Refere que o pululano é seguro para utilização como um ingrediente alimentar. Tem sido utilizado como um agente de textura em temperos, molhos e produtos cárneos. Hayashibara recomenda também a utilização de pululano como uma tinta comestível.

Hayashibara avaliou a digestibilidade do pululano. Refere que o pululano é indigestível, tal como a celulose ou a pectina. Os dados da Tabela 1 foram reproduzidos a partir de um folheto comercial de Hayashibara. Descreve os efeitos de enzimas digestivas no pululano.

Tabela 1

Efeitos de enzimas diferentes no pululano conforme noticiado pelo fabricante Hayashibara Co. Ltd.

| Fonte enzimática | pH | Espécime 1* | | Espécime 2* | |
|---------------------------|-----|-------------|------|-------------|------|
| | | 3 h | 22 h | 3 h | 22 h |
| Intestino delgado porcino | 6,8 | 0 | 0,72 | 0,088 | 0,51 |
| Pâncreas | 5,0 | 0,46 | 0,90 | 1,52 | - |
| Saliva | 6,0 | 0,48 | 2,33 | 0,48 | 2,5 |
| Fígado porcino | 6,8 | 0,72 | - | 0,72 | - |

* Formação de açúcares redutores (em mg) por 20 mg de pululano (i.e. quebra de ligações entre as subunidades de glucose de pululano).

Para além de Hayashibara, outras entidades avaliaram também as propriedades de pululano. A atenção dos leitores é dirigida às Patentes U.S. N^{os} 5116820 e 4629725. Hiji relata que o pululano inibe a absorção de sacarose. Assim, pode ser adicionado a alimentos desenhados para diabéticos com níveis de 0,25% a 5%, com base no peso total do hidrato de carbono presente no alimento. Hiji refere também que a co-administração de ácido gimnémico melhora as propriedades antiabsorção do pululano.

Kimoto *et al.* publicaram os resultados de um ensaio de segurança em animais realizado com pululano, *Food and Chemical Toxicology* 23, (1997) 323-329. Kimoto refere também que o pululano é um polissacárido indigestível. Na página 324, Kimoto *et al.* relatam que foi gerado um mínimo de glucose por pululano quando exposto a enzimas.

A Patente U.S. N^o 4629725 revela um método de inibição do aumento no teor de açúcar no sangue, que usualmente resulta da ingestão de produtos alimentares contendo amido e/ou sacarose, por adição de pululano ao produto alimentar numa razão em peso de pululano para amido e/ou sacarose de 1:400 a 1:20. Revela ainda um produto alimentar contendo amido e/ou sacarose ao qual se adiciona pululano numa razão em peso de pululano para amido e/ou sacarose de 1:400 a 1:20.

A Patente U.S. Nº 3875308 revela a utilização de pululano para substituir amido em alimentos sólidos e líquidos de modo a reduzir o valor calórico do alimento.

Assim, uma leitura correcta da especialidade anterior é que o pululano é reportado como um polissacárido indigestível. Isto significa que os humanos não converterão pululano em glucose e a ingestão de pululano não aumentará os níveis de glucose no soro. Assim, embora a literatura ensine que o pululano pode ter eficácia como fibra, não motivaria ninguém para a utilização de pululano como hidrato de carbono de digestão lenta. A especialidade anterior ensina que uma tal utilização seria fútil porque os humanos são incapazes de converter pululano em glucose ou noutros açúcares simples.

Sumário de invento

De acordo com o presente invento, descobriu-se que a literatura tem caracterizado erradamente o pululano. O pululano não é um hidrato de carbono indigestível. De facto, descobriu-se que o pululano é um hidrato de carbono de digestão lenta. Isto significa que as enzimas humanas convertem gradualmente pululano em glucose. A conversão gradual de pululano em glucose resultará num aumento gradual nos níveis de glucose no sangue num humano.

A descoberta desta caracterização errada significa que os requerentes identificaram várias novas utilizações para o pululano. Como hidrato de carbono de digestão lenta, podem-se incorporar quantidades substanciais do pululano em produtos de substituição de refeições desenhados para diabéticos, proporcionando deste modo uma resposta glicémica atenuada. O pululano pode ser incorporado em produtos de substituição de refeições, tais como bebidas e barras.

Também se pode utilizar o pululano para controlo de hipoglicemia nocturna em diabéticos necessitados de uma tal terapia.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 apresenta a resposta glicémica de ratos Zucker alimentados com pululano e maltodextrina conforme descrito no Exemplo IV.

A Figura 2 apresenta a alteração incremental nos níveis de glicose no sangue conforme descrito no Exemplo IV.

A Figura 3 é apresentada para fins comparativos. Revela resultados publicados pela Pfizer Inc., "Polydextrose food additive petition", New York: Pfizer Inc., 1978 (FDA petition (A3441). Compara a resposta glicêmica produzida por glicose e pelo polissacárido indigestível, polidextrose, em sujeitos diabéticos na maturidade - fase inicial. Conforme ilustrado na Figura 3, o hidrato de carbono indigestível não teve essencialmente qualquer efeito sobre os níveis de glicose no sangue de sujeitos (*i.e.*, o composto não foi convertido em glicose).

A Figura 4 apresenta a resposta glicêmica de sujeitos humanos alimentados com maltodextrina e pululano conforme descrito no Exemplo V.

Descrição detalhada do invento

Conforme utilizado neste pedido de patente, os termos seguintes têm os significados a seguir especificados, a não ser onde especificado em contrário. O plural e o singular deverão ser considerados para terem os mesmos significados, independentemente da quantidade:

- a) "Resposta glicêmica relativa" (GI) é calculada dividindo a área sob a curva (AUC) incremental de glicose no sangue do alimento de teste pela AUC incremental de glicose no sangue do alimento de referência e multiplicando por 100, onde o teor em hidrato de carbono dos alimentos de teste e de referência são o mesmo. O alimento de referência é tipicamente glicose ou pão branco, que tem a GI padrão de 100.
- b) "Uma resposta glicêmica atenuada" refere-se a uma redução na "resposta glicêmica relativa" quando comparada com uma dose equivalente de glicose.
- c) "Hipoglicemia" refere-se a uma diminuição na concentração de glicose no plasma até um nível suficiente para produzir sintomas, com atenuação de sintomas com a restauração da concentração de glicose normal.
- d) "DM" refere-se a diabetes *mellitus* e é descrita em detalhe em Joslin's Diabetes Mellitus. Kahn e Weir (eds.) 1994.

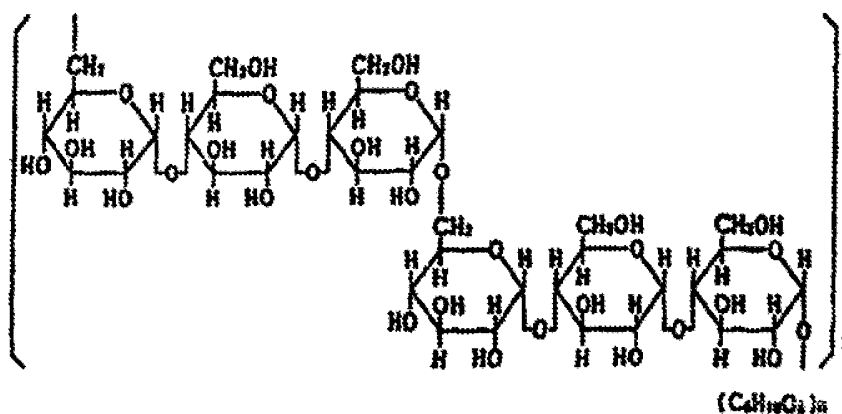
- e) "Hidrato de carbono indigestível" refere-se a um hidrato de carbono que é resistente a digestão endógena no tracto digestivo superior de humano, ou de qualquer animal não ruminante.
- f) Os termos "hidrato de carbono indigestível", "polissacárido indigestível", "hidrato de carbono não digestível" e "polissacárido não digestível" deverão ser considerados como sinónimos.
- g) "Hidrato de carbono de digestão lenta" refere-se a um hidrato de carbono que tem uma velocidade lenta de digestão, em que o padrão dourado é amido de milho em bruto e, mais especificamente, tem uma velocidade de digestão que é mais lenta do que o amido de milho hidrolisado (por exemplo Lodex 15® da Cerester).
- h) "Hidrato de carbono de digestão rápida" refere-se a um hidrato de carbono que é digerido rapidamente, e.g. maltodextrina não modificada (por exemplo Lodex 15® da Cerester) e é digerido a uma velocidade igual ou mais rápida do que uma maltodextrina não modificada, tal como Lodex 15®.
- i) O termo "calorias totais" refere-se ao teor calórico total de um peso ou volume definido do produto nutricional acabado.
- j) O termo "produto de substituição de refeição" e o termo "produto nutricional" deverão ser considerados como sinónimos.
- k) O termo "teor em hidrato de carbono total" refere-se à soma de todos os componentes de hidrato de carbono, definidos analiticamente como Sólidos Totais - (Cinza + Gordura + Proteína).
- l) O termo "Ingestões diárias de referência ou RDI" refere-se a um conjunto de referências dietéticas com base nas "Recommended Dietary Allowances" para vitaminas essenciais e minerais. As "Recommended Dietary Allowances" são um conjunto de permissões estimadas em nutrientes estabelecidas pela National Academy of Sciences, que são actualizadas periodicamente para reflectir o conhecimento científico corrente.
- m) O termo "paciente" refere-se a humanos, cães, gatos e qualquer outro animal não ruminante.
- n) Qualquer referência a um intervalo numérico neste pedido de patente deverá ser considerada como estando modificada pelo adjectivo "cerca de". Além disso,

qualquer intervalo numérico deverá ser considerado para proporcionar suporte para uma reivindicação dirigida a um subconjunto desse intervalo. Por exemplo, uma revelação de um intervalo de 1 a 10 deverá ser considerado para proporcionar suporte no fascículo e reivindicações a qualquer subconjunto nesse intervalo (*i.e.*, intervalos de 2-9, 3-6, 4-5, 2,2-3,6, 2,1-9,9, etc.).

Conforme anteriormente salientado, a especialidade anterior tem caracterizado erradamente o pululano. A literatura contém resultados em animais documentando que o pululano é um hidrato de carbono não digestível. Como será demonstrado na secção experimental deste pedido de patente, esta caracterização está incorrecta. Os requerentes demonstraram, em humanos, que o pululano é um hidrato de carbono de digestão lenta.

O pululano é um polissacárido viscoso, solúvel em água, um alfa-glucano, consistindo de unidades de glucose com uma estrutura linear relativamente simples, isto é, unidades de três moléculas de glucose alfa-1,4-ligadas que são repetidamente polimerizadas por ligações alfa-1,6 na glucose terminal. Amidos alimentares típicos, tais como amido de milho, consistem de 27% de amilose (moléculas de glucose alfa-1,4-ligadas) e 73% de amilopectina, que contém ambas as ligações alfa-1,4- e alfa-1,6-glucose. Para pululano, no entanto, a ligação alfa-1,6 serve para reticular cadeias curtas individuais resultando numa estrutura em degrau (Estrutura A). Como o pululano tem um peso molecular médio de 50 000-500 000, *n* na Fig. 2 varia de 300 a 3000. Kimoto *et al.*, *Food and Chemical Toxicology* 35 (1997) 323-329.

Estrutura A



O pululano é elaborado extracelularmente pela levedura negra, *Aureobasidium pululanos*. É produzido por cultura desta mesma levedura num meio com suficientes fontes de carbono e azoto e minerais, sob arejamento. O pululano é recuperado a partir do fluido de cultura por centrifugação. É depois tipicamente fraccionado com álcool e purificado como é conhecido na especialidade, Kimoto *et al.*, *supra*. O pululano está também disponível comercialmente na Hayashibara Co. Ltd. de Okayama, Japão.

Conforme salientado anteriormente, constatou-se que o pululano é um hidrato de carbono de digestão lenta. Este efeito pode ser conseguido com qualquer das moléculas de pululano possuindo os pesos moleculares descritos acima. De acordo com a utilização do presente invento, pode-se administrar um produto de substituição de refeições contendo o pululano onde o pululano é uma mistura de pululano com pesos moleculares variáveis. Se desejado, podem-se também utilizar materiais altamente purificados de um único peso molecular.

Os efeitos benéficos que o pululano tem sobre os níveis de glucose no sangue de um diabético podem ser conseguidos de várias formas. Se desejado, de acordo com a utilização do presente invento, pode-se administrar um produto de substituição de refeições contendo o pululano, onde o pululano está sem qualquer transportador. A dose diária total para o diabético variará grandemente mas, tipicamente, um diabético beneficiará de um consumo de 1-150 g/dia de pululano.

Embora o pululano possa ser administrado como uma entidade única, de acordo com a menção, será incorporado em produtos de substituição de refeições e consumido pelo diabético durante as suas refeições ou lanches. Se desejado, os diabéticos podem simplesmente modificar a receita de alimentos que consomem normalmente. Eles podem simplesmente substituir a glucose, e outros hidratos de carbono de digestão rápida, por uma quantidade equivalente de pululano. A substituição dos açúcares de digestão rápida por pululano reduzirá significativamente o índice glicémico do alimento.

Embora uma tal estratégia produza alimentos com uma resposta glicémica atenuada, produzirá também uma dieta

relativamente insípida que muitos indivíduos acharão questionável porque o pululano é insípido. Deste modo, numa concretização adicional, o pululano será incorporado em bebidas, barras, que foram desenhadas especificamente para melhorar a palatabilidade do pululano e assim melhorar a aceitação pelo paciente/consumidor.

Tipicamente, o pululano será incorporado em bebidas de substituição de refeições tais como Glucema®, Ensure®, Choice DM®, Slim Fast®, Pediasure®, Glytrol®, Resource® Diabetics, etc. O pululano pode também ser incorporado em barras de substituição de refeições tais como PowerBars®, barras Glucema®, barras Choice DM®, barras Ensure® e barras Boost®, etc. Alternativamente, o pululano pode ser incorporado em sumos, bebidas carbonatadas, água engarrafada, etc. Os métodos para produzir qualquer destes produtos alimentares ou bebidas são bem conhecidos dos peritos na especialidade. A descrição seguinte pretende ilustrar estes produtos de substituição de refeições para diabéticos e a sua preparação.

A maioria dos produtos de substituição de refeições (*i.e.*, barras ou líquidos) proporciona calorias a partir de gordura, hidratos de carbono e proteína. Estes produtos contêm também tipicamente vitaminas e minerais, porque se pretende que sejam adequados para utilização como a única fonte de nutrição. Embora estes produtos de substituição de refeições possam servir como a única fonte de nutrição, tipicamente não são assim utilizados. Os indivíduos consomem estes produtos para substituir uma ou duas refeições de um dia, ou para proporcionar um lanche saudável. Os produtos nutricionais deste invento deverão ser entendidos para incluir qualquer destas concretizações.

A quantidade destes ingredientes nutricionais podem variar grandemente dependendo da população de pacientes a atingir (*i.e.*, diabéticos vs. não diabéticos, considerações organolépticas, preferências culturais, utilização, etc.). No entanto, como linha de orientação geral não limitante, os produtos de substituição de refeições deste invento conterão as quantidades relativas seguintes de proteína, gordura e hidrato de carbono (com base na percentagem relativa de calorias totais):

Tabela 2

Intervalos de componentes da formulação nutricional

| Componente | Intervalo preferido (% de Calorias) | Intervalo mais preferido (% de Calorias) |
|--------------------------------|--|--|
| Fonte de proteína | 0 - 35 | 15 - 25 |
| Fonte de gordura | ≤ 55 | 10 - 40 |
| Sistema de hidrato de carbono* | 25 - 100 | 25 - 55 |

* incluindo pululano

A novidade destes produtos de substituição de refeições é a utilização de pululano para proporcionar uma fonte significativa de calorias de hidrato de carbono. Conforme salientado anteriormente, o hidrato de carbono proporcionará de cerca de 25-80% das calorias totais. Deverá ser incorporado pululano suficiente no produto tal que o pululano proporcione de 10 a 50% de calorias de hidrato de carbono totais.

A porção restante do sistema de hidrato de carbono (*i.e.*, um ou mais hidratos de carbono incluindo pululano) pode ser proporcionada por qualquer sistema de hidrato de carbono adequado para humanos, tendo em conta quaisquer restrições dietéticas relevantes para um diabético. Exemplos de hidratos de carbono adequados que podem ser utilizados incluem amido, amido modificado, amido de milho hidrolisado, maltodextrina, polímeros de glucose, sacarose, sólidos de xarope de milho, glucose, frutose, lactose, xarope de milho de alto teor em frutose, fruto-oligossacáridos, mel, fibras dietéticas, álcoois de açúcar (*e.g.*, maltitol).

As misturas especializadas de hidrato de carbono têm sido desenhadas para diabéticos para ajudar a moderar os seus níveis de glucose no sangue. Exemplos destas misturas de hidrato de carbono são descritos na Patente U.S. N° 4921877 de Cashmere *et al.*, Patente U.S. N° 5776887 de Wibert *et al.*, Patente U.S. N° 5292723 de Audry *et al.* e Patente U.S. N° 5470839 de Laughlin *et al.*, cujos conteúdos são aqui todos incorporados por referência. Qualquer destas misturas de hidrato de carbono pode ser utilizada em associação com pululano para reduzir adicionalmente o índice glicémico do produto.

Se desejado, podem-se também incorporar hidratos de carbono não absorventes no sistema de hidrato de carbono. Estes hidratos de carbono não absorventes constituirão uma quantidade menor ou igual a cerca de 20% p/p do sistema de hidrato de carbono e, mais tipicamente, uma quantidade menor ou igual a cerca de 15% p/p do sistema de hidrato de carbono. O termo "hidratos de carbono não absorventes" refere-se a uma porção hidrato de carbono com um grau de polimerização superior a cerca de 20 e/ou um peso molecular superior a cerca de 3600, que é resistente a digestão endógena no tracto digestivo superior de humano. Os hidratos de carbono não absorventes possuem muitas das características de fibra dietética total. No entanto, não são quantificáveis pelo método AACC 32-07 para fibras e, conseqüentemente, não são incluídos nos valores de fibra dietética total do presente invento. Exemplos de fontes de hidratos de carbono não absorventes do presente invento incluem tipicamente amidos modificados quimicamente tais como Fibersol, polidextrose e inulina.

Tipicamente, o sistema de hidrato de carbono conterá também fibra dietética. A quantidade de fibra dietética pode variar significativamente mas estará tipicamente no intervalo de 3 a 20% p/p do sistema de hidrato de carbono (com base no peso seco). Fibra dietética, conforme aqui utilizado e nas reivindicações, é entendido como todos os componentes de um alimento que não são quebrados por enzimas endógenas, no tracto digestivo humano, em moléculas pequenas que são absorvidas na corrente sanguínea. Estes componentes alimentares são sobretudo celulosas, hemicelulosas, pectina, gomas, mucilagens e lenhinas. As fibras diferem significativamente na sua composição química e estrutura física e, deste modo, nas suas funções fisiológicas.

As propriedades de fibras (ou sistemas de fibras) que têm impacto na função fisiológica são a solubilidade e a fermentabilidade. No que se refere à solubilidade, a fibra pode ser dividida nos tipos solúvel e insolúvel, com base na capacidade da fibra para ser solubilizada numa solução tampão a um pH definido. As fontes de fibra diferem na quantidade de fibra solúvel e insolúvel que contêm. Conforme aqui utilizadas e nas reivindicações, as fibras dietéticas "solúvel" e "insolúvel" são determinadas utilizando o Método da American Association of Cereal Chemists (AACC) 32-07.

Conforme aqui utilizada e nas reivindicações, "fibra dietética total" ou "fibra dietética" é entendida como a soma das fibras solúvel e insolúvel determinadas pelo Método AACC 32-07 e onde, em peso, pelo menos 70% da fonte de fibra é constituído por fibra dietética. Conforme aqui utilizada e nas reivindicações, uma fonte de fibra dietética solúvel é uma fonte de fibra em que pelo menos 60% da fibra dietética é fibra dietética solúvel conforme determinado pelo Método AACC 32-07, e uma fonte de fibra dietética "insolúvel" é uma fonte de fibra em que pelo menos 60% da fibra dietética total é fibra dietética insolúvel conforme determinado pelo Método AACC 32-07.

Representativos de fontes de fibra dietética solúvel são goma-arábica, carboximetilcelulose sódica, goma guar, pectina de citrino, pectina de baixo e de alto teor em metoxi, glucanos de aveia e cevada, carragenano e psílio. Estão disponíveis numerosas fontes comerciais de fibras dietéticas solúveis. Por exemplo, goma-arábica, carboximetilcelulose, goma guar, pectina e as pectinas de baixo e de alto teor em metoxi estão disponíveis na TIC Gums, Inc. de Belcamp, Maryland. Os glucanos de aveia e cevada estão disponíveis na Mountain Lake Specialty Ingredients, Inc. de Omaha, Nebraska. O psílio está disponível na Meer Corporation de North Bergen, New Jersey enquanto o carragenano está disponível na FMC Corporation de Philadelphia, Pennsylvania.

Representativas das fibras dietéticas insolúveis são fibra de casca de aveia, fibra de casca de ervilha, fibra de casca de soja, fibra de cotilédone de soja, fibra de cana-de-açúcar, celulose e farelo de milho. Estão também disponíveis numerosas fontes para as fibras dietéticas insolúveis. Por exemplo, o farelo de milho está disponível na Quaker Oats de Chicago, Illinois; a fibra de casca de aveia na Canadian Harvest de Cambridge, Minnesota; a fibra de casca de ervilha na Woodstone Foods de Winnipeg, Canada; a fibra de casca de soja e a fibra de casca de aveia no The Fibrad Group de LaVale, Maryland; a fibra de cotilédone de soja na Protein Technologies International de St. Louis, Missouri; a fibra de cana-de-açúcar na Delta Fiber Foods de Minneapolis, Minnesota e a celulose na James River Corp. de Saddle Brook, New Jersey.

Uma descrição mais detalhada de fibras e a sua incorporação na formulação podem ser encontradas na Patente U.S. N° 5085883 publicada de Garleb *et al.*, que é aqui incorporada por referência.

Para além da fibra, os produtos de nutrição podem também conter oligossacáridos indigestíveis tais como fruto-oligossacáridos (FOS). Os oligossacáridos indigestíveis são rapidamente e extensivamente fermentados em ácidos gordos de cadeia curta por microrganismos anaeróbios que habitam o intestino grosso. Estes oligossacáridos são fontes de energia preferenciais para a maioria das espécies de *Bifidobacterium*, mas não são utilizados por organismos potencialmente patogénicos tais como *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, ou *E. coli*. O termo "oligossacárido indigestível" refere-se a uma pequena porção de hidrato de carbono com um grau de polimerização menor ou igual a cerca de 20 e/ou um peso molecular menor ou igual a cerca de 3600, que é resistente a digestão endógena no tracto digestivo superior de humano.

Os produtos de substituição de refeições contêm também tipicamente uma fonte de proteína. A fonte de proteína pode conter proteínas intactas, proteínas hidrolisadas, aminoácidos, ou alguma sua combinação. As proteínas que podem ser utilizadas nos produtos nutricionais incluem qualquer proteína adequada para consumo humano. Estas proteínas são bem conhecidas dos peritos na especialidade e podem ser prontamente seleccionadas quando se preparam estes produtos. Exemplos de proteínas adequadas que podem ser utilizadas incluem tipicamente caseína, soro de leite, proteína de leite, soja, ervilha, arroz, milho, proteína hidrolisada e suas misturas. Fontes de proteína comerciais estão prontamente disponíveis e conhecidas de um praticante especial. Por exemplo, caseinatos, soro de leite, caseinatos hidrolisados, soro de leite hidrolisado e proteínas de leite estão disponíveis na New Zealand Milk Products de Santa Rosa, California. As proteínas de soja e de soja hidrolisadas estão disponíveis na Protein Technologies International de Saint Louis, Missouri. A proteína de ervilha está disponível na Feinkost Ingredients Company de Lodi, Ohio. A proteína de arroz está disponível na California Natural Products de Lathrop, California. A proteína de milho está disponível na EnerGenetics Inc. de Keokuk, Iowa.

O terceiro componente dos produtos nutricionais deste invento é a gordura. A fonte de gordura para o presente invento pode ser qualquer fonte de gordura ou mistura de fontes de gordura adequada para consumo humano. Tipicamente, a gordura proporciona os níveis desejados de ácidos gordos saturados, poli-insaturados e mono-insaturados. Um perito na especialidade pode facilmente calcular a quantidade de uma fonte de gordura que deverá ser adicionada ao produto nutricional de modo a entregar os níveis desejados de ácidos gordos saturados, poli-insaturados e mono-insaturados. Exemplos de gorduras de grau alimentar são bem conhecidos na especialidade e incluem tipicamente óleo de soja, azeite, óleo marinho, óleo de girassol, óleo de girassol altamente oleico, óleo de açafrão, óleo de açafrão altamente oleico, óleo de coco fraccionado, óleo de algodão, óleo de milho, óleo de colza, óleo de palma, óleo de palmito, óleo de linhaça, triglicéridos de cadeia média (MCT) e suas misturas. Se desejado, podem-se incorporar lípidos estruturados no produto nutricional.

Numerosas fontes comerciais para as gorduras anteriormente listadas estão prontamente disponíveis e são conhecidas de um praticante da especialidade. Por exemplo, óleos de soja e colza estão disponíveis na Archer Daniels Midland de Decatur, Illinois. Os óleos de milho, coco, palma e palmito estão disponíveis na Premier Edible Oils Corporation de Portland, Oregon. O óleo de coco fraccionado está disponível na Henkel Corporation de LaGrange, Illinois. Os óleos de açafrão e de girassol altamente oleicos estão disponíveis na SVO Specialty Products de Eastlake, Ohio. O óleo marinho está disponível na Mochida International de Tokyo, Japão. O azeite está disponível na Anglia Oils de North Humberstone, Reino Unido. Os óleos de girassol e algodão estão disponíveis na Cargil de Minneapolis, Minnesota. O óleo de açafrão está disponível na California Oils Corporation de Richmond, California. Os lípidos estruturados estão disponíveis na Stepan Oils, com escritórios nos Estados Unidos, e que pode ser contactada em www.stepan.com.

As composições nutricionais do invento contêm tipicamente vitaminas e minerais. As vitaminas e minerais são considerados como essenciais na dieta diária. Os peritos na especialidade reconhecem que têm sido estabelecidos requisitos mínimos para certas vitaminas e minerais,

conhecidos como necessários para a função fisiológica normal. Os praticantes compreendem também que é necessário fornecer às composições nutricionais quantidades adicionais apropriadas de ingredientes de vitaminas e minerais, para compensar alguma perda durante o processamento e armazenamento destas composições. Adicionalmente, o praticante compreende que certos micronutrientes, tais como crómio, carnitina, taurina e vitamine E, podem ter um benefício potencial para pessoas com diabetes, e que podem existir requisitos dietéticos mais elevados para certos micronutrientes, tais como ácido ascórbico, devido a uma maior rotação em pessoas com diabetes do tipo 2.

Um exemplo do sistema de vitaminas e minerais para um produto nutricional completo, utilizado como uma fonte única de nutrição, constitui tipicamente pelo menos 100% da RDI para as vitaminas A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, D, E, K, beta-caroteno, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, niacina, e colina; os minerais cálcio, magnésio, potássio, sódio, fósforo, e cloreto; os minerais vestigiários ferro, zinco, manganês, cobre, e iodo; os minerais ultra-vestigiários crómio, molibdénio, selénio; e os nutrientes condicionalmente essenciais m-inositol, carnitina e taurina, em de cerca de 350 kcal a cerca de 5600 kcal.

Um exemplo do sistema de vitaminas e minerais para um produto nutricional, utilizado como um suplemento nutricional, constitui tipicamente pelo menos 25% da RDI para as vitaminas A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, D, E, K, beta-caroteno, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, niacina, e colina; os minerais cálcio, magnésio, potássio, sódio, fósforo, e cloreto; os minerais vestigiários ferro, zinco, manganês, cobre, e iodo; os minerais ultra-vestigiários crómio, molibdénio, selénio; e os nutrientes condicionalmente essenciais m-inositol, carnitina e taurina, numa única dose ou de cerca de 50 kcal a cerca de 800 kcal.

Podem-se também adicionar edulcorantes artificiais ao produto nutricional para melhorar a qualidade organoléptica da formulação. Exemplos de edulcorantes artificiais adequados incluem sacarina, aspartame, acessulfame K e sucralose. Os produtos nutricionais do presente invento incluirão também desejavelmente um aromatizante e/ou um corante para conferir aos produtos nutricionais um aspecto apelativo e um sabor

aceitável para consumo oral. Exemplos de aromatizantes úteis incluem tipicamente, por exemplo, morango, pêssego, manteiga de noz, chocolate, banana, framboesa, laranja, mirtilo e baunilha.

Os produtos nutricionais deste invento podem ser fabricados utilizando técnicas bem conhecidas dos peritos na especialidade. Para produtos líquidos de substituição de refeições, em termos gerais, é preparada uma mistura de um óleo e de fibra contendo óleos inteiros, qualquer emulsionante, fibra e vitaminas solúveis na gordura. Três mais suspensões (hidrato de carbono e duas proteínas) são preparadas separadamente misturando em conjunto o hidrato de carbono e minerais e a proteína em água. As suspensões são depois misturadas conjuntamente com a mistura de óleo. A mistura resultante é homogeneizada, processada termicamente, normalizada com vitaminas solúveis em água, aromatizada e o líquido é esterilizado terminalmente ou seco para produzir um pó. Alternativamente, a formulação homogeneizada pode ser mantida não diluída e utilizada para enchimento em recipientes apropriados como pudim ou seca para formar um pó. O produto é depois embalado. Tipicamente, a embalagem proporcionará indicações para utilização pelo consumidor final (*i.e.*, a ser consumido por um diabético).

Podem também ser fabricadas composições nutricionais sólidas, tais como barras, utilizando técnicas conhecidas dos peritos na especialidade. Por exemplo, estas podem ser fabricadas utilizando tecnologia de extrusão a frio como é conhecido na especialidade. Para preparar estas composições, tipicamente, todos os componentes em pó serão misturados a seco em conjunto. Estes constituintes incluem tipicamente as proteínas, pré-misturas de vitaminas, certos hidratos de carbono, etc. Os componentes solúveis em gordura são depois misturados em conjunto e misturados com a pré-mistura em pó anterior. Finalmente, são depois misturados na composição quaisquer componentes líquidos, formando uma composição do tipo plástico ou massa.

O processo anterior pretende proporcionar uma massa plástica que possa depois ser enformada, sem a ocorrência de outras alterações físicas ou químicas, pelo procedimento conhecido tal como enformação ou extrusão a frio. Neste

processo, a massa plástica é forçada, a uma pressão relativamente baixa, através de uma matriz, o que confere a forma desejada. O extrudido resultante é depois cortado numa posição apropriada para proporcionar produtos com o peso desejado. Se desejado, o produto sólido é depois revestido, para melhorar a palatabilidade, e embalado para distribuição. Tipicamente, a embalagem proporcionará indicações para utilização pelo consumidor final (*i.e.*, a ser consumido por um diabético).

Conforme salientado anteriormente, o pululano pode também ser incorporado em sumos, bebidas não carbonatadas, bebidas carbonatadas, águas com aromas (aqui depois colectivamente "bebida"), etc. O pululano proporcionará de 10 a 50% das calorias de hidrato de carbono totais das bebidas. Os métodos para produção destas bebidas são bem conhecidos na especialidade. Remete-se a atenção do leitor para as Patentes U.S. N^{os} 6178980 e 5792502, cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados por referência. Por exemplo, todos os hidratos de carbono, incluindo o pululano, são dissolvidos num volume apropriado de água. Adicionam-se depois opcionalmente aromas, corantes, vitaminas, etc. A mistura é depois pasteurizada, embalada e armazenada até à expedição.

Exemplo I do invento

Um método para rastrear hidratos de carbono quanto à sua adequabilidade para inclusão em dietas de diabético consiste em determinar a velocidade a que estes são digeridos, por enzimas animais ou humanas, num modelo de digestão *in vitro*. Esta técnica é bem conhecida na especialidade e foi descrita por Muir e O'Dea em *American Journal of Clinical Nutritional* (1992) 56: 123-127 e *American Journal of Clinical Nutritional* (1993) 57: 540-546. Esta análise foi realizada inicialmente com o pululano. Uma amostra de pululano foi tratada termicamente em autoclave durante 10 minutos a 15 psi e 121°C, para replicar condições rotineiramente utilizadas na fabricação de alimentos.

Obtiveram-se os resultados seguintes:

Tabela A
Digestão de pululano *in vitro* *

| % de pululano digerido | | | | | | |
|------------------------|-----|-------|------|-------|------|------|
| Ingrediente | 0 h | 0,5 h | 1 h | 2,5 h | 5 h | 15 h |
| Pululano "cru" | 0,0 | 24,2 | 27,6 | 42,4 | 56,5 | 90,9 |
| Pululano "cozinhado" | 0,1 | 31,5 | 31,8 | 44,3 | 50,5 | 86,9 |

* Percentagem de amido digestível, expressa como uma percentagem de peso de ingrediente, determinada pelo método de Muir e O'Dea (sistema de enzimas α -amilase e amiloglucosidase; 1992); foi mostrado que uma incubação *in vitro* de 15 horas se correlacionava com a quantidade de amido que se escapava à digestão no intestino delgado (Muir e O'Dea 1993). Os valores no instante 0 representam a percentagem de glucose livre nas amostras. Todos os valores são médias de amostras em duplicado.

Surpreendentemente, constatámos que o pululano era digestível, contrariamente à especialidade anterior. Similarmente ao amido de milho não cozinhado, o pululano exibiu uma velocidade lenta de digestão *in vitro*. No entanto, o pululano manteve a sua velocidade lenta de digestão *in vitro* após ser cozinhado, o que torna o amido de milho de digestão rápida.

Exemplo II

Com base nos resultados surpreendentes reportados no Exemplo I, repetiu-se a experiência com amostras adicionais de pululano de vários pesos moleculares. Em termos comparativos, testou-se também glucose. Apresentam-se a seguir os resultados para o amido de milho conforme reportados na literatura.

Tabela B

Digestão de amido *in vitro* (método descrito por Muir e O'Dea) de pululano *

| % de amido digerido (base seca) tempo de digestão de amido | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ingrediente | 0 h | 0,5 h | 1 h | 2,5 h | 5 h | 15 h |
| Glucose | 110,8 | 101,5 | 100,3 | 100,2 | 102,4 | 103,0 |
| Glucose, C | 101,5 | 90,9 | 104,5 | 91,4 | 96,7 | 91,1 |
| PF20 | 4,9 | 13,1 | 18,0 | 39,3 | 48,0 | 93,7 |
| PF20, C | 5,9 | 16,6 | 20,9 | 45,0 | 53,6 | 95,5 |
| Pl20 | 1,2 | 13,1 | 17,3 | 41,7 | 53,6 | 103,0 |
| Pl20, C | 1,1 | 13,5 | 19,4 | 42,6 | 54,4 | 96,0 |

* Os valores são médias de análises em duplicado. Percentagem de amido digestível, expressa como uma percentagem de peso de ingrediente, determinada pelo método de Muir e O'Dea (sistema de enzimas α -amilase e amiloglucosidase; 1992); foi mostrado que uma incubação *in vitro* de 15 horas se correlacionava com a quantidade de amido que se escapava à digestão no intestino delgado (Muir e O'Dea 1993). Os valores no instante 0 representam a percentagem de glucose livre nas amostras. C = cozinhado. PF20 = pululano de grau alimentar, PM de 200000. Pl20 = pululano de grau farmacêutico, PM de 200000.

Como controlo, testou-se glucose e produziu o resultado esperado. Graus diferentes de pululano actuaram como hidrato de carbono de digestão lenta.

Exemplo III

Este exemplo descreve outros trabalhos *in vitro* realizados com pululano.

Tabela C

Digestão de amido *in vitro* (método descrito por Muir e O'Dea) de pululano *

| Ingrediente | % de amido digerido (base seca) | | | | | |
|----------------|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | tempo de digestão de amido | | | | | |
| | 0 h | 0,5 h | 1 h | 2,5 h | 5 h | 15 h |
| Amido de milho | 0±0 | 30,4±0,9 | 30,1±0,3 | 55,2±1,8 | 62,4±1,2 | 78,4±0,3 |
| Glucose, C | 95 | 97,8 | 100 | 102 | 108,3 | 108 |
| PA, C | 3,0 | 30,8 | 33,8 | 34,1 | 41,4 | 70,2 |
| PB, C | 2,3 | 27,2 | 25,8 | 31,5 | 54 | 59,8 |
| PC, C | 2,3 | 17,1 | 19,4 | 21,5 | 35 | 59,2 |
| PF10, C | 14 | 24,5 | 56,4 | 61,2 | 77,4 | 91,8 |

* Dados históricos de amido de milho cru da Sigma. Percentagem de amido digestível, expressa como uma percentagem de matéria seca de ingrediente, determinada pelo método de Muir e O'Dea (sistema de enzimas α -amilase e amiloglucosidase; 1992); foi mostrado que uma incubação *in vitro* de 15 horas se correlacionava com a quantidade de amido que se escapava à digestão no intestino delgado (Muir e O'Dea 1993). Os valores no instante 0 representam a percentagem de glucose livre nas amostras. C = cozinhado. Os valores para glucose e pululano são médias de análises em triplicado. PA = pululano, PM de 6010. PB = pululano, PM de 13900. PC = pululano, PM de 49200. PF10 = pululano de grau alimentar, PM de 100000.

Os diferentes pesos moleculares de pululano foram todos digeridos a uma velocidade lenta e teriam eficácia num produto alimentar.

Exemplo IV

O exemplo seguinte ilustra a capacidade de pululano para funcionar como um hidrato de carbono de digestão lenta num modelo animal de diabetes *mellitus* tipo 2 (resistência à insulina).

O objectivo desta experiência era comparar a resposta glicémica pós-prandial de ratos Zucker machos *fa/fa* gordos alimentados com pululano *versus* maltodextrina. Obtiveram-se vinte ratos Zucker machos *fa/fa* gordos com cinco semanas de idade na Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, IN). Os ratos foram alojados individualmente em gaiolas de Naglene

suspensas sobre uma cama seca (Sani-Chips, Harlan Teklad) e foi-lhes dado acesso *ad libitum* a água e a ração para rato (em peletes; Rodent Diet 8640 Harlan Teklad 22/5; Harlan Teklad, Madison, WI). A instalação de alojamento foi mantida a 19 a 23°C, 30 a 70% de humidade relativa e com um ciclo de luz-escuridão de 12 horas. Os ratos foram manuseados 4 a 5 vezes por semana durante 3 semanas antes desta experiência de modo a habituá-los ao manuseamento por humanos para a experiência. Além disso, os ratos foram treinados para consumirem oralmente uma solução de hidrato de carbono líquido via seringa para o teste de tolerância à refeição. O protocolo de utilização de animais foi revisto e aprovado pelo Comité para os Cuidados com Animais da Ohio State University.

O teste de controlo foi um desafio com maltodextrina (Lodex® 15; Cerestar USA Inc., Hammond, IN) com ~0,9 g/kg de peso corporal. O Lodex® foi colocado numa solução a 25% (p/v) com água antes do desafio (volume total 10 ml). Similarmente, preparou-se uma solução de pululano (Sigma, St. Louis, MO) a 25% (p/p) (peso total 14 g). Aqueceram-se ambos os tratamentos num micro-ondas durante 30 segundos no máximo para solubilizar completamente as soluções de hidrato de carbono 2 horas antes do teste.

Os dois tratamentos dietéticos foram avaliados num desenho em paralelo (10 ratos por tratamento). Na altura do teste, os ratos pesavam 275±5,5 g (Média±EP) e tinham 8 semanas de idade. Após uma noite em jejum de 16 horas, submeteram-se os ratos a um teste de tolerância à refeição. Os ratos foram alimentados aleatoriamente com um de dois tratamentos dietéticos (1 ml) *per os*. Todos os ratos consumiram a dieta num período de 10 minutos. Colheram-se amostras de sangue na linha de base e 30, 60, 90, 120 e 180 minutos pós-prandial para análise de glucose (Precision G®; Medisense, Bedford, MA). Os ratos tiveram acesso livre a água ao longo da experiência.

As amostras de sangue foram obtidas via veia caudal e aproximadamente 5 µl de sangue foram transferidos imediatamente para uma fita de teste de glucose no sangue Precision G® e analisados quanto à concentração de glucose no sangue. Utilizou-se sangue inteiro, porém, o instrumento Precision G corrige a medição de glucose e proporciona os

resultados como mg de glucose/dl de plasma.

Resultados

Na Figura 1 pode-se observar a resposta glicêmica pós-prandial de ratos Zucker machos *fa/fa* gordos alimentados com maltodextrina ou pululano, e na Figura 2 pode-se observar a alteração incremental da glucose no sangue desde a linha de base. Os valores basais de glucose no sangue não foram diferentes (116±5 vs. 115±5 mg/dl; maltodextrina vs. pululano, respectivamente). A alteração incremental da glucose no sangue desde a linha de base foi reduzida ($P < 0,01$) em 45% para ratos alimentados com pululano aos 30 minutos pós-prandial (Figure 2). Calculou-se a área sob a curva (AUC) (Wolever e Jenkins, "The use of glycemic index in predicting the blood glucose response to mixed meals". *Am. J. Clin. Nutr.* 1986, 43, 167-172.) e constatou-se que era inferior ($P < 0,05$) para ratos alimentados com pululano (AUC às 3 horas 4812±581 vs. 2889±486, maltodextrina e pululano, respectivamente).

Exemplo V

O objectivo principal era determinar a resposta glicêmica pós-prandial de adultos saudáveis não diabéticos ao pululano e maltodextrina.

Foram arrolados no estudo trinta e seis sujeitos adultos saudáveis que satisfaziam todos os critérios de elegibilidade. Vinte e oito sujeitos completaram o protocolo. A experiência seguiu um desenho cruzado, duplamente cego, dois períodos, dois tratamentos, com um mínimo de uma depuração de quatro dias entre tratamentos. Os sujeitos regressaram em 14 dias para uma repetição da análise com o tratamento cruzado apropriado. Os sujeitos foram randomizados em números iguais para estudar as sequências de estudo utilizando atribuições aleatórias geradas por computador.

Os sujeitos que satisfizeram os critérios de elegibilidade foram instruídos para consumir uma dieta de elevado teor em hidrato de carbono (mais do que 150 g de hidrato de carbono por dia) em cada um dos três dias antes de cada teste. A ingestão de alimento foi registada em diários de dieta por cada sujeito para estimar o consumo de hidrato

de carbono. À noite, antes do teste de tolerância à glucose da refeição, os sujeitos consumiram um jantar de baixo teor em resíduos consistindo de uma lata de 8 fl oz (237 ml) de chocolate Ensure Plus® com barras energéticas e nutricionais Ensure® adicionais para proporcionar cerca de um terço da necessidade calórica diária individual de cada sujeito, conforme estimada pela equação de Harris-Benedict (Harris e Benedict, *A biometric study of basal metabolism in man*; Carnegie Institute: Washington, D.C, pp. 227 (Publ. No. 279), 1919), multiplicada por um factor de actividade de 1,3. Os sujeitos jejuaram durante a noite (10 a 16 horas) antes do teste. Durante o jejum, apenas se permitiu que os sujeitos consumissem água. Foi proibido fumar. Os sujeitos não fizeram exercício durante o período de 24 horas antes do teste de tolerância à glucose da refeição.

Na manhã seguinte a um jejum durante a noite, os sujeitos vieram ao laboratório de ensaio e relaxaram pelo menos 30 minutos antes da colheita de uma amostra de sangue de linha de base. O sangue foi obtido por picada no dedo (auto-administrada a não ser que o sujeito solicitasse o contrário; utilizando um dispositivo de lancetar esterilizado) imediatamente antes do teste de tolerância à glucose da refeição. Os sujeitos consumiram depois o produto de teste apropriado num período de tempo de 10 minutos e obtiveram-se amostras de sangue adicionais durante o teste de tolerância à glucose da refeição, via picada no dedo auto-administrada, aos 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos pós-prandial dentro de ± 5 minutos em cada instante de tempo. Mediu-se a glucose capilar no sangue utilizando um analisador YSI (modelo YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer, Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH). A área incremental sob a curva de glucose foi calculada de acordo com Wolever *et al.* (The glycemic index: methodology and clinical implications. *Amer. J. Clin. Nutr.* 1991, 54, 846-854). Os sujeitos registaram as medicações e os dados subjectivos de tolerância gastrointestinal durante as 48 horas posteriores ao teste.

Efectuaram-se os registos dietéticos nos três dias consecutivos antes das visitas do estudo. Os sujeitos registaram a quantidade e tipo de todos os alimentos e líquidos ingeridos durante este período de tempo. O investigador ou coordenador reviu os registos dietéticos com cada sujeito após se completar cada conjunto de registos

dietéticos de 3 dias para assegurar que: 1) tinha sido registada a estimativa mais exacta do tamanho das doses de cada um dos alimentos, e 2) existia informação registada suficiente para estimar a quantidade diária de ingestão de hidrato de carbono para o período de três dias (são necessárias > 150 gramas diariamente).

Na visita prévia, distribuíram-se aos sujeitos produtos comerciais Ensure® para as refeições da noite precedendo a Visita 1 e a Visita 2. Os sujeitos foram questionados quanto ao cumprimento destas refeições nocturnas, o que foi registado num formulário de relato de casos. Na Visita 1 e na Visita 2, o pessoal do estudo testemunhou a ingestão de produto de estudo para cada sujeito, durante o teste de tolerância à glucose da refeição. Os sujeitos ingeriram o produto de estudo na sua totalidade num período de 10 minutos, e registou-se o cumprimento num formulário de relato de casos.

Os sujeitos foram recrutados a partir de várias populações, incluindo sujeitos de estudos anteriores e outros indivíduos da população em geral. Os sujeitos elegíveis para o estudo deveriam satisfazer os critérios seguintes. Os critérios para arrolamento no estudo incluíram: sujeito com 18-75 anos de idade; é macho ou fêmea não grávida pelo menos seis semanas pós-parto e não lactante; não está actualmente a receber contraceptivos orais ou terapia oral de hormonas de substituição; tem um índice de massa corporal (IMC) de 20-28 kg/m²; o sujeito não tem diabetes *mellitus* ou intolerância à glucose (rastreamento de glucose capilar no sangue <110 mg/dl); está livre de doenças metabólicas ou gastrintestinais activas que possam interferir com a absorção, distribuição, metabolismo ou excreção de nutrientes e não tem alergias alimentares conhecidas; não teve qualquer infecção (requerendo medicação ou hospitalização), cirurgia, ou tratamento com corticosteróides nos últimos 3 meses ou com antibióticos nas últimas 3 semanas; não está a tomar medicações diariamente (e.g., acetaminofeno, salicilatos, diuréticos, etc.) que interfiram com absorção, metabolismo, excreção ou motilidade gástrica de nutrientes; não fuma; e assinou voluntariamente e datou pessoalmente um formulário de consentimento informado antes de qualquer participação no estudo.

Após preenchimento dos critérios de entrada e da recepção do consentimento do sujeito, ou do representante legalmente aceitável do sujeito, antes de qualquer participação no estudo, as afectações aos tratamentos foram

realizadas utilizando um plano de randomização gerado prospectivamente. Os sujeitos receberam ambos os produtos de estudo, numa ordem randomizada. Os sujeitos têm de ter consumido pelo menos 150 g de hidrato de carbono por dia durante os 3 dias anteriores, consumido a sua refeição de baixo teor em resíduos na noite anterior, privado de fazer exercício durante o período de 24 h anterior, e jejuado durante 10 a 16 horas antes do teste de tolerância à glucose da refeição. Se o sujeito não cumpriu estas linhas de orientação antes do teste, ele/ela regressava noutra data de estudo. O pessoal do estudo era responsável por atribuir e fornecer o produto de estudo.

Os sujeitos receberam ambos os produtos numa ordem randomizada. Os dois tratamentos avaliados nesta experiência foram: 1) maltodextrina e 2) pululano. A maltodextrina é um amido de milho parcialmente hidrolisado que é um ingrediente comum em muitos alimentos processados e é geralmente reconhecido como seguro (GRAS; 21 CFR 184.1444). O pululano é um ingrediente alimentar do tipo amido que tem sido utilizado como goma dietética, servindo como um agente de textura para tofu, fiambre e salsichas, como um substrato para aromas e como um meio para protecção de aromas através de microencapsulação, e como uma película alimentar (Kimoto *et al.*, "Safety studies of a novel starch, pullulan: chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity". *Food and Chemical Toxicology* 1997, 35, 323-329). Estes hidratos de carbono foram incorporados em bebidas tipo sumo (~25 g por 250 ml) e aromatizados para melhorar a palatabilidade. Uma descrição detalhada dos perfis nutricionais dos produtos pode ser encontrada nas tabelas a seguir.

Tabela D

Composição dos produtos de estudo

| | Controlo | Teste |
|------------------|------------------------------|-------|
| | unidades por dose de 8 fl oz | |
| Maltodextrina, g | 25 | 0 |
| Pululano, g | 0 | 25 |
| Sódio, mg | 27 | 27 |
| Potássio, mg | 47 | 47 |
| Cloreto, mg | 42 | 42 |
| Vitamina C, mg | 60 | 60 |

Os sujeitos consumiram doses de 2-8 fl oz de produto em cada teste de tolerância à glucose da refeição, o que proporcionou um total de 50 g de hidrato de carbono.

Tabela E
Listagem de Ingredientes

| | Controlo | Teste |
|--------------------------------|-------------------|-------|
| | unidades por lote | |
| Cloreto de sódio, g | 200 | 200 |
| Citrato de potássio, g | 400 | 400 |
| Citrato de sódio, g | 10 | 10 |
| Ácido ascórbico, g | 1000 | 1000 |
| Pululano PF-10, lb | 0 | 65 |
| Maltrin M 100, lb | 65 | 0 |
| Água, lb | 540 | 540 |
| Amora silvestre artificial, lb | 1,2 | 1,2 |
| Canela natural, g | 110 | 110 |
| FD&C Red #3, g | 52 | 52 |
| FD&C Blue #1, g | 3 | 3 |
| Pó de sucralose, g | 68 | 68 |

O estudo consistiu de dois dias de tratamento (Visita 1 e Visita 2) com um período de depuração mínimo de quatro dias e optimamente um máximo de 14 dias entre visitas de estudo. Para cada teste de tolerância à glucose da refeição, os sujeitos consumiram 2 doses (~8 fl oz/dose) de produto de estudo que proporcionaram 50 g de hidrato de carbono. Os produtos de estudo foram consumidos a uma hora similar em cada dia durante cada visita de tratamento.

Este foi um estudo cruzado, dois períodos, dois tratamentos, duplamente cego, randomizado, conduzido num único local. Pelo menos 26 sujeitos (13 em cada sequência de tratamento) foram randomizados para obter um conjunto completo (período 1 e 2) de valores para a variável principal, para 26 sujeitos. As análises e resumos estatísticos foram realizados com os dados dos sujeitos avaliáveis e com os dados que se pretendiam tratar (dados secundários: todos os sujeitos randomizados). Os dados em falta não foram imputados e um sujeito com dados em falta para uma variável, num ou mais períodos, não foi incluído na análise para essa variável. Não foram realizadas análises

intermédias.

Os dois passos seguintes foram realizados para cada análise cruzada de dois períodos: Primeiro um teste para o efeito da sequência: a) comparar duas sequências de tratamento para os valores, soma de dois períodos, utilizando um teste t bilateral ou (se não normais) um teste de soma ordenada de Wilcoxon ("Wilcoxon Rank Sum test") bilateral. Segundo, um teste para o efeito do tratamento: a) se o efeito da sequência não é significativo ($p \geq 0,10$) então comparar duas sequências de tratamento para os valores, diferença de dois períodos, utilizando um teste t bilateral ou (se não normais) um teste de soma ordenada de Wilcoxon bilateral, b) se o efeito da sequência é significativo ($p < 0,10$) então comparar dois tratamentos utilizando apenas os dados do primeiro período pelo teste t bilateral ou (se não normais) um teste de soma ordenada de Wilcoxon bilateral.

Um resultado (excepto para o efeito de sequência) foi declarado estatisticamente significativo se e só se um valor de p de uma análise fosse inferior a 0,05.

Resultados

A resposta glicémica pós-prandial de sujeitos saudáveis alimentados com maltodextrina (controlo) ou pululano pode ser observada na Figura 4. O pululano causou um aumento da glucose no sangue acima dos níveis da linha de base (em jejum) durante o período pós-prandial de 3 horas. Se o pululano fosse resistente à digestão, conforme classificado pela especialidade anterior, não seria de esperar um aumento pós-prandial da glucose no sangue. Como exemplo, a Figura 3 mostra as alterações mínimas nas concentrações pós-prandiais de glucose no sangue de sujeitos diabéticos alimentados com o polissacárido indigestível, polidextrose.

O pululano foi digerido lentamente durante as 3 horas do teste de tolerância à glucose da refeição, conforme indicado por um aumento reduzido numa fase inicial e depois uma manutenção do aumento na fase posterior em comparação com maltodextrina, um amido de digestão rápida. A área

incremental sob a curva de glucose foi inferior ($P < 0,01$) para sujeitos alimentados com pululano ($268 \pm 15,6$ vs. $135 \pm 11,6$ mmol.min/l, maltodextrina e pululano, respectivamente).

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de pululano para fabrico de um medicamento para produzir uma resposta glicémica atenuada num paciente diabético por administração ao referido paciente diabético de uma quantidade suficiente de pululano, em que o referido pululano está contido num produto de substituição de refeições, contendo o referido produto de substituição de refeições ainda vitaminas, minerais, uma fonte de proteína proporcionando de 10 a 35% das calorias totais, uma fonte de gordura proporcionando de 10 a 50% das calorias totais, e um sistema de hidratos de carbono proporcionando de 25 a 80% de calorias totais, proporcionando o referido pululano de 10 a 50% das calorias totais de hidrato de carbono.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido produto de substituição de refeições contém:

- a) uma fonte de proteína que proporciona de 10 a 35% de calorias totais,
- b) uma fonte de gordura que proporciona de 10 a 50% de calorias totais, e
- c) um sistema de hidrato de carbono que proporciona de 25 a 80% de calorias totais; e minerais e vitaminas.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que os referidos produtos de substituição de refeições são uma barra ou uma bebida.

4. Produto de substituição de refeições, que compreende:

- uma fonte de proteína que proporciona de 10 a 35% das calorias totais,
- uma fonte de gordura que proporciona de 10 a 50% das calorias totais, e
- um sistema de hidratos de carbono que proporciona de 25 a 80% de calorias totais, em que o referido pululano proporciona de 10 a 50% das calorias totais de hidrato de carbono,
- minerais e vitaminas.

5. Produto de substituição de refeições de acordo com a reivindicação 4, em que o referido produto de substituição de refeições é uma barra ou uma bebida.

Lisboa,

Resposta glicémica de pululano vs. maltodextrina

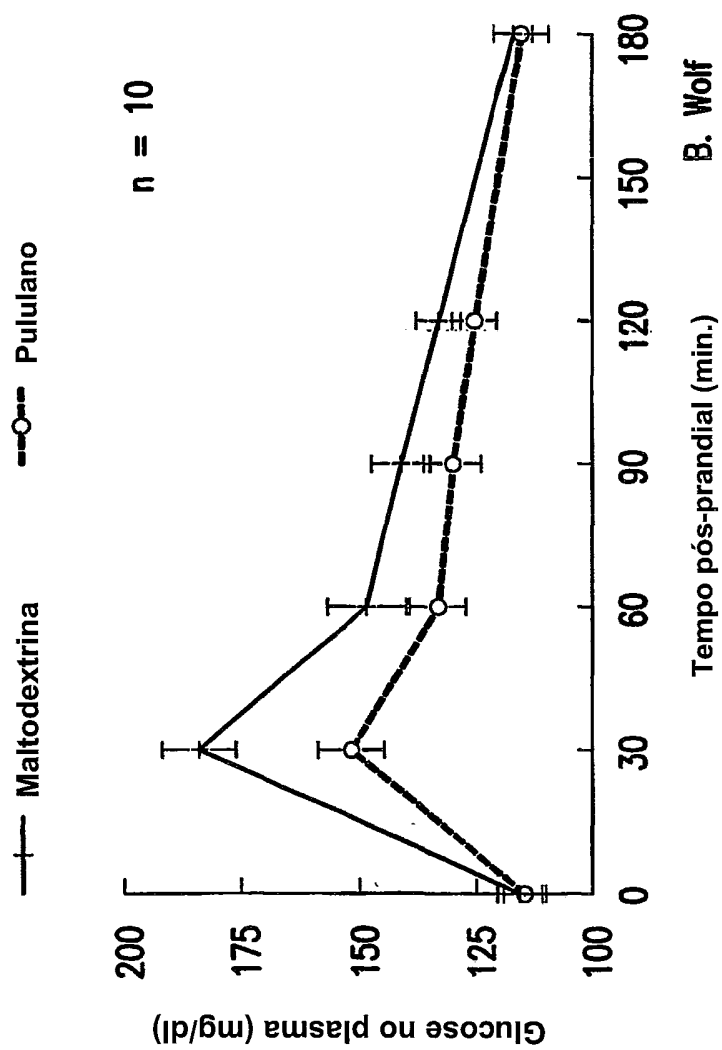


FIG.1

Alteração incremental da glicose no plasma desde a linha de base

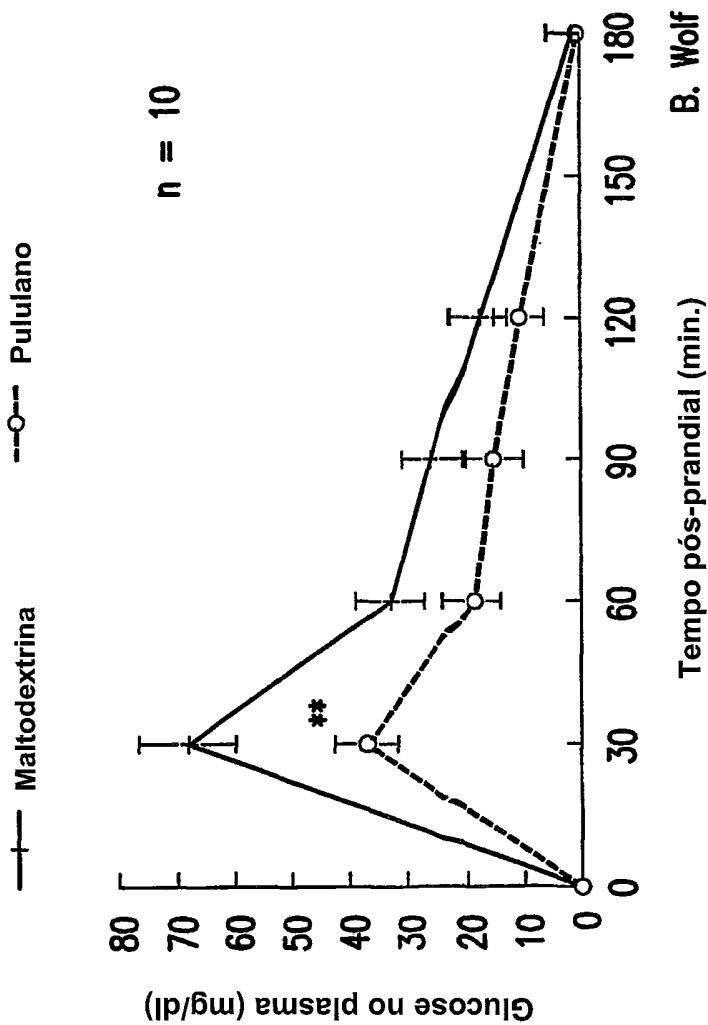


FIG.2

Resposta glicêmica pós-prandial em diabéticos do tipo 2
(dados da Food Additive Petition de 1978 da Pfizer)

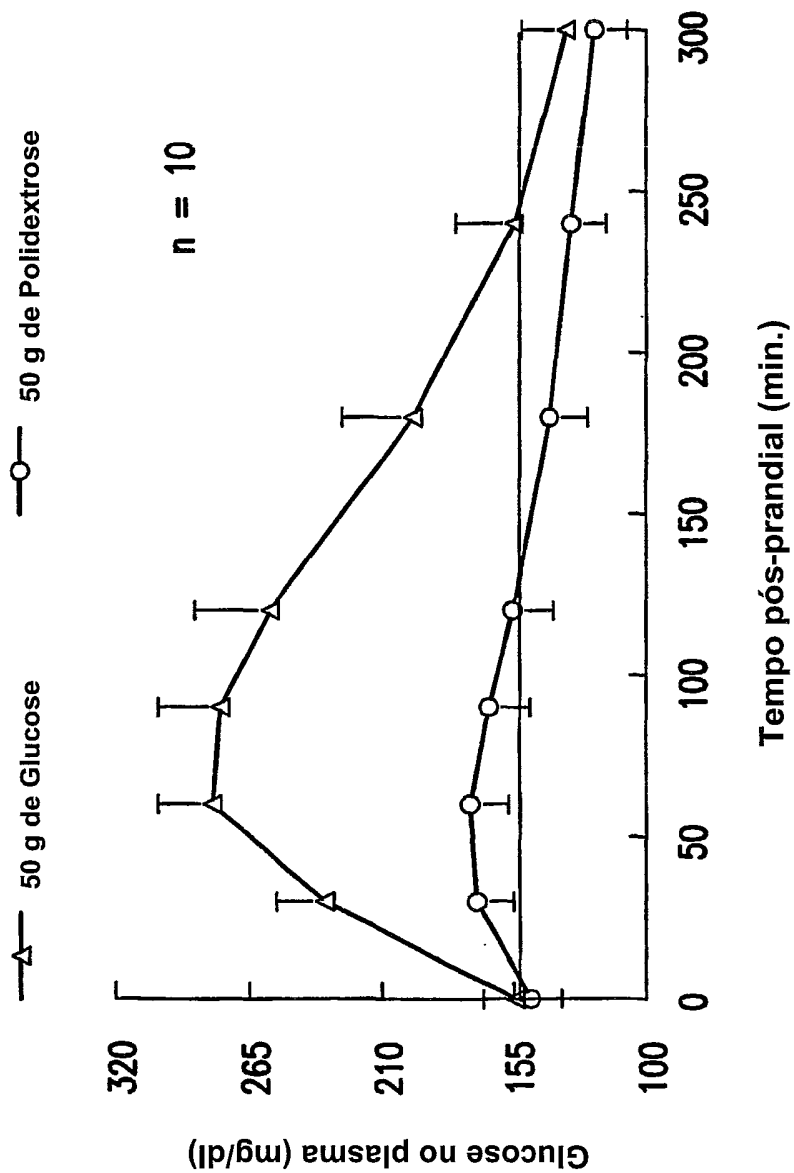
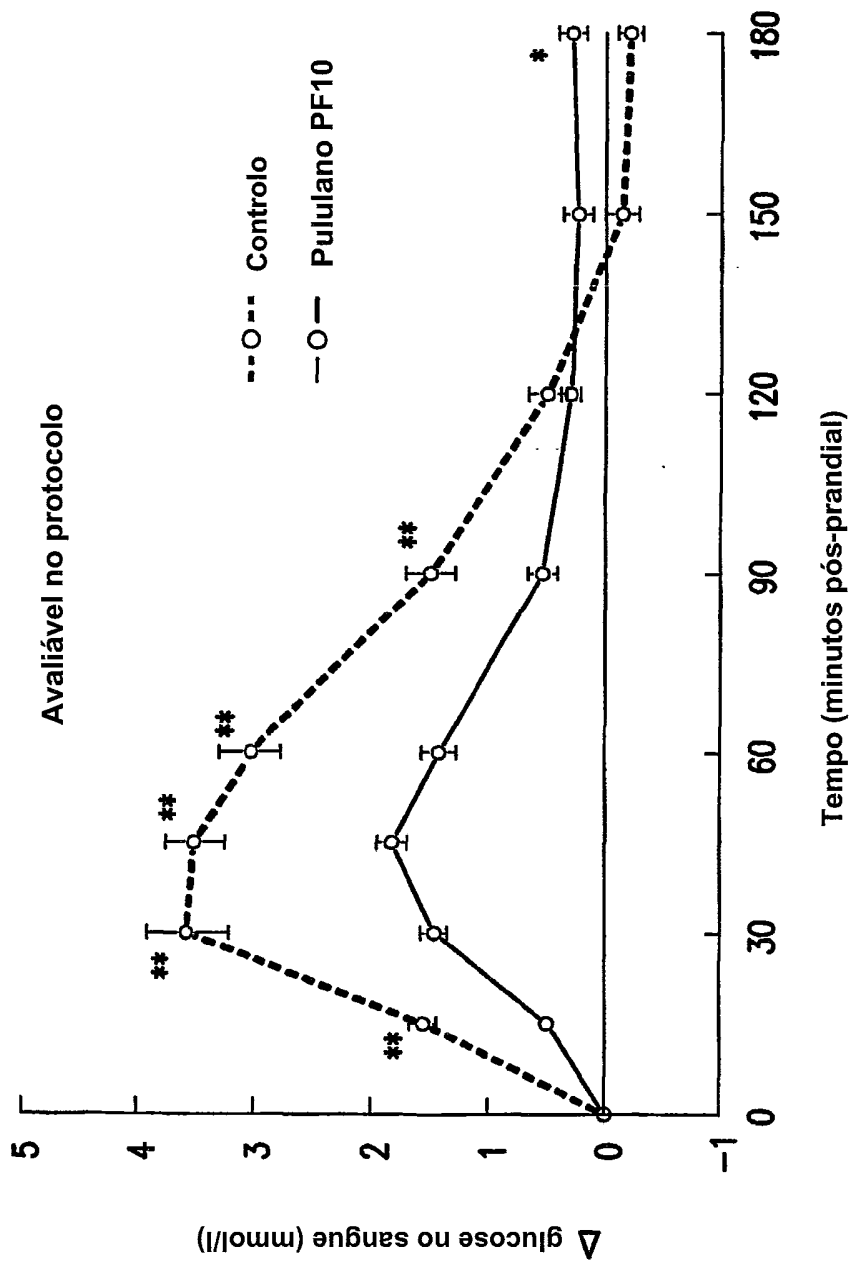


FIG.3



Os valores representam a Média±EP, n=28, *P<0,05, **P<0,01

FIG.4