

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**“FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PAREDE
CELULAR DE LEVEDURA – PROPRIEDADES FUNCIONAIS E
FISIOLÓGICAS DAS FRAÇÕES”**

SAULA GOULART CHAUD

Orientador: Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Campinas/SP

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

C393f Chaud, Saula Goulart
Fracionamento e caracterização química da parede celular de
levedura – propriedades funcionais e fisiológicas das frações /
Saula Goulart Chaud. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Glicoproteína. 2.*Glicana solúvel. 3.*Glicana insolúvel.
I.Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(Orientador) FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka
(Membro) FEA/UNICAMP

Dr. Eduardo Vicente
(Membro) ITAL

Dr. Flávio Luis Schmidt
(Membro) ITAL

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Bertoloto Pacheco
(Membro) USP/Pirassununga

Dra. Alda Luiza Santos Lerayer
(Membro suplente) ITAL

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán
(Membro suplente) FEA/UNICAMP

Aos que confiaram em mim,

DEDICO

À minha mãe pelo apoio, coragem,
compreensão e carinho, que me fizeram
prosseguir nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Aos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho, externo os mais sinceros agradecimentos e de modo especial:

- Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, pela orientação segura, compreensão e amizade durante todo o desenvolvimento desta tese.
- À Dra. Neura Bragagnolo pelo apoio na realização dos experimentos.
- Ao pesquisador do ITAL/Bromatologia Dr. Eduardo Vicente, pela participação no projeto de diversas formas, apoiando na realização dos experimentos e interpretação dos resultados.
- Aos membros da banca pelas sugestões e contribuições apresentadas.
- Ao pesquisador Marcelo A. Morgano, do Laboratório de Química do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada – ITAL, pela determinação da composição mineral da parede celular.
- Ao pesquisador Dr. Flávio Luis Schmidt FRUTHOTEC/ITAL, pela amizade e pelas valiosas sugestões.
- Aos amigos do Lafise/ITAL, Valéria e Márcio, pela colaboração nas análises de textura dos géis e interpretação dos resultados.
- Aos amigos do CTC/ITAL, Luciana, Márcia e Marcelo, pela colaboração e amizade.
- Aos amigos da Bromatologia/ITAL, Fernando da Fonseca Rodrigues, Adriana Barreto Alves e José Álvaro Ribeiro de Mattos pelo apoio nas análises de cromatografia e pelos momentos de convivência.
- Aos amigos da planta II/ITAL, Sr. João e Plínio, pela amizade e colaboração na secagem em “spray dryer” da parede celular.
- Aos amigos da Química Rone, Vanessa, Marta e André, pela colaboração e amizade.
- À minha família, que, mesmo à distância, torceram sempre por mim.
- À Tereza Pacheco pelo incentivo e pelas valiosas sugestões.
- À amiga Selma Bergara pelo apoio nas horas difíceis.

- Às amigas Janesca, Leonídia e Bete Lima pela amizade e apoio.
- Ao casal de amigos Margareth Lopes Galvão Saron e Clodoaldo Saron pelo incentivo e pelas valiosas sugestões.
- À Lidiane e Neuzely, pelo apoio nas análises da microbiota intestinal e pela convivência.
- Ao Katume Lafise/ITAL, pelo apoio nas análises estatísticas e interpretações dos resultados.
- Às amigas do DEPAN, Suzana e Lilian pela colaboração e apoio no ensaio biológico com ratos.
- Às amigas de Laboratório Ana Silvia, Caroline, Renata, Yara, Helaine e Nádia pela convivência e o apoio durante a execução do trabalho.
- Aos funcionários da Bioquímica/ITAL, Ana Rauen, Ciça, Ercília, Renatinho e Vera Baldini pelos momentos de convivência.
- Aos amigos do DEPAN, Fátima, Cidinha, Valter e André, pela amizade.
- À FAPESP, pelo suporte financeiro, pela bolsa de doutorado e taxa de bancada concedidos.
- À COOPERSUCAR, pelo fornecimento da levedura e parede celular utilizada neste estudo.
- À Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, especialmente ao Departamento de Alimentos e Nutrição pela oportunidade profissional.
- Ao ITAL e ao Centro de Química e Nutrição Aplicada, pela facilitação dos laboratórios e equipamentos essenciais para a execução deste trabalho.
- Ao casal de amigos Christian e Yvone, pela colaboração e amizade.
- A Deus, pela presença constante em minha vida.

“Nenhuma obra se faz sozinho. Quando se pensa estar solitário, Deus se faz presente na inspiração”.

Gasparetto

ÍNDICE

Índice de Abreviações Utilizadas	xvii
Lista das Tabelas.....	xix
Lista das Figuras	xxvii
Anexos.....	xxxiii
Resumo Geral	xxxv
General Summary	xxxix
Introdução Geral.....	1
Conclusão Geral	185
 Capítulo 1 – Parede celular (PC) e respectivas frações: aplicações e propriedades funcionais tecnológicas e fisiológicas.....	 7
Resumo	9
1.1 Introdução.....	9
1.2 Revisão da literatura.....	9
1.2.1 Purificação parcial da parede celular	11
1.2.2 Componentes da parede celular	12
Glicanas.....	16
Glicana álcali insolúvel	16
Glicana álcali solúvel	18
Mananas.....	18
1.2.3 Aplicação dos polissacarídeos da parede celular de levedura	19
1.2.4 Propriedades funcionais tecnológicas	20
1.2.5 Definição e composição das fibras alimentares.....	21
1.2.6 Propriedades físicas e químicas das fibras alimentares	22
1.2.7 Efeitos fisiológicos das fibras.....	24
1.2.8 Reações adversas das fibras alimentares	26
1.2.9 Fibras alimentares e colesterol.....	26
1.2.10 Fermentação das fibras e hipercolesterolemia	31
1.2.11 Efeito da ingestão de frutooligossacarídeo sobre a população de bifidobactérias	32
Prebióticos	33
1.3 Conclusões.....	37
1.4 Referências bibliográficas.....	37

Capítulo 2 – Parede celular (PC) e respectivas frações: obtenção / fracionamento e caracterização químico-analítico.....	55
Resumo	57
2.1 Introdução.....	58
2.2 Material e Métodos	60
2.3 Resultados e Discussão	74
2.4 Conclusões	86
2.5 Referências Bibliográficas	87
Capítulo 3 – Parede celular (PC) e respectivas frações: propriedades funcionais tecnológicas	93
Resumo	95
3.1 Introdução.....	96
3.2 Material e Métodos	98
3.3 Resultados e discussão.....	103
3.4 Conclusões	117
3.5 Referências Bibliográficas	118
Capítulo 4 – Propriedades nutritivas e fisiológicas da parede celular (PC) e de suas frações: ensaio biológico com ratos	125
Resumo	127
4.1 Introdução.....	128
4.2 Material e Métodos	130
4.3 Resultados e Discussão	142
4.4 Conclusões	171
4.5 Referências Bibliográficas	172

ÍNDICE DE ABREVIACÕES UTILIZADAS

PC:	Parede Celular
AIN-P:	Dieta AIN padrão
AIN-M:	Dieta AIN modificada
G+M:	Dieta com a fração glicana + manana
GI:	Dieta com a fração glicana insolúvel
GS:	Dieta com a fração glicana solúvel
M:	Dieta com a fração manana
GP:	Fração glicoproteína
AGV:	Ácidos graxos voláteis
S:	Solubilidade
CRA:	Capacidade de retenção de água
ISA:	Índice de solubilidade em água
CE:	Capacidade de emulsificação
EE:	Estabilidade da emulsão
CAA:	Capacidade de absorção espontânea de água
CAO:	Capacidade de absorção espontânea de óleo
VIS:	Viscosidade
GEL:	Geleificação
TEX:	Textura dos géis
QED:	Quociente de eficiência da dieta
Da:	Digestibilidade aparente da proteína

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2.1. Eliminação de sólidos e proteínas solúveis da parede celular bruta, através de lavagens sucessivas com água	75
Tabela 2.2. Composição centesimal da parede celular (PC) semi-purificada, de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial	77
Tabela 2.3. Composição de aminoácidos da parede celular (PC) semi-purificada, de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial	77
Tabela 2.4. Adequação de aminoácidos essenciais da parede celular (PC) semi-purificada, de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial, com base no perfil recomendado pela FAO/WHO.....	78
Tabela 2.5. Composição de ácidos graxos da parede celular (PC) semi-purificada, de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial	79
Tabela 2.6. Composição mineral da parede celular (PC) semi-purificada, de levedura da fermentação alcoólica, obtida pelo processo de autólise industrial.....	80
Tabela 2.7. Fracionamento dos componentes da parede celular (PC) semi-purificada de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial.....	81
Tabela 2.8. Composição média percentual das frações extraídas da parede celular (PC) semi-purificada de levedura de cana subproduto de processo de autólise industrial	82
Tabela 2.9. Composição média percentual das frações extraídas da parede celular (PC) semi-purificada de levedura de cana subproduto de processo de autólise industrial dialisada	83
Tabela 2.10. Extração e quantificação dos monossacarídeos na parede celular (PC) e em suas respectivas frações, e análise de carboidratos totais e açúcares redutores	85

Capítulo 3

Tabela 3.1.	Composição centesimal da PC semi-purificada de levedura subproduto da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial e de suas respectivas frações dialisadas.....	104
Tabela 3.2.	Capacidade de retenção de água (g de água retida / g de amostra) e índice de solubilidade em água na parede celular (PC) semi-purificada e frações da parede celular de levedura alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial: Relação sólidos - líquidos (S/L) 2,5 g : 30 mL de água	113
Tabela 3.3.	Parâmetro de textura para as frações glicana solúvel e insolúvel em diferentes concentrações	116

Capítulo 4

Tabela 4.1.	Composição da dieta controle (AIN-93G) e das dietas hipercolesterolêmicas suplementadas com diferentes amostras de fibras (mananas, glicana solúvel, glicana insolúvel e glicana + manana) utilizadas no ensaio biológico (g/kg dieta).....	132
Tabela 4.2.	Mistura Mineral (AIN-93G-MX) que supre as concentrações recomendadas de elementos para a dieta AIN-93G	133
Tabela 4.3.	Mistura vitamínica (AIN-93-VX) que supre as concentrações recomendadas de vitaminas para as dietas AIN-93G	134
Tabela 4.4.	Ganho cumulativo de peso em gramas de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, 28 dias	143
Tabela 4.5.	Consumo de dieta (g) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0-7, 7-14, 14-21, e 21-28 dias.....	146
Tabela 4.6.	Quociente de eficiência da dieta (CED) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0-7, 7-14, 14-21 e 21-28 dias.....	148
Tabela 4.7.	Digestibilidade aparente da proteína (Da) (média±desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0-7, 7-14, 14-21 e 21-28 dias.....	149

Tabela 4.8. Quantidade de fezes excretadas (g) em base seca (média $\pm$ desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0-7, 7-14, 14-21 e 21-28 dias.....	150
Tabela 4.9. Porcentagem de lipídios totais nas fezes (média $\pm$ desvio-padrão) nas fezes (base seca) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0-7, 7-14, 14-21 e 21-28 dias.....	152
Tabela 4.10. Concentração de colesterol nas fezes (mg/100g) (média $\pm$ desvio-padrão) nas fezes (base seca) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0-7, 7-14, 14-21 e 21-28 dias.....	153
Tabela 4.11. Quantidades (médias) totais de fezes produzidas, lipídios totais e colesterol excretados no decorrer do ensaio (28 dias).....	154
Tabela 4.12. Níveis de colesterol sérico em mg/dL (média $\pm$ desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias	156
Tabela 4.13. Níveis de glicose sérica em mg/dL (média $\pm$ desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias	158
Tabela 4.14. Níveis de lipídios séricos em mg/dL (média $\pm$ desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias	159
Tabela 4.15. Níveis de triacilgliceróis séricos em mg/dL (média $\pm$ desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias	160
Tabela 4.16. Contagem total de bactérias anaeróbicas log UFC/g (unidades formadoras de colônia/g) (média $\pm$ desvio-padrão) de conteúdo intestinal (ao natural) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias	162
Tabela 4.17. Contagem de bifidobactérias log UFC/g (unidades formadoras de colônia/g) (média $\pm$ desvio-padrão) de conteúdo intestinal (ao natural) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias	163

Tabela 4.18. Contagem de clostrídios log UFC/g (unidades formadoras de colônia/g) (média $\pm$ desvio-padrão) de conteúdo intestinal (ao natural) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias	164
Tabela 4.19. Contagem de enterobactérias log UFC/g (unidades formadoras de colônia/g) (média $\pm$ desvio-padrão) de conteúdo intestinal (ao natural) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias	165
Tabela 4.20. Contagem de enterococos log UFC/g (unidades formadoras de colônia/g) (média $\pm$ desvio-padrão) de conteúdo intestinal (ao natural) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias	166
Tabela 4.21. Contagem de lactobacilos log UFC/g (unidades formadoras de colônia/g) (média $\pm$ desvio-padrão) de conteúdo intestinal (ao natural) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias	167
Tabela 4.22. Extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta no conteúdo intestinal (mg/g de conteúdo intestinal).....	171

LISTA DAS FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1.	Procedimento de lavagem e obtenção da biomassa de levedura desidratada.....	61
Figura 2.2.	Fluxograma do processo de autólise e obtenção da parede celular bruta	63
Figura 2.3.	Fluxograma de extração da fração lipídica da parede celular lavada e desidratada	65
Figura 2.4.	Fluxograma de extração da fração glicoproteína	66
Figura 2.5.	Fluxograma de extração das frações manana e glicana bruta do resíduo da extração da glicoproteína	68
Figura 2.6.	Procedimento para solubilização da glicana bruta	69
Figura 2.7.	Eliminação de sólidos e proteínas solúveis da parede celular bruta (PC) por lavagens sucessivas com água	75
Figura 2.8.	Fotografia da parede celular (PC) e suas respectivas frações	83
Figura 2.9.	Cromatograma referente a extração e quantificação do ergosterol da fração lipídica da parede celular (PC) proveniente da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial	84

Capítulo 3

Figura 3.1.	Analizador de textura TA-XT ₂	100
Figura 3.2.	Perfil de solubilidade protéica (%N x 5,8) na PC semi-purificada e nas frações da parede celular de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial	105
Figura 3.3.	Perfil de solubilidade para sólidos solúveis na PC semi-purificada e nas frações da parede celular de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial	106
Figura 3.4.	Representação gráfica da capacidade emulsificante (C.E.) da PC semi-purificada e suas respectivas frações, feitas com uma dispersão de 0,23% da amostra em água ou em combinações de diferentes concentrações de ovoalbumina (0,2%, 0,4% e 0,6%).	108

Figura 3.5. Representação gráfica da estabilidade das emulsões (%) da PC semi-purificada e suas respectivas frações, feitas com uma dispersão de 0,23% da amostra em água ou em combinações de diferentes concentrações de ovoalbumina (0,2%, 0,4% e 0,6%), após tempos (T_{0h} e T_{24h}).....	108
Figura 3.6. Capacidade de absorção espontânea de água pela PC semi-purificada e pelas frações da parede celular de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial	111
Figura 3.7. Capacidade de absorção espontânea de óleo pela PC semi-purificada e pelas frações da parede celular de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial	112
Figura 3.8. Curva de viscosidade gerada pelo <i>Viscoanalyzer</i> em função do tempo de aquecimento e da temperatura na PC semi-purificada e frações da parede celular de levedura de fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial	117

Capítulo 4

Figura 4.1. Fotografia das dietas utilizadas no ensaio biológico.....	134
Figura 4.2. Fotografia da porção do intestino grosso do qual foi extraído o conteúdo intestinal extraído no T14 (cecum, cólon e reto), das dietas	142
Figura 4.3. Fotografia da porção do intestino grosso do qual foi extraído o conteúdo intestinal extraído no T28 (cecum, cólon e reto), das dietas	142
Figura 4.4. Curva de ganho de peso (g) (média $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta), para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 17% de proteína (caseína).....	144
Figura 4.5. Valores médios de ganho de peso final (g) (média $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta), para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 17% de proteína (caseína).....	145
Figura 4.6. Valores médios de consumo total de dieta (g) aos 28 dias (média $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta), para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 17% de proteína (caseína)	147

Figura 4.7. Valores médios de quantidade total de fezes excretadas (g) aos 28 dias (média $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta), para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 17% de proteína (caseína).....	151
Figura 4.8. Valores médios de extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta no conteúdo intestinal (mg/g) (média $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta), para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 17% de proteína (caseína)	170

ANEXOS

Anexos	187
Anexo 1 - Fracionamento e caracterização química da parede celular (PC) de levedura	189
Anexo 2 - Propriedades Funcionais Tecnológicas da Parede Celular (PC) de Levedura da Fermentação Alcolólica e de suas respectivas frações	193
Anexo 3 - Cromatogramas referentes a extração e quantificação dos monossacarídeos da parede celular (PC) e em suas respectivas frações	197
Anexo 4 - Cromatogramas referentes a extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis (AGV) da cadeia curta no conteúdo intestinal.....	211

RESUMO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo o fracionamento e a caracterização química da parede celular (PC) de levedura obtida como subproduto do processo industrial da produção de etanol, visando avaliar as propriedades funcionais e fisiológicas do material fracionado. A PC foi fracionada em glicoproteína (GP), glicana mais manana (G+M), glicana insolúvel (GI), glicana solúvel (GS) e manana (M) que foram caracterizadas quanto à composição centesimal, perfil de aminoácidos, minerais, ácidos graxos e quantificação de monossacarídeos. A proporção entre os componentes da PC foi, fibra (77,8%), com predominância (74%) de fibra solúvel, permanecendo no material 18 a 20% de proteína. O teor de açúcares totais da PC foi 80,8 g/100g e o teor de lipídios foi de 2,00%. Dentre os ácidos graxos saturados predominaram palmítico e esteárico, monoinsaturados palmitoléico e oléico, poliinsaturados linoléico e α -linolénico. Os principais elementos minerais foram cálcio, fósforo, potássio e ferro, sendo que a PC representa uma excelente fonte de ferro e cobre. As frações obtidas da PC foram M, 25,13% e GI, 42,92% p/p. As frações com maior conteúdo de fibra foram M, 70,34% de fibra solúvel, GI, 75,20% de fibra insolúvel, G+M, 60,23% fibra solúvel e GS, 70,73% fibra solúvel. Teores de açúcares redutores, M, 70%, com 48,4% de manose, GI, 28,95% e GS, 25,07% glicose. A fração G+M continha 28,08 g/100g de carboidratos totais e 20,0% de redutores totais. A GS apresentou a maior solubilidade, a G+M a menor solubilidade do N e de sólidos totais e a GI apresentou o menor índice de solubilidade. A GS apresentou a maior capacidade de retenção de água (14,36 g/g de amostra) e o menor índice (0,06%) de solubilidade em água. A fração GP reteve (5,33 g/g de amostra) e 83,83% de solubilidade. A viscosidade (95°C) e a viscosidade final (50°C) obedeceram à seguinte ordem: GS > GI > G+M > M > GP e PC. A GI (12% e 14% p/v) apresentou o maior índice de dureza de gel. As frações GP e M apresentaram as melhores propriedades emulsificantes que melhoraram significativamente com a adição de 0,2 , 0,4 e 0,6% (p/v) de ovoalbumina nas suspensões a 1% do material em estudo. Avaliou-se os efeitos da substituição da fibra de uma dieta padrão (AIN-P) por 10% de fibra de cada uma das frações da PC, formulando-se as dietas G+M, M, GI, GS.

Ao final de 28 dias, os animais em dieta G+M ganharam menos peso que nas demais. As dietas AIN-M (padrão modificada com 10% celulose) e M foram as que proporcionaram um maior ganho de peso, seguidas das dietas padrão (AIN-P) e G. O QEA da dieta G+M foi o menor ao longo dos 28 dias. Os maiores índices de digestibilidade da proteína foram observados nas dietas AIN-M, AIN-P e M. Com exceção da dieta G+M observou-se efeitos hipocolesterolêmico e hipolipidêmico em todas as dietas, porém, efeito hiperglicêmico em relação ao valor inicial (T_0). Não houve modificações significativas na microflora intestinal dos animais em nenhuma das dietas. As quantidades de lipídios totais e colesterol excretados (fezes) variaram bastante, sendo que a dieta M apresentou maior especificidade para excreção do colesterol. Dentre os AGV, o ácido acético foi o predominante, seguido do propiônico e do butírico, em todas as dietas estudadas. As concentrações de ácido butírico nas dietas contendo M, G+M e G foram significativamente superiores aos padrões (AIN-P e AIN-M).

GENERAL SUMMARY

The objectives of this work were the fractionation and chemical characterization of yeast cellular wall (YCW) from yeast biomass obtained as byproduct in the industrial production of ethanol, as well as the evaluation of functional and physiological properties of the various fractions. YCW was fractionated to obtain glycoprotein (GP), a fraction containing glycan plus mannan (G+M), insoluble glycan (IG), soluble glycan (SG), and mannan (M), which were characterized for percent composition, amino acid profile, minerals, fatty acids, and monosaccharides. Proportions between YCW components included fiber (77.8%), with predominance (74%) of soluble fiber, remaining in the material 18 to 20% protein. Total sugar content of YCW was 80.8%/100 g and lipid content was 2.00%. Among the saturated fatty acids, the palmitic and stearic were predominant, among the monounsaturated acids, the palmitoleic and the oleic, and among the polyunsaturated acids, the linoleic acid and α -linolenic acid. The most abundant mineral elements were calcium, phosphorous, potassium, and iron and the YCW showed to be an excellent source of iron and copper. Fractions obtained from YCW were: M 25.13% and IG 42.92% w/v. Fiber content in the isolated fractions were: M 70.34% soluble fiber, IG 75.2% insoluble fiber, G+M 60.23% soluble fiber, and SG 70.73% soluble fiber. Percentages of reducing sugars were M 70% with 48.4% mannose, IG 28.95% and SG 25.07% glucose. The fraction G+M contained 28.0 g/100g total carbohydrate and 20% reducing sugars. The SG presented the highest solubility and G+M the lowest N solubility and the IG presented the lowest total solids solubility. GS showed the highest water retention capacity (14.36 g/g sample) and the lowest (0.06%) solubility in water. The fraction GP showed retention of 5.33 g/g sample and solubility in water of 83.83%. The SG showed the highest viscosity at 50°C (heating phase). The viscosity at 95°C and the final viscosity (50°C) obeyed the following order: SG > IG > G+M > M > GP and YCW. The IG (12% and 14% w/v) presented the highest gel hardness. The fractions GP and M exhibited the best emulsifying properties, which improved significantly by adding 0.2, 0.4, and 0.6 ovoalbumin to the emulsifying media at 1%. Effects of fiber substitution were evaluated through alteration of control diet (AIN-P), substituting each YCW fraction with 10% of fiber, which resulted in the diets G+M, M,

IG, SG. After 28 days, animals on a G+M diet had gained less body weight than the others. AIN-M (standard modified with 10% cellulose) and M diets promoted the highest growth, followed by AIN-P and IG. The DER of the G+M diet was the lowest along 28 days of experiment. Higher protein digestibility indexes were found for AIN-P, AIN-M, and M. With exception of the G+M diet, hypocoesterolemic and hypolipidemic effects were found for all the diets, compared to the starting point (T_0). No significant modification of the intestinal microbiota was verified in any dietary treatment. Great variation was verified among the diets for fecal lipids and cholesterol excretion. The M diet showed greater capacity to excrete cholesterol in the rat feces. Among the SCFA, acetic acid predominated in all treatments, followed by propionic acid and butiric acid. Butiric concentrations were significantly higher in the M, G+M, and G diets compared with AIN-P and AIN-M.

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, na indústria de alimentos, existe uma tendência mundial em substituir as proteínas de origem animal pelas proteínas vegetais. O constante progresso no campo da biotecnologia tem conduzido ao desenvolvimento de processos e equipamentos, para obtenção de organismos unicelulares em escala industrial, permitindo a produção de um grande volume de biomassa em condições de espaço e tempo bastante reduzidos.

As leveduras compreendem poucos gêneros e poucas espécies comparativamente aos demais microrganismos (400 espécies e 39 gêneros). De acordo com Dziezak (1987), as leveduras são classificadas tendo como base sua atividade. Leveduras ativas são utilizadas para fermentação, como fonte de nutrientes e de componentes de sabor. As leveduras inativas "dry yeast" são utilizadas, predominantemente, como suplemento nutricional, flavorizante e espessante (McCORMICK, 1987).

Em muitos países, as leveduras são reconhecidamente consideradas produto de alto valor agregado, com matéria prima para extração de proteínas, aminoácidos, vitaminas, ácido ribonucleico (RNA) e diversas enzimas. Representam uma rica fonte de nutrientes como proteínas, minerais, vitaminas, particularmente as do complexo B, além de carboidratos, nucleotídeos e lipídios com importantes propriedades fisiológicas (HALÁSZ; LÁSZTITY, 1991; DZIEZAK, 1987; CARVER et al., 1990; CAVER; WALKER, 1995; NUNES et al., 1990).

Estudos com leveduras têm merecido um espaço de destaque, não só pelo fato de estarem tradicionalmente associadas à preparação de alimentos e bebidas fermentadas, mas também pela versatilidade de uso e habilidade de crescerem rapidamente numa ampla variedade de substratos (SNYDER; KNOW, 1987; GUZMAN-JUAREZ, 1983; KIHLEBERG, 1972; SATTERLEE, 1981; GIEC; SKUPIN, 1988). As leveduras como fonte de proteína têm sido estudadas principalmente a partir dos anos 60, sendo que até o momento não se dispõe de uma tecnologia que abranja desde o rompimento da célula até o produto final, apropriado ao consumo, testado nutricionalmente em experimentos "in vivo".

Entre as vantagens para o uso de levedura como fonte de nutrientes, citam-se as seguintes (TANNENBAUM, 1971): a) elevada capacidade de se reproduzirem, portanto de produzirem biomassa; b) pouca exigência quanto ao meio de cultivo, podendo ser cultivadas em substratos baratos; c) podem ser cultivadas em bioreatores com absoluto controle das variáveis que afetam a produção; d) produzem elevados teores de proteínas, vitaminas e outros constituintes celulares de interesse industrial e para a saúde.

Dois problemas têm sido citados na literatura, relativos à utilização de levedura na dieta humana (OSER, 1975): a) resistência das paredes celulares à ação das enzimas digestivas de animais monogástricos, diminuindo a digestibilidade e o grau de utilização de nutrientes ou dificultando a liberação do conteúdo celular nos processos tecnológicos de recuperação desses componentes; b) elevado teor de ácidos nucléicos por unidade de biomassa, limitando a quantidade de células de levedura que poderão ser incorporadas em dietas para humanos e que dificulta também a obtenção de proteínas de levedura isenta desses ácidos; ácidos nucléicos e proteínas formam complexos nucleoprotéicos de difícil dissociação.

Recentemente, surgiram no Brasil algumas indústrias que utilizam a levedura para obtenção de extratos protéicos, por meio de autólise. Esse processo origina um resíduo, enriquecido com parede celular da levedura, que tem mercado incipiente.

A célula de levedura tem entre 8-14 μ de diâmetro e massa seca de 40 x 10⁻¹² g, ou seja, 10¹² células secas vivas e prensadas representam uma massa de 40g, e essa quantidade de célula pesa cerca de 200g (HOUGH, 1990).

A parede celular de levedura representa cerca de 25-30% do peso total da célula e consiste principalmente de polissacarídeos denominados genericamente de glicana de levedura.

No Brasil, em particular, existem trabalhos com a levedura utilizada no processo de fabricação de etanol, para aproveitamento em rações para animais (RHEINBOLD et al., 1987, ANFAR, 1985).

Os principais derivados de levedura são os autolisados (produzidos por autodigestão das células), sendo a parte solúvel do autolisado denominada extrato

e a parte insolúvel constituída por uma fração rica em carboidratos, derivados das paredes celulares. Esta fração carboidrática é rica em mananas, beta glicanas e glicoproteínas com propriedades fisiológicas e funcionais bastante interessantes. As leveduras podem ainda oferecer enzimas de interesse comercial (proteínases, invertase, lactase), além de ácidos nucléicos, nucleotídeos e nucleosídeos empregados tanto em alimentos como na medicina (DZIEZAK, 1987; CARVER et al., 1990; CAVER; WALTER, 1995; OTERO et al., 1996; SARWAR et al., 1985).

Levando em consideração a abundância e o baixo custo dessa matéria-prima, a sua riqueza em constituintes nutritivos e a possibilidade de inovações nos processos de obtenção e no processamento de derivados de levedura, torna-se necessário e plenamente justificável o desenvolvimento de pesquisas multidisciplinares e integradas, visando, a médio e longo prazo, o desenvolvimento de novos produtos com características funcionais e nutricionais melhoradas e mais diversificadas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo:

1. Caracterização química da parede celular de levedura proveniente da fermentação alcoólica obtida pelo método de rompimento das células por autólise.
2. Fracionamento seqüencial da parede celular de levedura para obtenção de seus principais componentes. Caracterização do ponto de vista da composição e das propriedades nutritivas e funcionais.
3. Avaliar através de experimentos com animais, alimentados com dietas contendo parede celular ou frações da parede celular, sua importância fisiológica e como ingrediente funcional no desenvolvimento de produtos alimentícios.

Esta tese está dividida em quatro capítulos:

- Capítulo 1: aborda as aplicações e propriedades funcionais, tecnológicas e fisiológicas da parede celular (PC) e de suas respectivas frações.
- Capítulo 2: descreve o processo de obtenção/fracionamento e caracterização químico-analítica da parede celular (PC) e de suas respectivas frações.
- Capítulo 3: trata de propriedades funcionais tecnológicas da parede celular (PC) e de suas respectivas frações.

- Capítulo 4: relata um ensaio biológico com ratos, abordando a influência das frações obtidas da parede celular em relação:
 - aos aspectos nutricionais.
 - aos índices séricos de glicose e lipídios.
 - a microbiota intestinal e produção de ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeias curtas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANFAR. (Associação Brasileira dos Fabricantes de Rações). **Matérias primas para alimentação animal**. 4 ed. São Paulo, 1985, 65p.

CARVER, J. D.; COX, W. L.; BARNESS, L. A. Dietary nucleotide effects upon murine natural killer cell activity and macrophage activation. **Journal of Parental and Enteral Nutrition**, Baltimore, v.14, n. 1, p. 18-22, 1990.

CARVER, J. D.; WALKER, W. A. The role of nucleotides in human nutrition. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Los Altos, v. 6, n. 2, p. 58-72, 1995.

DZIEZAK, J. D. (Ed.). Yeasts and yeast derivatives: Definitions, characteristics, and processing. **Food Technology**, Chicago, v. 41, n. 2, p. 103-121 e 122-125, 1987.

GIEC, A.; SKUPIN, J. Single cell protein as food and feed. **Die Nahrung**. Berlim, v.32, n.3, p.219-229, 1988.

GUZMAN-JUAREZ, M. In: HUDSON, B. J. F. **Development in foods proteins 2**. London: Applied Science, 1983, 339p.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. New York: CRC Press, 1991, 312 p.

HOUGH, J. S. **Biotechnología de la Cerveza y de la Malta**. Zaragoza, Acribia, 1990, 194 p.

KIHLBERG, R. The microbe as a source of food. **Annual Review of Microbiology**. Pablo Alto, v.26, n.4, p.426-465, 1972.

McCORMICK, R. Unconventional protein sources diversity development choices. **Prepared Foods**, Chicago, v. 156, n. 12, p.135-136, 1987.

NUNES, M. C.; AYUDARTE, M. V.; MORALES, D.; SUAREZ, M. D.; GIL, A. Effect of dietary nucleotides en intestinal repair in rats with chronic diarrhea. **Journal of Parental and Enteral Nutrition**. Baltimore, v.14, n. 6, p.598-604, 1990.

OSER, B. L. Guidelines for the evaluation of single cell protein for human consumption. In TANNENBAUM, S. R.; WANG, D. I. C. (Ed.) **Single-Cell Protein II**, Cambridge: M.I.T. Press, 1975. p.484-488.

OTERO, M. A.; VASALLO, M. C.; VERDIEIA, O.; FERNANDEZ, V.; BETANCOURT, D. A process for the complete fractionation of baker's yeast. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, W. Sussex, v. 67, n. 1, p. 67-71, 1996.

RHEINBOLD, P. H. H.; LEIMER, K. H.; ROSSEL, G. G. V. Sangria e secagem de levedura – Processo CTC. **Boletim Técnico da Coopersucar**. São Paulo, v.39, n.1, p.8-12, 1987.

SARWAR, G.; SHAH, B. G.; MONGEAU, R.; HOPPNER, K. Nucleic acid, fiber and nutrient composition of inactive dried food yeast products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 353-357, 1985.

SATTERLEE, L. D. Proteins for use in foods. **Food Technology**. Chicago, v.35, n.6, p.53-70, 1981.

SNYDER, H. E.; KNOW, T. W. **Soybean utilization**. New York: Van Nostrand Reinold, 1987, 345p.

TANNENBAUM, S. R. Single-cell protein, food of the future. **Food Technology**. Chicago, v.25, n.9, p. 962-966, 1971.

CAPÍTULO 1

**Parede celular (PC) e respectivas frações:
aplicações e propriedades funcionais tecnológicas e fisiológicas**

CAPÍTULO 1

Parede celular (PC) e respectivas frações: aplicações e propriedades funcionais tecnológicas e fisiológicas

RESUMO

O interesse pelo estudo e desenvolvimento de novos produtos com características funcionais tem crescido muito nos últimos anos. As pesquisas recentes para o fracionamento da parede celular (PC), tem demonstrado que esta fração é constituída das seguintes subfrações: glicoproteína, manana, glicana solúvel, glicana insolúvel, que desempenham inúmeras funções benéficas, muitas das quais somente agora começam a ser desvendadas. Essas frações começam a ser utilizadas devido às suas propriedades tecnológicas de grande interesse, principalmente por conferir viscosidade, serem excelentes emulsificantes, estabilizantes, espessantes e texturizantes, além de possuírem um elevado teor de fibra que confere também a essas frações propriedades fisiológicas como imunoestimulantes, são agentes hipocolesterolizantes, retardam o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal, aumentam a concentração de ácidos graxos de cadeias curtas, além de diminuir os níveis de colesterol sérico e de triacilgliceróis. Assim, é importante o conhecimento das propriedades funcionais fisiológicas das frações da PC, no sentido de promover benefícios à saúde do homem.

1.1 INTRODUÇÃO

1.2 REVISÃO DA LITERATURA

Geralmente, as leveduras contêm de 40-60% de proteínas que podem ser isoladas por vários métodos. O método principal é a obtenção do extrato de

levedura e parede celular, os quais são usados como suplementos em alimentos e realçadores de sabor em sopas e molhos (KOLLAR et al., 1992).

Extratos de levedura representam concentrados de componentes solúveis obtidos das células de levedura incluindo autólise, hidrólise e plasmólise (KNORR et al., 1979). Autolisados incluem todo o conteúdo da lise das células, abrangendo os componentes solúveis, proteínas solubilizadas e a parede celular (DZIEZAK, 1987). Os componentes hidrolisados são preparados enzimaticamente ou pelo aquecimento controlado das leveduras em meio ácido, enquanto que, por plasmólise, ocorre extração dos materiais celulares devido ao aumento da concentração de sal (NaCl), sacarose ou solventes orgânicos como etanol, acetato de etila, clorofórmio e outros (KOLLAR et al., 1992).

O processo de autólise é induzido por agitação das células em temperatura entre 40-55°, produzindo efeito sobre as células que influencia a atividade de enzimas endógenas. Autólise geralmente requer de 12 a 36 horas para completar o processo de hidrólise. O autolisado deve ser agitado constantemente e, para ser seco em “spray dryer”, a biomassa autolisada precisa estar com 70-80% dos sólidos totais solúveis (DZIEZAK, 1987). A parede celular é obtida pela centrifugação do autolisado inativo (BABAYAN et al., 1991).

Durante a autólise, a levedura é submetida a mudanças morfológicas, onde ocorre desintegração ou desarranjo da camada de polissacarídeos, possivelmente associada com a hidrólise parcial de fragmentos protéicos incorporados na parede celular (BABAYAN et al., 1991).

Vários métodos são utilizados na obtenção do extrato de levedura e da parede celular os quais apresentam em comum a necessidade de um tratamento prévio para o rompimento da parede celular (KINSELLA, 1987; PACHECO et al., 1997).

O fracionamento e caracterização estrutural dos polissacarídeos da parede celular de *S. cerevisiae* refere-se ao material obtido por rompimento mecânico ou enzimático, de células cultivadas em meios otimizados em laboratórios. São utilizadas enzimas exógenas na lise enzimática da parede celular de leveduras, pois este tratamento ativa as proteases endógenas e consequentemente ajudam

na rápida preparação de leveduras autolisadas. A hidrólise da parede celular permite liberar os constituintes intracelulares para obtenção do extrato e parede celular (KNORR et al., 1979).

O método de ruptura mecânica tem sido muito utilizado, principalmente quando se deseja obter produtos com boas propriedades funcionais tecnológicas. Esse procedimento permite uma recuperação eficiente das proteínas, pois evita a exposição das mesmas a tratamentos drásticos de temperatura e pH. A desintegração mecânica pode ser conduzida por vários meios tais como: homogeneizador convencional, desintegrador de alta pressão, exposição a ultrassom e desintegrador tipo moinho de bolas (ENGLER, 1979).

Na hidrólise, são utilizadas enzimas comerciais de menor custo favorecendo o processo. O período de incubação da enzima é menor, de aproximadamente 1 hora, que também reduz o problema de contaminação microbiana e outras contaminações durante o período de incubação (KNORR et al., 1979).

O processo de autólise é praticado no estágio final do crescimento celular, quando se obtém rendimento máximo de biomassa. A autólise natural também pode ser causada pela presença de microrganismos que contaminam a cultura, promovendo micrólises nas leveduras e provocando a desestruturação da parede celular o que leva ao rompimento das células. Terminando o processo de autólise das células, faz-se a centrifugação para a separação da fração solúvel (extrato de levedura) da insolúvel (parede celular). O presente capítulo tem como objetivo discutir a parede celular (PC) e suas respectivas frações visando mostrar suas aplicações e propriedades funcionais.

1.2.1 Purificação parcial da parede celular

A parede celular é obtida por centrifugação, após autólise das células de levedura. A fração insolúvel de levedura, a parede celular, é composta principalmente de β -glicanas (BEHALOVÁ et al., 1991).

O processo de purificação da parede celular foi iniciado de maneira muito simples, começando pela centrifugação do autolisado. Segundo a patente americana (ANHEUSER-BUSCH et al., 1978), a parede celular é ressuspensa a 5,0% de sólidos em água e homogeneizada em moinho coloidal a pH 5.0 e à temperatura de 10°C a cada passagem. A parede celular lavada deve ser ajustada para pH 9,5 pela adição de NaOH e agitada lentamente por 60 minutos à temperatura de 26°C. Os componentes da parede são submetidos novamente à centrifugação a 9000g, ressuspensa em água e centrifugada novamente para obter a β -glicana parcialmente purificada, obtendo-se uma suspensão de β -glicana com rendimento de 9,5kg por 45 kg de levedura inicial (21% p/p), cuja composição é de 73,7% carboidratos, 20,4% proteína, 2,4% ácidos nucleicos e 1,0% cinzas.

O processo de purificação parcial da parede celular engloba várias etapas, iniciando com a produção de células de levedura, ruptura das células, separação dos fragmentos da parede celular insolúvel da fração citoplasmática solúvel, purificação parcial da β -glicana, concentração à vácuo e secagem (SUCHER et al., 1975).

1.2.2 Componentes da parede celular

A parede celular das leveduras é bastante espessa, cerca de 70 nm, o que corresponde a aproximadamente 10 vezes a espessura da membrana plasmática. Hough (1990) atribui à parede celular uma espessura de 100-200 nm. Esta parede não apenas serve de proteção e estrutura, como também é metabolicamente importante.

A parede representa cerca de 14-15% da massa celular total, segundo Hendeskog e Mogren (1973), 15-25% segundo Rose (1993), cerca de 25% de acordo com Al-Bassam et al. (1986), ou até mesmo 30% (HOUGH, 1990). É constituída por aproximadamente 40% de β -glicanas, 40% de α -mananas, 8% de proteínas, 7% de lipídios, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina (HOUGH, 1990).

Quando a parede é tratada com álcali fraco ou certas enzimas hidrolíticas, são obtidas frações macromoleculares fragmentadas da parede celular. No caso de hidrólise com ácidos fortes, são obtidos glicose, manose, glicosamina, aminoácidos, fosfatos e lipídios.

A glicana obtida de levedura é um componente insolúvel da parede celular e quando submetida a secagem em *spray-dryer* apresenta-se como um pó claro, contendo cerca de 87% de carboidrato, 11% de proteína, menos de 0,5% de ácido nucléico, 1% de cinza e 6% de umidade. Os polissacarídeos da parede celular de levedura são constituídos de unidades de glicose e manose; na parede a proporção glicose : manose, é aproximadamente 2:1 (DZIEZAK, 1987).

Entre 60 a 90% da parede de *S. cerevisiae* é composta por polissacarídeos, sendo os outros componentes proteínas e lipídios; a maior parte dos polissacarídeos são glicanas e fosfomananas (ROSE, 1993).

Segundo Phaff (1971) vários trabalhos relatam que lipídios estão presentes em preparação de parede celular, sendo que alguns são extraídos por solventes orgânicos sem hidrólise prévia (lipídios livres), enquanto que outros necessitam de hidrólise (lipídios ligados) para serem extraídos. Um considerável grau de incerteza envolve a extração de lipídios de paredes isoladas de *S. cerevisiae*. Apesar de não estar esclarecida a função dos lipídios (BARTNICKI-GARCIA, 1968), alguns autores acreditam que sejam componentes verdadeiros da parede e atribuem aos mesmos uma participação na função estrutural (NICKERSON, 1963). Outros, como Rose (1993), afirmam que quaisquer lipídios da parede são provenientes de fragmentos da membrana celular que estavam ligados à parte interna da parede e foram recuperados durante o isolamento da parede.

A parede celular de *S. cerevisiae* contém cerca de 8% de proteína (HENDENSKOG; MOGREN, 1973). Todavia, a maioria destes dados é baseada na determinação do N total e uso do fator 6,25 para obter o teor de proteína; esses dados estão sujeitos a erros devido a teores variáveis de nitrogênio não protéico, como N-acetil-glicosamina (HALÁSZ; LÁSZTITY, 1991).

Vukovic et al. (1994) relataram que 2-3% da parede celular consiste de quitina que ocorre relacionada com a formação de cicatrizes resultantes da

gemulação no processo reprodutivo da levedura. A quitina é um polímero de ligação β (1-4) de N-acetilglicosamina.

A proteína estrutural da parede celular é firmemente ligada a polissacarídeos para formar uma estrutura complexa na qual a glicosamina é sugerida como o agente de ligação entre a proteína e o polissacarídeo. Assim, embora a glicose e a manose sejam os principais componentes da parte de carboidratos do complexo, a glicosamina é encontrada em pequenas quantidades em algumas frações (HALÁSZ; LÁSZTITY, 1991).

As proteínas presentes nas preparações de paredes celulares apresentam funções estruturais e enzimáticas (BARTNICKI-GARCIA, 1968). Essas proteínas são principalmente invertase, melibiase, fosfatase ácida, glicanases, aril β -glicosidade, fosfolipases e proteases; essas enzimas funcionam tanto anabólica como catabolicamente.

Dois tipos de proteína da parede celular são mencionados, de acordo com o polissacarídeo, componente do complexo proteína-carboidrato: glicoproteína e manoproteína (HALÁSZ; LÁSZTITY, 1991).

Tanto o RNA, como o DNA, ocorrem na célula de levedura, mas o teor de RNA é bastante superior, cerca de 50-100 vezes maior que o DNA. A quantidade de RNA pode atingir um terço da proteína total (HALÁSZ; LÁSZTITY, 1991).

Entre os estudos realizados sobre a morfogênese, tem sido dada grande atenção à biossíntese e estrutura dos componentes da parede celular. Com relação às paredes celulares de leveduras e fungos, foi verificado que elas apresentam estruturas complexas e dinâmicas, constituídas de múltiplas camadas compostas principalmente de polissacarídeos, proteínas e lipídeos (GAVER; HUYGHEBAERT, 1990). A parede consiste de uma camada interna de glicana (provavelmente com funções estruturais) e uma camada externa de manana, havendo proteínas engatadas entre as duas (DZIEZAK, 1987). Os resultados obtidos por Vukovic et al. (1994) sugerem que *S. cerevisiae* apresenta parede celular com estrutura em camadas, sendo as cadeias de manana externas e as glicanas internas.

As proteínas da parede celular podem ser extraídas por álcali e precipitadas com sulfato de amônio resultando em um aumento das frações de glicoproteínas (HALÁSZ; LÁSZTITY, 1991).

A glicana está unida à proteína e representa o componente estrutural mais abundante, localizado na parte interna da parede (HOUGH, 1990). A manana encontra-se também ligada à proteína, às vezes através de hexosamina, e tende a localizar-se na parte externa da parede (HOUGH, 1990). Vukovic et al. (1994) relataram que a parede celular é composta de uma glicana na qual diferentes manoproteínas são esparsas.

Estudos realizados com diversos fungos e leveduras demonstram que normalmente polissacarídeos superficiais, tais como mananas, galactomananas e ramnomananas estão ligados firmemente a peptídios (LLOYD, 1970; GANDER, 1974; BALLOU, 1976). Em leveduras foi verificado que a ligação da manana com o polipeptídio era feita através de uma ponte de 1 a 7 resíduos de N-acetilglicosamina. Além da ligação com os polissacarídeos, o peptídio apresenta ainda diversos oligossacarídeos de manose a ele ligados diretamente através de ligações envolvendo ácidos aminados hidroxilados, como a serina (BALLOU, 1976).

Vukovic et al. (1995) sugeriram que interações proteína-glicana podem ser responsáveis pela localização de proteínas extracelulares da levedura, na parede celular.

A composição de polissacarídeos da parede celular das leveduras é afetada por muitos fatores, já comprovados, tais como a linhagem (DELPECH et al., 1977), condições de cultivo e idade da cultura (DELPECH et al., 1977). De acordo com Nickerson (1974) existe uma estreita correlação entre composição da parede celular e grupamento taxonômico baseado na morfologia. A presença de manana como um componente da parede celular das leveduras as diferencia de outros fungos.

De modo geral, determinados polissacarídeos presentes nas paredes celulares de fungos e leveduras têm um papel importante em determinar a rigidez da parede e manter a morfologia celular (quitina e glicana), enquanto outros estão

mais diretamente envolvidos com a resposta imune (mananas, fosfomananas, galactomananas e ramnomananas). Outros componentes, como proteínas ou complexos de proteínas e polissacarídeos foram também relacionados à manutenção da rigidez da parede celular em *Saccharomyces cerevisiae* (POWER; CHALLINOR, 1969).

Além de exercer funções estruturais, a parede celular de leveduras está envolvida no transporte de nutrientes para o citoplasma destinados ao metabolismo e crescimento. Esse transporte, em alguns casos, é auxiliado por enzimas localizadas na parede (MACWILLIAM, 1970).

Estudos realizados com parede celular de *S. cerevisiae* demonstraram a presença de manana, glicana solúvel em água, glicana álcali solúvel, glicana insolúvel e glicana ácido solúvel (MANNERS et al., 1973; BALLOU, 1974; PHAFF, 1977).

Glicanas. A principal glicana presente na parede de *S. cerevisiae* é alcáli e ácido insolúvel com ligação β (1→3); há uma pequena proporção de glicana β (1→6). A pequena quantidade de quitina é associada com a glicana álcali insolúvel (ROSE, 1993).

Embora uma grande quantidade de dados a respeito da estrutura de polissacarídeos da parede celular tenha sido publicada até 1970, sumarizados por Phaff (1971), atualmente aceita-se que o principal polissacarídeo de espécies de *S. cerevisiae* seja a glicana. A distribuição exata de ligação β (1→3) e β (1→6) na molécula de glicana ainda não foi totalmente esclarecida; provavelmente existam diferentes tipos de glicana, quanto à ramificação e comprimento das regiões não ramificadas em paredes celulares de linhagens diferentes (HALÁSZ; LÁSZTITY, 1991).

Glicana álcali insolúvel. Bell e Northcote (1950) sugeriram que a estrutura das glicanas álcali insolúveis de *Saccharomyces sp* possuía uma estrutura ramificada com cadeias relativamente curtas de resíduos de glicose (1→3), interligadas por

cerca de 11% de ligações β (1 $\rightarrow$ 2) glicosídicas. O comprimento médio, confirmado por oxidação por periodato, era de nove resíduos de glicose.

Ao contrário, Peat et al. (1958a) usando hidrólise ácida parcial, concluíram que a glicana era linear e continha certa seqüência de resíduos β glicose (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6). A presença de cerca de 10-20% de ligações (1 $\rightarrow$ 6) foi confirmada posteriormente por Peat et al. (1958b).

Manners et al. (1973) realizaram análises de metilação, oxidação com periodato e estudos de degradação enzimática. Concluíram que a glicana de levedura tinha uma estrutura ramificada, contendo cadeias principais de resíduos de β (1 $\rightarrow$ 6) glicose, as quais eram ligadas às cadeias laterais lineares de resíduos de β (1 $\rightarrow$ 3) glicose.

A β (1 $\rightarrow$ 3) glicana, componente em maior proporção, é considerada responsável pela formação de um "envelope" que proporciona rigidez à parede celular. O peso molecular de cerca de 240.000 representa um valor mínimo e se baseia na hipótese que cada molécula contém um resíduo livre de glicose redutora. A validade dessa consideração ainda não é reconhecida, porém não foi avaliado outro método para determinação do peso molecular dessas macromoléculas insolúveis (ASPINAL, 1973).

A presença de pequena, mas significativa quantidade de β (1 $\rightarrow$ 3) glicana em células de *S. cerevisiae*, direciona à discussão sobre sua função biológica e o controle da relativa proporção de síntese dos dois tipos de β -glicana. Sendo a proporção dos dois tipos de ligação na β (1 $\rightarrow$ 6) glicana diferentes daquelas de β (1 $\rightarrow$ 3) glicana, é improvável que a primeira seja uma intermediária na biossíntese da última (MANNERS et al., 1974).

Alternativamente, a β (1 $\rightarrow$ 6) glicana poderia funcionar como plasticizadora ou material de reserva no envelope relativamente rígido constituído pelo maior componente, a β (1 $\rightarrow$ 3) glicana, onde sua função poderia ser o de prevenir a excessiva agregação de segmentos lineares da cadeia, apesar de ser mantida uma certa flexibilidade na parede, o que se faz necessário para a expansão da parede durante o crescimento (MANNERS et al., 1974).

Glicana álcali solúvel. Pesquisas iniciais relataram a presença de glicana alcali-solúvel em preparação de *Saccharomyces cerevisiae*, porém sua estrutura molecular ainda não foi esclarecida.

Para determinação da estrutura fina da glicana álcali-solúvel, Fleet e Manners (1977) procederam a uma degradação enzimática. A estrutura global foi uma macromolécula com uma parte central sendo β (1 $\rightarrow$ 3) glicana com baixo grau de ramificação (cerca de 2,0%) e resíduos ocasionais de ligações (1 $\rightarrow$ 6). A esta parte central eram ligadas várias cadeias laterais contendo principalmente resíduos com ligações (1 $\rightarrow$ 3) ou (1 $\rightarrow$ 6), ou ainda, uma mistura de ambas.

Esta glicana freqüentemente continha um fragmento de manana que era obtido pela ação de uma endo β (1 $\rightarrow$ 6)-glicanase. Isso implicaria que parte da manana da parede celular pudesse ser presa por alguns resíduos de glicose (1 $\rightarrow$ 6), apesar da natureza dessa associação (se é covalente ou outro tipo) não ter sido ainda estabelecido (FLEET; MANNERS, 1977).

Mananas. As mananas são constituídas de moléculas bastante ramificadas com um grupo final e um ponto de ramificação a cada 3 unidades de manose; assim, esses polissacarídeos contêm ligações (1 $\rightarrow$ 2), (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6) (STEWART; BALLOU, 1968).

Ballou (1976) verificou que, em uma linhagem de *S. cerevisiae*, cerca de 90% da parede celular é composta por manose, 10% de proteína e pequena proporção de fósforo na forma de ligação de fosfodiéster.

Há evidências de que as mananas, juntamente com peptídios complexos constituem a camada mais externa da parede celular das leveduras (BALLOU, 1976; CABIB, 1975). Esses polissacarídeos apresentam-se bastante ramificados, contendo uma cadeia principal constituída de ligações α (1 $\rightarrow$ 3), substituídas nas posições 2 por cadeias laterais contendo unidades de α -D-manopirranose ou oligossacarídeos com unidades de manose ligadas por ligações (1 $\rightarrow$ 2) e (1 $\rightarrow$ 3) (STEWART; BALLOU, 1968).

Um estudo de mananas de diversas fontes, através da técnica de acetólise, mostrou que a estrutura da manana varia entre linhagens (STEWART; BALLOU,

1968). O teor de manana de 4 linhagens de levedura de cervejaria também apresentou ampla variação, de 7 a 36% da quantidade total de carboidratos (trealose, glicogênio, manana e β glicana), de acordo com Manners et al. (1971).

As mananas nas leveduras comportam-se como antígenos, sendo que as cadeias laterais representam os seus grupos imunodominantes (BALLOU, 1974, HASENCLEVER; MITCHELL, 1964; SPENCER; GORIN, 1973).

O conteúdo de fósforo das mananas na parede celular das leveduras é variável. No caso de *Saccharomyces cerevisiae*, o fosfato é ligado à posição 6 das unidades de manose na cadeia lateral (NICKERSON, 1974).

Nas manoproteínas de *S. cerevisiae*, o teor de fosfatos é menor que 0,1%. A presença destes grupos fosfato, altamente carregados nas regiões externas da parede celular, pode afetar a forma como estas células são atraídas e unidas às outras superfícies (REISS et al., 1992).

1.2.3 Aplicação dos polissacarídeos da parede celular de levedura

Na área de alimentos, muitos polissacarídeos de origem microbiana têm sido amplamente utilizados como espessantes, devido à propriedade de viscosidade em sistemas aquosos, sendo empregados. A parede celular bruta, lavada com água, produz viscosidade mínima de 500 centipoise quando suspenso em solução aquosa, a 10% em peso e 25°C, de acordo com a patente americana (E.U.A. Pat. 4, 122), descrita por Robbins e Seeley (1977).

Outra aplicação de grande interesse é a utilização como substituto de gordura em certos tipos de alimentos dietéticos, tais como cobertura de saladas, sorvetes etc., devido ao sabor agradável e textura suave.

A glicana pode ser usada como emulsificante, estabilizante, espessante e texturizante em molhos para saladas. A *Food and Drug Administration (FDA)* permite seu uso como estabilizante, espessante e texturizante em doces e sobremesas congeladas, coalhadas, pastas de queijo e análogos (DZIEZAK, 1987).

A glicoproteína extraída das leveduras tem sido utilizada como suplemento protéico para ração de gado, embora apresente propriedades interessantes como bioemulsificante (CAMERON et al., 1988).

A glicana de levedura encontra também uso como fibra dietética. A fibra dietética é uma mistura de diferentes compostos (principalmente polissacarídeos) que permanecem intactos após tratamento enzimático específico. A parte insolúvel da fibra dietética consiste de celulose e lignina e a solúvel de substâncias pécicas, gomas e glicanas mistas 1-3 e 1-4 (HALASZ; LASZTITY, 1991).

A glicana incorporada na dieta hipercolesterolêmica de ratos baixou rapidamente e de forma significativa os níveis de colesterol sérico, podendo ser considerada um agente hipocolesterolemizante (ROBBINS; SEELEY, 1977).

Na área médica, a β -glicana isolada de *Saccharomyces cerevisiae* tem sido referida como apresentando propriedades imunoestimulantes. Essa glicana pertence à classe de drogas conhecidas como Modificadores da Resposta Biológica (Biological Response Modifiers - BRMs), com efeito benéfico em uma variedade de patologias experimentais causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitos. Além disso, atua como modificadora da supressão imunológica e também de doenças neoplásicas em nível experimental (WILLIAMS et al., 1991).

1.2.4 Propriedades funcionais tecnológicas

Propriedade funcional tecnológica é uma propriedade físico-química que afeta o processamento e o comportamento do ingrediente funcional em um sistema alimentar, julgada pelos atributos de qualidade do produto final. As propriedades funcionais são as várias características que o ingrediente funcional hidratado transmite ou com o qual contribui em um produto alimentício: solubilidade, capacidade de absorção e retenção de água e óleo, viscosidade, capacidade emulsificante e formação de géis.

O termo "funcionalidade" aplicado aos ingredientes funcionais está relacionado às propriedades não nutricionais (físicas, químicas e estruturais/conformacionais) incluindo: tamanho, forma, seqüência e composição

de aminoácidos, carga e sua distribuição, relação hidrofobicidade / hidrofiliabilidade, graus de estruturação, rigidez/flexibilidade em resposta a estímulos externos que influenciam na utilidade de um ingrediente em um alimento. A maior parte das propriedades funcionais influenciam o caráter sensorial de um alimento, em especial a textura (KINSELLA, 1976; BORDERÍAS; MONTERO, 1988; SMITH, 1988; DAMORADAN, 1989; MAHMOUD, 1994; VODJANI; WHITAKER, 1994).

As propriedades funcionais podem ser alteradas por condições de processamento; hidrólise; métodos de purificação; fatores ambientais (força iônica, constante dielétrica, pH, temperatura, viscosidade, solventes, cátions di e trivalentes); oxidação de grupos SH; adição de proteína de cargas opostas e interação entre os vários componentes dos alimentos (BORDERÍAS; MONTERO, 1988; MAHMOUD, 1994; VODJANI; WHITAKER, 1994; WHITAKER, 1995; PANYAM; KILARA, 1996).

Vários trabalhos de revisão analisaram aspectos das propriedades funcionais de proteínas em um sistema alimentar, como por exemplo, Halász e Lásztity (1991) verificaram que a solubilidade das proteínas de levedura, principalmente em pHs mais comuns nos alimentos é muitas vezes inferior ao de outras proteínas. Otero et al. (1996) observaram que a capacidade de retenção de água e a capacidade de retenção de óleo do concentrado protéico de levedura e da proteína da parede celular foram superiores a capacidade de retenção de água e de óleo isolado protéico de soja. Porém, a parede celular (PC) é uma fração rica em carboidratos. Essa fração carboidrática é rica em: mananas, glicanas, glicoproteína, lipídios neutros e fosfolipídios.

Com exceção da fração glicoproteína que apresenta em torno de 35,51% de proteína, as outras frações (mananas e glicanas) são ricas principalmente em carboidratos e fibras.

1.2.5 Definição e Composição das fibras alimentares

O reconhecimento do papel das fibras alimentares na dieta humana só foi elucidado após o trabalho de dois médicos ingleses, Dennis Burkitt e Hugh

Trowell, desenvolvido na década de 70 na África. Estes médicos observaram que a dieta dos africanos rurais era baseada em alimentos ricos em fibras (cereais integrais, verduras, frutas e leguminosas) e que nesta população era praticamente inexistentes as doenças gastrointestinais, tais como prisão de ventre, diverticulite, diabetes, hemorróidas, hipercolesterolemia e câncer do cólon. De acordo com Franco (1992), dietas mais saudáveis são aquelas mais naturais e mais relacionadas com os hábitos primitivos do homem. A fibra tem grande importância na alimentação humana, tendo-se verificado, após mais de duas décadas de investigações, que a fração fibra dos alimentos desempenha papel significativo na nutrição, dependendo, entretanto do tipo e da quantidade presente na alimentação (FRIAS, 1996). As fibras alimentares são designadas como a porção residual dos vegetais resistente à hidrólise enzimática no trato gastrointestinal humano, que servem como substrato para as bactérias do cólon (YOUNES et al., 1996). Segundo Roberfroid (1993), a fibra abrange uma grande variedade de substâncias com diferentes propriedades físicas e vários efeitos fisiológicos. Sendo assim, no sistema digestivo, todas elas resistem à hidrólise pelas enzimas digestivas, mas podem ser hidrolisadas e fermentadas pela microflora intestinal.

As fibras são constituídas por uma associação de oligômeros de alto peso molecular, que são macromoléculas compreendendo grupos químicos divididos em frações insolúveis e solúveis. Esta classificação apresenta importância quanto à sua ação, pois muitos efeitos fisiológicos das fibras solúveis são diferentes dos efeitos das fibras insolúveis (SHINNICK et al., 1991).

1.2.6 Propriedades físicas e químicas das fibras alimentares

No trato gastrointestinal, as fibras alimentares produzem respostas fisiológicas decorrentes das seguintes propriedades:

Degradação por ação microbiana: as fibras alimentares não podem ser degradadas pelas enzimas do trato digestivo humano; entretanto, são fermentadas e parcialmente degradadas pela microflora natural presente no intestino grosso (ROBERFROID, 1993). Um dos efeitos do processo de degradação microbiana da

fibra alimentar é a produção de ácidos graxos de cadeia curta, que podem ser usados pelas células do cólon como fonte de energia, podendo também influenciar no metabolismo lipídico e glicídico (HUGHES, 1991).

Capacidade de hidratação: a hidratação das fibras resulta na formação de uma matriz gelatinosa que provoca aumento na viscosidade do conteúdo gastrointestinal retardando, conseqüentemente, o esvaziamento gástrico e a absorção de nutrientes (SCHNEEMAN, 1989).

Complexação com moléculas orgânicas: está relacionada com adsorção de ácidos biliares "*in vivo*" pelas fibras solúveis, sendo medida pela excreção de ácidos biliares no bolo fecal. Diversos estudos sugerem que as fibras solúveis podem diminuir a absorção de ácidos graxos e colesterol no intestino devido a sua viscosidade, ao formar um gel coloidal no lúmen intestinal. Ocasionalmente também diminuição na absorção dos lipídios, o que leva conseqüentemente à inibição da formação da micela de gordura, devido a adsorção dos ácidos biliares pela fibra solúvel (SHINNICK et al., 1991).

Capacidade de troca catiônica: algumas dietas com alto teor de fibra ocasionam a redução da absorção de minerais e eletrólitos pelo organismo, dosados pelo aumento destes na excreção fecal. Esta adsorção de minerais provocada pela fibra deve-se à presença de fitatos e compostos fenólicos, presentes em determinados tipos de fibra, os quais formam complexos insolúveis com minerais em pH fisiológico (FROLICH; ASP, 1985; SCHNEEMAN, 1989).

Tamanho da partícula: a propriedade de hidratação e a capacidade de fermentação de um alimento fonte de fibra são diretamente influenciadas pelo tamanho da partícula (SCHNEEMAN, 1989). O grau de trituração da fibra é um fator importante capaz de produzir efeitos diferentes; por exemplo, fibras com granulometria menor que 200 nm apresentam maior capacidade de hidratação e fermentabilidade, pois possuem maior superfície de contato enquanto fibras com granulometria de tamanho médio entre 200-500 nm possui capacidade de reter água, enquanto fibras com granulometria maior que 800 nm são mais eficazes na estimulação da defecação, aumentando o volume fecal e evitando a constipação (EASTWOOD; MORRIS, 1992).

1.2.7 Efeitos fisiológicos das fibras

As fibras alimentares apresentam vários efeitos fisiológicos, os quais dependem das suas propriedades físicas e químicas e da sua fonte alimentar original. As propriedades físicas têm influência funcional no trato gastrointestinal (EASTWOOD; MORRIS, 1992).

As fibras são classificadas em solúveis e insolúveis em água. Fibras insolúveis, tais como celulose, algumas hemilceluloses e ligninas estão presentes em cereais, verduras, hortaliças e leguminosas. Esta fração exerce um efeito físico-mecânico, aumentando o volume do bolo alimentar e das fezes e diminuindo o tempo de trânsito intestinal. Esses componentes, ao se hidratarem, ligam não somente água, mas também elementos minerais, vitaminas, sais biliares, hormônios e lipídios, dificultando a absorção e aumentando a excreção dessas substâncias (SGARBIERI; PACHECO, 1999).

Alguns componentes solúveis, como pectinas, gomas, mucilagens e certas hemilceluloses predominam em frutas, leguminosas e hortaliças (SHINNICK et al., 1991). Estas frações solúveis absorvem muita água a partir do estômago, formando sistemas viscosos de consistência gelatinosa que podem retardar o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal. Esses polissacarídeos tendem a formar uma camada viscosa de proteção à mucosa do estômago e intestino delgado, dificultando a absorção, principalmente de açúcares e gorduras, sendo este talvez o mecanismo pelo qual esses polissacarídeos ajudam a baixar os níveis de lipídios e a concentração no sangue (PAK; ARAYA, 1996; SGARBIERI; PACHECO, 1999).

As celulosas não são hidrolisadas pelas enzimas digestivas, mas são pouco degradadas pelos microrganismos; seu poder de absorção de água varia com as diferentes espécies de celulose. Também aumentam o volume fecal e aumentam a tolerância à glicose (HUGHES, 1991).

As hemilceluloses sofrem degradação no intestino delgado e grosso, sendo que 70 a 90% são degradadas pela ação bacteriana (FRANCO, 1992). Aumentam a viscosidade, podem se ligar a ácidos biliares, aumentam ácidos graxos de cadeias curtas, aumentam o volume fecal, aumentam a tolerância à

glicose, diminuem o colesterol sangüíneo e diminuem a incidência de câncer de cólon (HUGHES, 1991).

As ligninas são encontradas na parte lenhosa dos vegetais; elas não são degradadas nos intestinos, porém sua presença dificulta a ação de polissacarídeos celulósicos e não celulósicos e quanto mais lignificada a estrutura da parede celular, menor será a sua degradação (FRANCO, 1992). Elas diminuem o tempo de trânsito intestinal e formam ligações com ácidos biliares (HUGHES, 1991).

As pectinas são transformadas pelas bactérias colônicas em metabólitos que contribuem para a ação laxativa, por aumentar a atividade osmótica do fluido luminal. Elas também contribuem para o crescimento de bactérias colônicas, aumentando assim a massa fecal (FRANCO, 1992). Além disso, aumentam a tolerância à glicose e podem diminuir a concentração sangüínea de colesterol (HUGHES, 1991).

As gomas apresentam efeito fisiológico de aumentar a concentração de ácidos graxos de cadeias curtas e são degradadas pelas bactérias colônicas (HUGHES, 1991). A propriedade mais importante das gomas é a capacidade de conferir viscosidade a um sistema aquoso, através da absorção da água e interação coloidal (ACTON et al., 1982).

As mucilagens são polissacarídeos neutros, muito parecidos com as gomas e sofrem degradação microbiana total no intestino (SCHENEEMAN, 1989).

As pesquisas têm demonstrado que alguns oligossacarídeos não digeríveis estimulam efetivamente a absorção e retenção de alguns minerais, como cálcio, magnésio, ferro e zinco (ANDERSON et al., 2001; SCHOLZ-AHRENS et al., 2001).

As fibras solúveis retardam o esvaziamento gástrico e a velocidade do trânsito intestinal, enquanto as fibras insolúveis parecem acelerar a velocidade do trânsito intestinal. As fibras solúveis sofrem fermentação quase total no cólon (MONGEAU et al., 1990) e as fibras insolúveis praticamente não sofrem ação das bactérias no intestino grosso, pois não sendo digeridas completamente, sofrem reduzida fermentação das bactérias colônicas (EASTWOOD; MORRIS, 1992).

Pode-se dizer que a fermentação afeta as propriedades fisiológicas da fibra provocando flatulência, acidificação do pH intestinal e produção de ácidos graxos de cadeias curtas (FRANCO, 1992).

1.2.8 Reações adversas da fibra alimentar

Estudos com humanos e animais têm mostrado que a quantidade de fibras presentes na dieta pode provocar efeitos adversos. No entanto, os benefícios atribuídos à fibra alimentar têm sido levado em conta para o aumento do consumo de fibras. Todo ser humano que mudar seu hábito alimentar abruptamente, ou seja, passando de uma dieta pobre em fibra para uma rica em fibra, poderá aumentar a produção de gases e apresentar diarreia ou constipação intestinal (KANAUCHI; AGATA, 1997).

A dieta com fibra apresenta um efeito mais acentuado em relação à ligação de cátions no intestino delgado. A dieta rica em fibras pode causar uma diminuição na absorção dos principais cátions como cálcio, magnésio, ferro e zinco. Frolich e Asp (1985) verificaram que a redução na absorção de minerais provocada pela dieta rica em fibra pode estar associada com as proteínas ou fitatos. Contudo, o efeito da fibra, em relação à absorção de minerais, torna-se importante quando as dietas são deficientes nesses nutrientes, como ocorre na maioria dos países latinoamericanos.

São poucos os estudos que verificam a ação das fibras sobre o metabolismo das proteínas; um aumento da ingestão de fibras alimentares, em populações que ingerem quantidades insuficientes de proteínas, pode reduzir o balanço de nitrogênio, prejudicando o estado nutricional dos indivíduos (HEYDE, 1991).

1.2.9 Fibras alimentares e colesterol

Diversos trabalhos têm sido realizados sobre o uso de suplementos de fibras alimentares na prevenção e tratamentos de doenças como diabetes, hipercolesterolemia, doenças cardiovasculares, doenças diverticulares e câncer de colón (SLAVIN, 1987).

A composição química das fibras, seu estado físico e sua concentração nos alimentos pode exercer importante papel no metabolismo lipídico e glicídico em humanos (SCHENEEMAN, 1989). As fibras insolúveis reduzem a reabsorção de colesterol (HUGHES, 1991), enquanto as fibras solúveis também têm grande capacidade de reduzir a concentração de colesterol sérico (JENKINS et al., 1997). As fibras solúveis, além de diminuir a absorção de glicose, podem diminuir os níveis de colesterol sérico e de triacilgliceróis, servem como substrato para formação de ácidos graxos de cadeia curta e aumentam a excreção de ácidos biliares (SCHENEEMAN, 1989; JONES, 1994).

De acordo com Sgarbieri e Pacheco (1999), algumas suposições procuram explicar a ação preventiva da fibra alimentar sobre a incidência de câncer de cólon, como: a) redução da exposição a agentes carcinogênicos, pelo aumento do bolo fecal ou diminuição do tempo de trânsito do bolo intestinal; b) redução da produção de ácidos biliares secundários (desoxicólico, litocólico), pela diminuição de bactérias produtoras de enzimas (7- α -dioxilases) responsáveis pela conversão dos ácidos biliares primários (cólico e quenodesoxicólico) nos ácidos secundários, que são pró-carcinogênicos; c) efeito ligante da fibra a hormônios (estrógenos promotores de câncer de cólon e mama); d) produção de ácidos graxos de cadeias curtas que contribuem para o abaixamento do pH do bolo intestinal e desempenham papel fisiológico importante em nível de tecido epitelial e hepático.

Vários animais de laboratório têm sido utilizados como modelos no estudo de diversos problemas nutricionais. No entanto, o rato (*Ratus norvegicus*) ocupa uma posição dominante devido às vantagens de sua utilização como tamanho, fácil manejo, fecundidade, baixo consumo, resistência a doenças e baixo custo de manutenção.

Segundo Mongeau et al. (1990), o metabolismo do colesterol em ratos tem controle limitado, diferente daquele verificado em humanos, sendo mais difícil de induzir mudanças nos níveis de colesterol no sangue do animal. Hexeber et al (1993) relata que, apesar disso, o rato é ainda um modelo experimental muito estudado para esta finalidade. Frias e Sgarbieri (1998a,b) verificaram o efeito da

goma guar sobre os níveis séricos de lipídios e concentração de glicose em ratos Wistar diabéticos. Os resultados desta pesquisa mostraram que a goma guar, quando introduzida na dieta em concentrações iguais ou superiores a 10%, reduzia significativamente a concentração de glicose no sangue e também os níveis de colesterol total e triacilgliceróis em ratos, podendo ser efetiva no tratamento da hipercolesterolemia, diabetes e obesidade.

A inclusão de 5% de fibra (farelo de trigo, soja e milho) em dietas hipercolesterolêmicas contendo 1% de colesterol, reduziu os níveis de lipídios totais do plasma e do tecido hepático e cardíaco de ratos machos Wistar durante um período de 4 semanas de alimentação. Além disso, o colesterol total também diminuiu. O efeito mais notável ocorreu com a fibra de soja que reduziu em 25,65% os lipídios totais e em 43,2% o colesterol plasmático. A redução do colesterol foi devida, principalmente, à redução das frações LDL e VLDL. A fração HDL não foi significativamente afetada (UBEROI et al., 1992).

Em estudos realizados por Robbins e Seeley (1977), com 20 ratos albinos (10 machos e 10 fêmeas) que receberam dietas hipercolesterolêmicas (1% de colesterol) com adição de 5 e 20% de celulose, e 20% de parede celular de levedura (β -glicana), por um período de 5 meses, foi constatado que a dieta com 20% de parede celular (β -glicana) baixou os níveis de colesterol e triacilgliceróis quando comparados com as dietas de 5 e 20% de celulose.

Hunninghake et al. (1994) submeteram grupos de homens e mulheres entre 18 e 70 anos com hipercolesterolemia moderada, por um período de 9 semanas (período de estabilização) ao tratamento com 10 e 20g por dia de suplemento com fibra onde um grupo foi mantido em fibra solúvel usando uma mistura de goma guar e pectina, outro grupo em fibra insolúvel usando soja, ervilha e aveia e um grupo controle usando placebo. Quando completaram 15 semanas de tratamento, os indivíduos apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de colesterol-LDL, quando comparados com o grupo placebo. Contudo, os suplementos com fibras não apresentaram efeito significativo para o colesterol-HDL e triacilgliceróis.

Abreu e Millán (1994) realizaram estudo com coelhos para verificar os efeitos da proteína de soja e proteína de levedura nos níveis de colesterol. As dietas continham 20% de proteína, 9% de óleo de coco, 1% de óleo de milho e não continham colesterol. Observou-se uma diminuição significativa nos níveis de colesterol-HDL e colesterol total nos coelhos alimentados com levedura.

Pesquisas com humanos, utilizando dietas com altos teores de fibras solúveis, foram realizadas por Tinker et al. (1991). No estudo, homens adultos entre 29-79 anos receberam dietas ricas em fibra, usando a ameixa como fonte de fibra. Os homens receberam diariamente 6% de fibra de ameixa, por um período de 8 semanas. Foi constatada uma diminuição nos níveis de colesterol sérico e um aumento deste componente na excreção fecal.

Considerando os diferentes estudos, observa-se que as fibras alimentares influenciaram os níveis séricos de colesterol, tanto em humanos como em animais. Tem sido demonstrado que as fibras solúveis reduzem a absorção de ácidos graxos e os níveis de colesterol através da sua capacidade de hidratação que resulta na formação de uma matriz de gel no lume intestinal, interferindo na digestão e absorção de lipídios (SCHENEEMAN, 1989). Por outro lado, as fibras solúveis ao serem fermentadas no cólon levam à formação de metabólitos, aos quais se têm atribuído características hipocolesterolêmicas. Assim, os ácidos graxos de cadeias curtas (acetato, propionato e butirato) são produzidos pela degradação da fibra solúvel por microrganismos no intestino grosso, sendo que estes podem ser utilizados como substrato energético pelas células intestinais, ou serem absorvidos pela mucosa intestinal, passando para a corrente sanguínea (HUGHES, 1991). Roberfroid (1993) propôs que ambos, acetato e propionato, afetariam o metabolismo dos lipídios. Porém, experimentos mostraram que o efeito na redução do colesterol depende dos níveis de colesterol, para verificar a influência das fibras alimentares como preventivo da hipercolesterolemia. O grau de solubilidade das fibras alimentares é uma característica que influencia nas suas propriedades funcionais. As fibras solúveis aumentam o tempo de trânsito intestinal, diminuem a velocidade de esvaziamento gástrico e reduzem a elevação da glicemia pós-prandial e do colesterol sérico. As fibras insolúveis, por outro lado,

diminuem o tempo de trânsito intestinal, aumentam o volume fecal e reduzem a absorção da glicose (CAVALCANTI, 1989; ANDERSON et al., 1990; HUGHES, 1991; PERIAGO et al., 1993; AREAS; REYES, 1995).

As características físico-químicas das fibras alimentares contribuem para a modificação de alguns fatores de risco da doença coronariana. Tem sido verificado que os níveis de colesterol sérico são reduzidos pela adição de fibra na dieta (ARVILL; BODIN, 1995; KRITCHEVSKY, 1997; JENKINS et al., 1998).

Componentes da dieta, como fibras de grãos de leguminosas e outros vegetais apresentam resposta na alteração do metabolismo lipídico, em humano e animais de experimentação, com redução dos lipídios circulantes e aumento de excreção fecal de ácidos biliares. Estas mesmas fibras reduzem os níveis de glicose pós-prandial, insulina e outros hormônios (VAHOUNY, 1982; ARVILL; BODIN, 1995; KRITCHEVSKY, 1997; JENKINS et al., 1998; HYUN; SUN, 1998; FELDMAN, 2001).

Estudos epidemiológicos realizados com 68.782 mulheres, com idade entre 37 e 64 anos e 43.757 homens, com idade entre 40 e 75 anos, com diagnóstico prévio de angina, infarto do miocárdio, câncer, hipercolesterolemia ou diabetes, sugeriram que a ingestão de fibra constitui um fator importante na prevenção da doença coronariana (RIMM et al., 1996; WOLK et al., 1999).

Muitos estudos com animais e humanos procuram comparar o efeito hipocolesterolêmico das fibras alimentares solúveis de diferentes fontes de alimentos como por exemplo a fibra de aveia, Konjac manana, pectina, quitosana, goma guar, farelo de arroz (AOYAMA et al., 1988; LABELL, 1992; FERNANDEZ et al., 1992; MATHESON et al., 1995; WINBLAD et al., 1995) e ainda, os possíveis mecanismos com que essas fibras reduzem os níveis de colesterol plasmáticos, quer seja pela sua alta viscosidade atuando como adsorvente, captura de ácidos biliares e colesterol, ou, ainda, por interferência com a formação de micelas que é essencial para a absorção do colesterol. Esse efeito é mediado pela interferência com a absorção de ácidos biliares, por adsorção ou seqüestro no lúmen intestinal, bem como a depressão na absorção do colesterol no intestino, resultando no aumento da excreção fecal. A redução da reabsorção no intestino e conseqüente

aumento na excreção fecal, traduz-se no aumento do desvio do colesterol para a síntese de ácidos biliares no fígado, aumentando a regulação dos receptores de lipoproteínas, ao mesmo tempo em que reduz as concentrações plasmáticas de colesterol (KRITCHEVSKY; STORY, 1986; ANDERSON et al., 1990; TRUSWELL; BEYNEN, 1992; MOUNDRAS et al., 1994; KRITCHEVSKY, 1997).

1.2.10 Fermentação das fibras e hipercolesterolemia

O grau de fermentação das fibras alimentares depende da solubilidade, estrutura e grau de lignificação das mesmas (NYMAN et al., 1990).

Alimentos com teores elevados de fibra solúvel e um baixo grau de lignificação são usualmente mais susceptíveis à degradação bacteriana. Dessa forma, fibras alimentares de farelo e alguns grãos integrais de cereais são bastante resistente à degradação bacteriana (NYMAN et al., 1985; NYMAN et al., 1986).

No intestino grosso, as fibras podem ser fermentadas por ação de bactérias anaeróbicas, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, com predominância dos ácidos propiônico, butírico e acético, assim como dióxido de carbono, hidrogênio e metano. Ainda, o tipo de fibra solúvel utilizada poderá produzir concentrações diferentes de acetato e propionato. Assim, Moundras et al. (1994) verificaram, em ratos, cuja dieta foi adicionada de pectina e goma arábica, que a produção de propionato é baixa e a captura hepática de acetato é relativamente alta com essas fibras, enquanto que na dieta contendo goma guar e β -ciclodextrina, a produção de propionato é elevada e a captura hepática de acetato é baixa.

Estudos têm sugerido que o propionato, produzido pela fermentação das fibras por bactérias no cólon, pode exercer um controle na síntese de colesterol (HILLMAN et al., 1988; BERGMAN, 1990). Possivelmente, o abaixamento do pH pelos ácidos graxos de cadeia curta, produzidos pela fermentação no cólon, diminui a solubilidade e a reabsorção dos ácidos biliares (RÉMÉSY et al., 1993). Ainda, cabe destacar que o propionato é o principal ácido graxo de cadeia curta metabolizado pelo fígado, sendo, particularmente, um substrato da gliconeogênese, enquanto que uma grande fração de acetato é metabolizada

pelos tecidos extra hepáticos. Assim, outro mecanismo para a redução dos níveis séricos de colesterol pode ser explicado através da ação do propionato no fígado, o qual atua diminuindo a síntese de colesterol a partir da inibição da enzima hidroximetilglutaril CoA-redutase (HMG-CoA redutase) (HILLMAN et al., 1988; BERGMAN, 1990). O efeito no metabolismo do colesterol pode ocorrer por ser o propionato, um inibidor na síntese de ácidos graxos com conseqüente produção de VLDL pelas células hepáticas. Todavia, qualquer que seja o mecanismo de ação do propionato, sua concentração portal parece não ser um fator determinante para a redução de colesterol, visto que quando da introdução de pectina, que produz na fermentação colônica maior concentração de acetato, mostrou-se também efetiva na redução do colesterol sérico (MOUNDRAS et al., 1994).

1.2.11 Efeito da ingestão de frutooligossacarídeos sobre a população de bifidobactérias

O trato digestivo dos seres humanos e outros animais contém uma grande coleção de microrganismos, a maioria bactérias que formam a microbiota normal de indivíduos sãos. Grande parte dos membros desse complexo ecossistema tem uma função metabolicamente ativa no hospedeiro, havendo uma série de características fisiológicas, bioquímicas e imunológicas do organismo que são, na verdade, associadas à presença dessa comunidade (LUCKEY, 1963; GORDON; PESTI, 1971). Alguns exemplos destacados por Tannock (1998) e que têm forte influência sobre a saúde e o bem-estar incluem o metabolismo dos ácidos biliares, o rendimento cardíaco e a utilização de oxigênio, a concentração de colesterol no soro sangüíneo, a concentração de gama-globulinas no sangue, a produção de ácidos graxos de cadeia curta, o controle do pH intestinal, a composição dos gases intestinais e a velocidade de trânsito do conteúdo intestinal.

Dentre as bactérias que compõem a microbiota intestinal normal dos indivíduos humanos, dois grupos têm se revelado particularmente envolvidos nesses fenômenos, as espécies do gênero *Bifidobacterium* e as espécies do gênero *Lactobacillus*. Em função de seu maior envolvimento com os mecanismos metabólicos do organismo, essas bactérias têm sido chamadas de funcionais e, do ponto de vista numérico, as bifidobactérias são consideradas as mais importantes,

pois representam cerca de 25% da flora intestinal de humanos adultos e mais de 95% da flora intestinal de crianças (GIBSON et al., 1994).

As bifidobactérias e os lactobacilos apresentam um grande interesse do ponto de vista industrial, pois estão envolvidos no desenvolvimento de uma classe de produtos com um dos maiores potenciais de mercado na indústria de alimentos nacional e internacional – os probióticos, prebióticos e simbióticos. Probióticos são suplementos alimentares contendo lactobacilos e/ou bifidobactérias funcionais viáveis, administrados na dieta com o objetivo de colonizar o intestino e garantir uma população capaz de promover os efeitos desejados sobre o metabolismo do organismo. Prebióticos são suplementos alimentares contendo compostos não digeríveis pelo organismo e que, administrados na dieta, são utilizados preferencialmente pelas bifidobactérias, estimulando o seu crescimento e predomínio no intestino. Simbióticos são combinações balanceadas de pró e prebióticos, resultando em ingredientes com as características funcionais dos dois grupos (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Prebióticos. Os ingredientes alimentares considerados como prebióticos atualmente incluem uma série de oligossacarídeos de estrutura peculiar, cuja principal característica é o fato de não serem digeridos pelo organismo humano, podendo atingir o intestino, onde serão metabolizados preferencialmente pelas bifidobactérias. Dentre eles encontram-se (OKU, 1999): frutooligossacarídeos (polímeros de frutose); galactooligossacarídeos (polímeros de galactose); xilooligossacarídeos (polímeros de xilose); isomaltoligossacarídeos (polímeros de xilose); isomaltoligossacarídeos (isomaltotriose, panose, isomaltose); oligossacarídeos da soja (rafinose, estaquiose); lactosacarose; lactulose; palatinose.

Os oligossacarídeos mais conhecidos e mais facilmente encontrados no mercado atualmente são os frutooligossacarídeos (FOS), particularmente a mistura conhecida como neosugar, composta de 1-Keratose (GF₂), nystose (GF₃) e β-frutofuranosilnystose (GF₄).

Segundo Kono (1993), frutooligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos compostos de uma molécula de sacarose e uma a três moléculas de frutose, incluindo trissacarídeos ($GF_2 = 1$ molécula de glicose e duas de frutose), tetrassacarídeos ($GF_3 = 1$ molécula de glicose e três de frutose) e pentassacarídeos ($GF_4 = 1$ molécula de glicose e quatro de frutose).

Os FOS são amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados em vários alimentos vegetais, como chicória, alho, cebola, aspargos, centeio, cebolinha, alcachofra, banana, cevada, açúcar mascavo, tomate, tubérculos e trigo, por exemplo. Também podem ser produzidos a partir da sacarose, através da ação de β -frutofuranosidades fúngicas (β -F Fase), enzimas capazes de converter até 60% da sacarose em FOS (KONO, 1993). No Brasil, esse processo está sendo utilizado por mais de uma usina de açúcar e álcool, para produzir um xarope líquido com aproximadamente 50% de sacarose e 50% de FOS.

Oligossacarídeos de manose, que são carboidratos primários (MOS), derivados de células de levedura (parede celular), têm demonstrado uma melhora na saúde e desempenho de animais monogástricos. Os MOS (manooligossacarídeos) podem bloquear a fixação de certas bactérias na parede intestinal (NEWAN et al., 1993).

A aptidão de certos complexos de açúcar assim como os MOS têm demonstrado aptidão em estimular a atividade fagocítica e macrofágica em ratos (LYONS, 1994).

As dietas contendo MOS poderão remover do trato gastrointestinal bactérias patogênicas (NEWMAN et al., 1993). A inclusão de MOS na dieta de aves tem demonstrado efeito salutar na imunidade. Um aumento na quantidade de secreção (bile IgA) foi observado nas aves alimentadas com MOS. Isto representa uma vantagem porque o intestino trabalha como uma importante porta para entrada de patógenos, enquanto o IgA age no mecanismo de defesa. Esse efeito salutar dos MOS tem demonstrado uma capacidade para formar uma barreira imunológica, reduzindo inflamações (SAVAGE; ZAKRZEWSKA, 1996).

Os MOS são uma alternativa eficaz e viável para dieta de crescimento, diminuindo o uso de antibióticos para o crescimento de aves. Dietas contendo MOS podem melhorar a performance global (ganho de peso) de aves domésticas, especialmente quando são atacadas por *E. coli*, durante as primeiras semanas de vida (SIMS, 1998; SIMS et al., 1998; SIMS; SEFTON, 1999).

A manose é um manooligosacarídeo que atua como modulador do sistema imunológico, como uma capa selecionadora de microrganismos patogênicos (NEWMAN, 1995).

As glicanas são conhecidas por estimular o mecanismo de defesa em uma cadeia de inúmeros organismos. Em invertebratos, a glicana ativa a enzima *polifenoloxidase* (ENGSTAD; ROBERTSEN, 1993; RAA et al., 1993).

Em animais monogástricos, os MOS (manooligosacarídeos) apresentam um efeito interessante nas células mediadoras do sistema imunológico. Os MOS aumentaram a atividade dos macrófagos (fagocitose) e a migração de leucócitos, contribuindo desta forma para a morte de bactérias indesejáveis que poderiam provocar diversas infecções. Esses resultados foram observados também em ratos, onde se constatou um aumento das células fagocitárias (SAVAGE et al., 1996).

Os FOS podem ser ingeridos diretamente ou adicionados em diferentes tipos de alimentos, apresentando um sabor ligeiramente adocicado, com cerca de 20-40% do poder adoçante da sacarose. Além de favorecer as bifido e lactobactérias, apresentam outras propriedades fisiológicas importantes, decorrentes de sua estrutura química peculiar:

Baixo valor calórico: pelo fato de não serem digeridos pelo organismo, os FOS apresentam baixo valor calórico que, segundo Kono et al. (1993) é estimado em cerca de 1,5 Kcal/g (determinado em indivíduos humanos utilizando-se FOS marcados com ^{14}C). Toda a energia é derivada da fermentação pelas bactérias do intestino grosso, cujos principais metabólitos são ácidos graxos de cadeia curta, posteriormente utilizados como fonte de energia pelos organismos. O valor calórico desses ácidos graxos ainda não foi definitivamente confirmado, de forma que os dados disponíveis são estimativos (KONO, 1993).

Baixa cariogenicidade: os FOS não são utilizados como substrato para crescimento, formação de placas ou agregação celular da maioria das bactérias normalmente associadas com a formação de cáries, particularmente *Streptococcus mutans* (KONO, 1993).

Regularização do funcionamento do intestino: dentre as patologias relacionadas ao sistema gastrointestinal, a constipação, definida por Loening-Baucke (1993) como frequência de evacuação inferior a três vezes por semana, destaca-se como uma das mais comuns e mais diretamente relacionadas a fatores de dieta. A ingestão de fibra é considerada uma das formas de controle desse problema, uma vez que aumenta o volume fecal e o teor de água nas fezes, reduz a pressão intra-cólon, facilita a defecação, aumenta a velocidade de trânsito do conteúdo intestinal e reduz o contato com substâncias tóxicas (EHLE et al., 1982). Tomatsu (1994) e Tokunaga et al. (1986) observaram que alguns dos efeitos benéficos resultantes da ingestão de FOS se assemelham ao da fibra, incluindo o aumento do bolo fecal, a redução do tempo de trânsito do bolo intestinal, a redução na absorção de nutrientes no intestino e a redução da constipação intestinal. O mecanismo de ação dos FOS ainda não está completamente esclarecido, porém, as evidências indicam que a produção de ácidos graxos de cadeia curta pelas bifidobactérias, durante a fermentação dos FOS, resulta numa elevação da pressão osmótica, com uma conseqüente aceleração dos movimentos peristálticos do intestino. A maioria das dietas humanas e animais são deficientes em fatores bifidogênicos (MODLER, 1994), sendo importante a utilização de suplementos alimentares comerciais como os FOS. No Japão, esses componentes são considerados alimentos, e não aditivos, podendo ser encontrados em mais de 500 produtos, com um consumo diário considerável pela população. Diversos estudos "in vivo" realizados com humanos de diferentes condições e faixas etárias demonstraram que a ingestão diária de 8g de FOS pode resultar numa elevação de 10 vezes na população de bifidobactérias, com um decréscimo no pH intestinal, redução na ocorrência de diarreia e inibição de enterobactérias e clostrídios putrefativos (MITSUOKA et al., 1987; HIDAKA et al., 1986).

1.3 CONCLUSÕES

- Muitos estudos têm destacado a importância do uso de levedura na alimentação devido ao seu baixo custo e abundância, além da possibilidade de inovação nos processos de obtenção e no processamento para obtenção de seus derivados, principalmente os derivados da parede celular.
- A parede celular é uma fração carboidrática rica em mananas, beta-glicanas e glicoproteínas, com propriedades fisiológicas e funcionais de relevante interesse. Porém os principais mecanismos através dos quais essas frações exercem essas propriedades não estão inteiramente elucidadas, necessitando a realização de novas pesquisas nesta área, principalmente com humanos.
- Os derivados da parede celular apresentam alto teor de fibras, especialmente as solúveis, que aumentam o tempo do trânsito intestinal, diminuem a velocidade de esvaziamento gástrico e reduzem a elevação do colesterol sérico.
- Oligossacarídeos como os FOS e os oligossacarídeos de manana (MOS) derivados de células de levedura (parede celular), têm mostrado efeito prebiótico de relevante interesse para a saúde humana e animal.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J.; MILLÁN, N. Effect of addition of brewer's yeast to soy protein and casein on plasma cholesterol levels of rabbits. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.44, n.1, p.18-22, 1994.

ACTON, J. C.; BREYER, L.; SATTERLEE, L. D. Effect of dietary fiber constituents on the *in vitro* digestibility of casein. **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, n.2, p. 556-560, 1982.

AL-BASSAM, R; AL-JUMAILY, RAWI, A.A.; SUFFI, F.A. Evaluation of methods of extraction and partial characterization of cell wall carbohydrates of brewer's yeast strain, *Saccharomyces cerevisiae*. **Mircen Journal of Applied Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 2, n. 3, p.383-388, 1986.

ANDERSON, H.; ASP, N.; BRUCE, A.; ROOS, S.; WADSTROM, T.; WOLD, A.E.; Health effects of probiotics and prebiotics: a literature review on human studies. **Scandinavian Journal of Nutrition**, Stockholm, v. 45, p. 58-75, 2001.

ANDERSON, J. W.; DEAKINS, D. A.; BRIDGES, S. R. Soluble fiber: hypocholesteremic effect and proposed mechanisms. In: **Dietary Fiber: chemistry, physiology and health effects**. (KRITCHEVSKY, D.; BONFIELD, C.; ANDERSON, J.W. eds.) New York: Plenum Press, 1990, p. 339-363.

ANHEUSER-BUSCH, INC.; ST. LOUIS, MO; E. A. ROBBINS; R. D. SEELEY. **Process for the manufacture of yeast glycan**. Int. Cl²A23j1/18. US, New York, n. 4, 122, 196. 24 Oct. 1978.

AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Fibras alimentares. **International Life Sciences - Seção Regional Brasil**, São Paulo, v. IV, n. 3, p.1-2, 1995.

ARVILL, A.; BODIN, L. Effect of short-term ingestion of Konjac glucomannan on serum cholesterol in healthy men. **American Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 61, n. 3, p. 585-589, 1995.

ASPINAL, G. O. **Carbohydrates**. London, Butterworths, vol. 7, 1973, 283 p.

AYOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; TSUDA, T.; OHMURA, E.; YOSHIDA, A. Effect on liver and serum lipids in rats of dietary addition of fibres and choletyramine to a cystine - excess diet. **Agriculture Biological Chemistry**, Tokyo, v. 52, n. 11, p. 2811-2816, 1988.

BABAYAN, T. L.; BEZRUIJOU, M. G.; LATOU, U. K., BELIKOU, V. M.; BELAUTSEVA, E. M.; TITOVA, E. Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: morphological effects, rheological, effects, and dynamics of accumulation of extracellular hidrolisis products. **Current Microbiology**. New York, v.5, n.3, p.163-168, 1991.

BALLOU, C. E. Some aspects of the stucture immunochemistry, and genetic control of yeast mannans. **Advances in Enzymology**, New York, v. 40, p. 239-270, 1974.

BALLOU, C. E. Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope. **Advances in Microbiology and Physiology**, London, v. 14, p. 93-158, 1976.

BARTNICKI-GARCIA, S. Cell Wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 22, p. 87-108, 1968.

BEHALOVÁ, B.; BLAHOVÁ, M.; SILLIINGER, V.; MACHEK, F. Comparison of various ways of extraction of nucleic acids and of preparation of yeast extract from *Sacchoromyces cerevisiae* of *candida utilis*. **Journal of Biotechnology in Industry, Agriculture, Halalth Care and Enviromental Protection**, Berlim, v.11, n.6, p.547-552, 1991.

BELL, D. J.; NORTHCOTE, D. H. The structures of cell-wall polysaccharide of baker's yeast. Part II. **Journal of the Chemical Society**, Cambridge, v. 12, p. 1944-1954, 1950.

BERGMAN, E. N. Energy contribution of volatile fatty acids in the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, n. 2, p.567-590, 1990.

BORDERÍAS, A. J.; MONTERO, P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. **Revista de Agroquímica y Tecnologia de Alimentos**, Madrid, v. 28, n. 2, p. 159-169, Jun. 1988.

CABIB, E. Molecular aspects of yeast morphogenesis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 29, p. 191-214, 1975.

CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 6, p. 1420-1425, 1988.

CAVALCANTI, M. L. F. Fibras Alimentares. **Revista de Nutrição PUCCAMP**, Campinas, v.2, n.1, p.88-97, 1989.

DAMODARAN, S. Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. In: KINSELLA, J. E.; SOVICE, W. G. **Food proteins**. Champaign: The American Oil Chemists' Society, 1989. p. 21-51.

DELPECH, I.; BIZEAU, C.; BONLAY, R.; GALZY, R. Étude de l'action des gènes de la série pli sur la structure de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*, Hansen. **Annals of Microbiology** (Inst. Pasteur), Paris, v. 128, p. 439-450, 1977.

DZIEZAK, J. D. (Ed.). Yeasts and yeast derivatives: Definitions, characteristics, and processing. **Food Technology**, Chicago, v. 41, n. 2, p. 104-121 e 122-125, 1987.

EASTWOOD, A. M.; MORRIS, R. E. Physical properties of dietary fiber that influence physiological function: a model for polymers along the gastrointestinal tract. **American Society for Clinical Nutrition**, Edinburgh, v. 55, n. 7, p. 436-442, 1992.

EHLE, F. R.; ROBERTSON, B.; VAN SOEST, P. J. Influence of dietary fibers on fermentation in the human large intestine. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.112, n. 1, p.158-166, 1982.

ENGLER, C. R. New method of measuring cell-wall rupture. **Biotechnology and Bioengineering**. New York, v. 21, n. 10, p.1861-1869, 1979.

ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 319-330, 1993.

FELDMAN, E. B. Fruits and vegetables and the risk of stroke. **Nutrition Reviews**, New York, v.59, n.1, p.24-27, 2001.

FERNANDEZ, M. L.; LIN, E. C. K.; TREJO, A.; McNAMARA, D. J. Prickly pear (*Opuntia sp*) pectin reserves low-density lipoprotein receptor suppression induced by a hypercholesterolemic diet in guinea pigs. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.122, n. 12, p.2330-2340, 1992.

FLEET, G. H.; MANNERS, D. J. The enzymic degradation of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 98, p. 315-327, 1977.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9ª ed. São Paulo, Atheneu, 1992, p.177-183.

FRIAS, A. C. D. **Efeito da goma guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) sobre a ingestão de alimentos, lipidemia e glicemia em ratos normais e diabéticos**. Campinas, 1996. 117 p. (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

FRIAS, A. C. D.; SGARBIERI, V. C. Guar gum effect on blood serum lipids and glucose concentrations of wistar diabetic rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.2, p.241-245, 1998a.

FRIAS, A. C. D.; SGARBIERI, V. C. Guar gum effect on food intake, blood serum lipids and glucose levels of wistar rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.48, n.2, p.1-14, 1998b.

FROLICH, W.; ASP, N. G. Minerals and phytate in the analysis of dietary fiber from cereals. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 62, n. 4, p. 238-242, 1985.

GANDER, J. E. Fungal cell wall glycoproteins and peptidio-polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 28, p. 103-119, 1974.

GAVER, D. V.; HUYGHEBAERT, A. Optimization of yeast cell disruption with a newly designed bread mill. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 13, n. 8, p. 665-671, 1990.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota. **American Institute of Nutrition**, Chicago, p.1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R.; WILLIS, C. L.; LOO, J. V. Non-digestible oligosaccharide and bifidobacteria - implication for health. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 96, n. 1150, p. 381-387, 1994.

GORDON, H. A.; PESTI, L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host-microbial relationships. **Bacteriological Review**, Washington, v. 35, n. 4, p.390-429, 1971.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Budapest, Hungary: CRC press, Boca Raton, 1991, 312 p.

HASENCLEVER, H. F.; MITCHELL, W. O. Immunochemical studies on polysaccharides of yeast. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 93, n. 5, p. 763-771, 1964.

HENDENSKOG, G.; MOGREN, H. Some methods for processing of single-cell protein. **Biotechnology and Bioengineering**. New York, v. 15, n. 1, p. 129-142, 1973.

HEXEBER, S.; WILLUMSEN, N.; ROTEVATN, S.; HEXEBERG, E.; BERGE, R. K. Cholesterol induced lipid accumulation in myocardial cells of rats. **Cardiovascular Research**, London, v.27, n.3, p.442-446, 1993.

HEYDE, R. V. D. **Relação entre fibras alimentares, lipídios sangüíneos e excreção fecal de ácidos biliares.** Um estudo experimental em ratos. Londrina, 1991. 70 p. Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Londrina.

HIDAKA, H.; EIDA, T.; TAKIZAWA, T. et al. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria Microflora**, Tokyo, v.5, p.37-50, 1986.

HILLMAN, R. J.; TOPPING, D. L.; McINTOSH, G. M.; TRIMBLE, R. P.; STORER, G. B.; TAYLOR, M. N.; CHENG, B. Q. Hypocholesterolaemic effects of dietary propionate: studies in whole animals and in perfused rat liver. **Annals of Nutrition & Metabolism**, Basel, v.32, n. 2, p.97-107, 1988.

HOUGH, J. S. **Biología de la Cerveza y de la Malta.** Zaragoza, Acrubia, 1990, 194 p.

HUGHES, J. S. Potential contribution of dry bean dietary fiber to health. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 9, p. 122-126, 1991.

HUNNINGHAKE, B. D.; MILLER, T. V.; LAROSA, C. J.; KINOSIAN, B.; BROWN, V.; HOWARD, J. W.; DISERIO, J. F.; O'CONNOR, R. R. Hypocholesterolemic effects of a dietary fiber supplement¹⁻³. **American Society for Clinical Nutrition**, Minneapolis, v. 59, n. 5, p.1050-1054, 1994.

HYUN, I. O.; SUN, Y. L. A study on nutrition characteristics of common Korean dietary fiber rich foods. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, Pusan, v.27, n.2, p.296-304, 1998.

JENKINS, D. J. A.; KENDALL, C. W. C.; RANSOM, T. P. P. Dietary fiber, the evolution of the human diet and coronary heart disease. **Nutrition Research**, Tarrytown, v.18, n.4, p.633-652, 1998.

JENKINS, D. J. A.; WOLEVER, T. M. S.; VIDGEN, E.; KENDALL, C. W. C.; RANSOM, T. P. P.; MEHLING, C. C.; MUELLER, S.; CUNNANE, S. C.; CONNELL, N. C. O.; SETCHELL, K. D. R.; LAU, H.; TEITEL, J. M.; GARVEY, M. B.; FULGONI III, V.; CONNELLY, P. W.; PATTEN, R.; COREY, P. N. Effect of psyllium in hypercholesterolemia at two monounsaturated fatty acid intakes. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.65, n.5, p.1524-1533, 1997.

JONES, J.M. Cholesterol, cancer, and fiber. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v. 39, n. 4, p. 247-248, 1994.

KANAUCHI, O.; AGATA, K. Protein and dietary fiber-rich newfoodstuff from brewer's spent grain increased excretion of feces and jejunum mucosal protein content in rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Gunma, v.61, n.1, p.29-33, 1997.

KINSELLA, J. E. Functional properties in foods; a survey. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 7, n. 3, p. 219-280, 1976.

KINSELLA, J. E. Functional proteins from yeast nucleoprotein for uses. Methods of isolation. In: **Food Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1987, p. 363-391.

KNORR, D.; SHETTY, K. J.; HOOD, L. F.; KINSELLA, J. E. Na enzymatic method for yeast autolysis. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.5, p.1362-1365, 1979.

KOLLAR, R.; STURKIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v. 6, n. 3, p. 225-237, 1992.

KONO, T. Fructooligosaccharides. In: NAKAKUKI, T. (ed.) **Oligosaccharides, Production, Properties and Applications**. Switzerland: Japanese Technology Reviews, Section E: Biotechnology, v. 3, n. 2, Gordon and Breach Science Publishers, 1993, p. 50-78.

KRITCHEVSKY, D. Cereal fiber and lipidemia. **Cereal Foods World**, Philadelphia, v. 42, n. 2, p. 81-85, 1997.

KRITCHEVSKY, D.; STORY, J. A. Influence of dietary fiber on cholesterol metabolism in experimental animal. In: **CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition**, Geneva, CRC Press: SPILLER, G. A. (ed.), 1986, p.129-142.

LABELL, F. Oat fiber has high beta-glucan level. **Food Processing**, Chicago, v.53, n.7, p.86, USA, 1992.

LLOYD, K. O. Isolation, characterization, and partial structure of *peptidogalactomannans* from yeasts form of *cladosporium Worneckii*. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 9, n. 17, p. 3446-3453, 1970.

LOENING-BAUCKE, V. Chronic constipation in children. **Gastroenterology**. Philadelphia, v. 105, n. 2, p. 1557-1564, 1993.

LUCKEY, T. D. **Germfree Life and Gnotobiology**. New York: Academic Press, 1963.

LYONS, T. P. Biotechnology in the feed industry: 1994 and beyond. In: **Proc. Alltech's 10th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry**. (LYONS, T.P.; JACQUES, K. A., eds.). Nottingham University Press, Loughborough, Leics., UK, 1994, p.1-48.

MACWILLIAM, I. C. The structure, synthesis and functions of the yeast cell wall - A review. **Journal of Institute of Brewing**, London, v. 76, n. 6, p. 524-535, 1970.

MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 89-94, 1994.

MANNERS, D. J.; MASSON, A. J.; STURGEON, R. J. An enzymic method for the determination of the degree of polymerisation of glucans. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 17, n.1, p. 109-114, 1971.

MANNERS, D. J.; MASSON, A. J.; PATTERSON, J. C. The heterogeneity of glucan preparation from the walls of various yeasts. **Journal of General Microbiology**, London, v. 80, p. 411-417, 1974.

MANNERS, D. J.; MASSON, A. J.; PATTERSON, J. C. The structure of β -(1→6)-D-glucan from yeast cell walls. **Biochemistry Journal**, London, v. 135, n. 1, p. 19-30, 1973.

MATHESON, H. B.; COLÓN, I. S.; STORY, J. A. Cholesterol 7 α -hydroxylase activity is increased by dietary modification with psyllium hydrocolloid, pectin, cholesterol and cholestyramine in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 3, p. 454-458, 1995.

MITSUOKA, T.; HIDAKA, H.; EIDA, T. Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora. **Die Nahrung**, Deerfield Beach, v. 31, n. 5-6, p.427-436, 1987.

MODLER, H. W. Bifidogenic factors - sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**, Ontario, v. 4, n. 5, p. 383-407, 1994.

MOUNDRAS, C.; BEHR, S.R.; DEMIGNÉ, C.; MAZUR, A.; RÉMÉSY, C. Fermentable polysaccharides that enhance fecal bile acid excretion lower plasma cholesterol and apolipoprotein E-rich HDL in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 11, p.2179-2188, 1994.

MONGEAU, R.; SIDDIQUI, R. I.; EMERY, J.; BRASSARD, R. Effect of dietary fiber concentrated from celery, parsnip, and rutabaga on intestinal function, serum cholesterol, and blood glucose response in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Ontario, v. 38, n. 1, p. 195-200, 1990.

NEWMAN, K. E.; JACQUES, K.; BUEDE, R. Effect of mannanoligosaccharide on performance of calves fed acidified and non-acidified milk replacer. **Journal Animal Science**, Chicago, v.71, p.271, 1993.

NEWMAN, K. E. Mannan oligosaccharides and animal nutrition. In: **Proc. Alltech's 1st Annual Asia-Pacific Lecture Tour**, New York, v.9, p.55-60, 1995.

NICKERSON, W. J. Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi IV molecular bases of form in yeast. **Bacteriology Review**, Washington, v. 27, n. 3, p. 305-324, 1963.

NICKERSON, W. J. Chemical composition of cell walls and membranes of yeast. **Annals of the New York City Academy of Science**, New York, v. 235, p. 105-108, 1974.

NYMAN, M.; ASP, N-G.; CUMMINGS, J. H.; WIGGINS, H. Fermentation of dietary fibre in the intestinal tract: comparison between man and rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 55, n. 3, p. 487-496, 1986.

NYMAN, M.; ASP, N-G.; PEDERSEN, B.; EGGUM, B. O. Fermentation of dietary fibre in the intestinal tract of rats - a comparison of flours with different extraction rates from six cereals. **Journal of Cereal Science**, London, v. 3, n. 2, p. 207-219, 1985.

NYMAN, M.; SCHWEIZER, T. F.; TYRÉN, S.; REIMANN, S.; ASP, N-G. Fermentation of vegetable fibre in the intestinal tract of rats and effects on fecal bulking and bile acid extraction. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 120, n. 5, p. 459-466, 1990.

OKU, T. Special physiological functions of newly developed mono and oligosaccharides. In: GOLDBERG, I. (ed.), **Functional Foods**. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc., 1999.

OTERO, M. A.; VASALLO, M. C.; VERDIEIA, O.; FERNANDEZ, V.; BETANCOURT, D. A process for the complete fractionation of baker's yeast. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, London, v. 67, n. 1, p. 67-71, 1996.

PACHECO, M. T. B.; CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrates. **Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology**, Tokyo, v.43, n.6, p.601-612, 1997.

PAK, N.; ARAYA, H. Macroalgas marinas comestibles de Chile como fuente de fibra dietética. Efecto en la digestibilidad aparente de proteínas, fibra y energía y peso de deposiciones en ratas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Santiago de Chile, v.46, n.1, p.42-46, 1996.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science and Technology**. Cambridge, v.7, n.4, p.120-125, 1996.

PAT. 4, 122, 196. H. R. ROBBINS; R. D. SEELEY. **Process for the manufacture of yeast glycan**. New York, 24 Oct. 24, 1978.

PEAT, S.; TURVEY, J. R.; EVAN, J. M. Polysaccharides of baker's yeast. Part III. The presence of 1:6-linkages in yeast glucan. **Journal of the Chemical Society**, Cambridge v. 38, p. 3868-3870, 1958b.

PEAT, S.; WHELAN, W. J.; EDWARDS, T. E. Polysaccharides of baker's yeast. Part II. Yeast glucan. **Journal of the Chemical Society**, Cambridge, v. 38, p. 3862-3868, 1958a.

PERIAGO, M. J.; ROS, G.; LÓPEZ, G.; MARTINEZ, M. C.; RINCÓN, F. Componentes de la fibra dietética y sus efectos fisiológicos. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de alimentos**, Valência, v.33, n.3, p.229-247, 1993.

PHAFF, H. J. Enzymatic yeast cell wall degradation. **Advances Chemical Serology**, New York, v. 160, p. 244-286, 1977.

PHAFF, H. J. Structure and biosynthesis of yeast cell envelope. In: ROSE, A. H.; HARRINSON, J. S. **The yeast**. New York, Academic Press v. 2, p. 135-210, 1971.

POWER, D. M.; CHALLINOR, S. W. Effects of inositol-deficiency on the chemical composition of the yeast cell wall. **Journal of General Microbiology**, London, v. 55, p. 169-176, 1969.

RAA, R.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, T.; ROBERTSEN, B. Glucan (Macro-Gard) from the yeast increases the resistance of salmon to microbial infection. **Diseases in Asian Aquaculture**, New York, v.1, p.39, 1993.

REISS, E.; HEARN, V. M.; POULAIN, D.; SHEPHERD, M. G. Structure and function of the fungal cell wall. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, London, Supplement 1, v. 30, p. 143-156, 1992.

RÉMÉSY, C.; LEVRAT, M. A.; GAMET, L.; DEMIGNÉ, C. Fecal fermentation in rats fed oligosaccharides (insulin) are modulated by dietary calcium levels. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v.264, p.855-862, 1993.

RIMM, E. B.; ASCHERIO, A.; GIOVANNUCCI, E.; SPIEGELMAN, D.; STAMPFER, M. J.; WILLET, W. C. Vegetable, fruit and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. **Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 275, n. 6, p. 447-451, 1996.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, insulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.33, n.2, p.103-148, 1993.

ROBBINS, E. A.; SEELEY, R. D. Cholesterol lowering effect of dietary yeast and yeast fractions. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, n.3, p.694-698, 1977.

ROSE, A. H. Composition of the envelope layer of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. **Journal of Applied Bacteriology**. Symposium Supplement, Oxford, v. 74, suppl. 22, p. 1105-1185, 1993.

SAVAGE, T. F.; COTTER, P. F.; ZAKARZEWSKA, E. I. The effect of feeding a mannan oligosaccharide on immunoglobulins, plasma Ig G and bile IgA of Wrolstad MW male turkeys. **Poultry Science**, Champaign v.75, p.43-145, 1996.

SAVAGE, T. F.; ZAKRZEWSKA, E. I. The performance of male turkeys fed a starter diet containing a mannanoligosaccharide (Bio-Mos) from day old to eight weeks of age. In: **Biotechnology in the feed Industry, Proceedings of Altech's 12th Annual Symposium**. (LYONS, T. P.; JACQUES, K. A., EDS.). Nottingham University Press, Nottingham, UK, 1996, p.47-54.

SCHNEEMAN, B. O. Dietary fiber. A scientific status summary by the institute of food technologists expert paper on food safety & nutrition. **Food Technology**, Chicago, n. 10, v. 43, p. 133-139, 1989.

SCHOLZ-AHRENS, K.; SCHAAFSMA, G.; VAN DER HEUVEL, E.; SCHREZENMEIR, J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.73, p. 4595-4645, 2001.

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Physiologically functional foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, n.(1,2), p.7-19, 1999.

SHINNICK, F. L.; MATHEWS, R.; INK, S. Serum cholesterol reduction by oats and other fiber sources. **Cereals Food World**, Minneapolis, v. 36, n. 9, p. 815-821, 1991.

SIMS, M. D. Evaluation of Bio-Mos vs. BMD and a negative control in diets fed to commercial broiler chickens. Resume of Investigator's Final Report. **Virginia Scientific Research**, Inc. Harrisonburg, VA. 1998.

SIMS, M.; SEFTON, A. E. Comparative effects of a mannan oligosaccharide and an antibiotic growth promoter on performance of commercial tom turkeys. **Poster Presented at the 48th Western Poultry Disease Conference**, Vancouver, British Columbia, Canada, 1999.

SIMS, M. D.; SPRING, P.; SEFTON, A. E. Effect of mannanoligosaccharide on performance of commercial broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v.77, p.89, 1998.

SLAVIN, J.L. Dietary fiber: classification, chemical analyses, and food sources. **Journal of the American Dietetic Association**. Chicago, v.87, n.9, p.1164-1171, 1987.

SMITH, D. M. Meat proteins: functional properties in comminuted meat products. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 116-121, April 1988.

SPENCER, J. F. T.; GORIN, P. A. J. Biotechnology Review: Mannose-containing polysaccharides of yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 15, n. 1, p. 1-12, 1973.

STEWART, T. S.; BALLOU, C. E. A comparison of yeast mannans and phosphomannans by acetolysis. **Biochemistry**, Washington, v. 7, n. 5, p. 1855-1863, 1968.

SUCHER, R. W.; ROBBINS, E. A.; SIDOTI, D. R.; SCHULDT, E. H. J.; SEEKEY, R. D. **Yeast glycan and process of making same**. Int. C1A23j1/18. VS n.3, 867, 554. New York, 18 Feb. 1975.

TANNOCK, G. W. Studies of the international microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 8, n. 5-6, p. 527-533, 1998.

TINKER, L. F.; SCHNEEMAN, B. O.; DAVIS, P. A.; GALLAHER, D. D.; WAGGONER, C. R. Consumption of prunes as a source of dietary fiber in men with mild hypercholesterolemia¹⁻³. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.53, n.5, p.1259-1265, 1991.

TOKUNAGA, T.; OKU, T.; HOSOYA, N. Influence of chronic intake of new sweetener frutooligosaccharid (neosugar) on growth and gastrointestinal function of rats. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 32, n. 1, p. 111-121, 1986.

TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 61-65, 1994.

TRUSWELL, A. S.; BEYNEN, A. C. Dietary fibre and plasma lipids: potential for prevention and treatment of hyperlipidaemias. In: Dietary Fibre - A component of food - Nutritional Function in Health and Disease. (SCHWEIZER, T. F.; EDWARDS, C. A.). **ILSI Human Nutrition Reviews**. Birmingham (AL), Series Editor, 1992, p. 295-332.

UBEROI, S. K.; VADHERA, S.; SONI, G. L. Role of dietary fibre from pulses and cereals as hypocholesterolemic and hypolipidemic agent. **Journal of Food Science and Technology**, London, v.29, n.5, p.281-283, 1992.

VAHOUNY, G. V. Dietary fiber, lipid metabolism and atherosclerosis. **Federation Proceedings Fed of Am Societies for Experimental Biology**, New York, v.11, n.41, p.2801-2806, 1982.

VODJANI, F.; WHITAKER, J. R. Chemical and enzymatic modification of proteins for improved functionality. In: HETTIARACHCHY, N. S.; ZIEGLER, G. R. **Protein functionality in food systems**. New York: Marcel Dekker Inc., 1994. p. 261-309.

VUKOVIC, R; HUNDINA-DOM LADO VEC, M.; MRSA, V. Molecular organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Prehrambeno-Tehnology Review**, Zagreb, v. 32, p. 99-102, 1994.

VUKOVIC, R; HUNDINA-DOM LADO VEC, M.; MRSA, V. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Croatica Chemica Acta**, Zagreb, v. 68, n. 3, p. 597-605, 1995.

WHITAKER, J. R. Protein structure-functional relationships. **Anais do Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos**. Campinas, nov. 1995.

WILLIAMS, D. L.; MCNAMEE, R. B.; JONES, E. L.; PRETUS, H. A.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, W. I.; LUZIO, N. R. D. A method for the solubilization of α (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 219, p. 203-213, 1991.

WINBALD, I.; JOENSUU, T.; KORPELA, H. Effect of oat bran supplemented diet on hypercholesterolemia. **Scandinavian Journal of Primary Health Care**, Stockholm, v.13, n.2, p.118-121, 1995.

WOLK, A.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. J.; HU, F. B.; SPEIZER, F. E.; HENNEKENS, C. H.; WILLET, W. C. Long-term intake of dietary fiber and decrease risk of coronary heart disease among women. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.281, n.21, p.1988-2004, 1999.

YOUNES, H.; DEMIGNÉ, C.; BEHR, S. R.; GARLEB, K. A.; RÉMÉSY, C. A. A blend of dietary fibers increases urea disposal in the large intestine and lower urinary nitrogen excretion in rats fed a low protein diet. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.7, n. 9, p.474-480, 1996.

**Parede celular (PC) e respectivas frações:
obtenção/fracionamento e caracterização químico-analítica**

Capítulo 2

Parede celular (PC) e respectivas frações: obtenção/fracionamento e caracterização químico-analítica

RESUMO

Este capítulo tem como objetivo descrever o processo de obtenção da parede celular desidratada (PC) e suas respectivas frações: glicoproteína, glicana + manana, glicana insolúvel, glicana solúvel e manana. O processo consistiu basicamente em: limpeza, autólise e fracionamento da parede celular de levedura proveniente do processo industrial de produção de etanol. Na fração PC, o componente quantitativamente mais importante foi a fibra (77,8%), com uma predominância muito grande (74%) de fibra solúvel. Mesmo depois de 6 lavagens, a PC permaneceu com 18-20% de proteína. A PC apresentou maior quantidade de açúcares totais (80,8 g/100g). Em relação aos ácidos graxos, constatou-se uma predominância de ácidos graxos saturados (50,70%), seguido dos monoinsaturados (40,69%) e, por último, os poliinsaturados (8,60%). Os principais elementos minerais presentes na PC, em concentração, foram: cálcio, fósforo, potássio e ferro, sendo que a PC representa uma excelente fonte de ferro e cobre. A relação cálcio/fósforo (ideal 2:1) não se apresentou adequada na PC. As frações obtidas da PC com maior rendimento corresponderam às mananas (25,13%) e às glicanas (42,92%). Em relação à composição centesimal média das frações extraídas, o componente quantitativamente mais importante foi a fibra insolúvel (75,20%) na fração glicana insolúvel e fibra solúvel (70,34%) na fração manana e (70,73%) na fração glicana solúvel. A fração manana apresentou a maior quantidade de açúcares redutores totais (70% de açúcares redutores), observou-se também nesta fração um maior percentual de manose (48,4%). A glicose foi encontrada em maior porcentagem na fração glicana insolúvel (29%) e na fração glicana solúvel (25%). A fração glicana + manana apresentou 60,23% de fibra

solúveis e os menores níveis de carboidratos totais (22,1 g/100g de amostra) e redutores totais (20,1%).

2.1 INTRODUÇÃO

A biomassa de levedura (*Saccharomyces sp*) tem sido produzida no Brasil em três setores industriais importantes: o setor sucro-alcooleiro, com uma produção de aproximadamente 240 mil ton/ano, como subproduto de produção de etanol (FURCO, 1996), o setor cervejeiro, contribuindo com cerca de 3500 ton/ano e o setor de panificação, com uma produção brasileira de 120 mil ton/ano (PEIXOTO, 1996). O Brasil é o maior produtor mundial de álcool de cana-de-açúcar, com uma produção de 12 milhões de metros cúbicos de álcool anidro e hidratado na safra de 1999/00 (IEE, 2002) e que utiliza levedura na transformação do açúcar em álcool (FURCO, 1996).

As leveduras são muito utilizadas na formulação de produtos alimentícios, sendo que o propósito de uso varia de acordo com o seu processamento. Tem-se, portanto, o uso da levedura em diferentes formas, a saber: levedura ativa, utilizada como catalisador biológico nas indústrias de cerveja, vinhos e álcool; levedura de panificação, utilizada na fermentação de pães na indústria de panificação; levedura inativa, como fonte de nutrientes em alimentos naturais ou ingredientes nutritivos na alimentação humana e animal; derivados de levedura, usados como ingredientes nutritivos e funcionais (DZIEZAK, 1987a,b; OTERO et al., 1996; LEE, 1996).

A autólise de levedura é considerada um processo irreversível, resultando na morte da célula. Durante o decorrer da autólise, a atividade das enzimas respiratórias diminui enquanto que a atividade das hidrolases aumenta. Tem-se, então, uma hidrólise gradual do material citoplasmático e os produtos decompostos são liberados para o meio extracelular (BABAYAN et al., 1991).

A autólise da levedura pode ser induzida por fatores como temperatura, adição de plasmolizantes, intervenção mecânica e outros procedimentos que facilitem o rompimento da membrana citoplasmática e ativem as enzimas

intracelulares (BABAYAN et al., 1991). A temperatura auxilia no processo de autólise, desde que se trabalhe com a faixa de melhor atividade das enzimas intracelulares que irão auxiliar o rompimento da parede celular. Esta temperatura está em torno de 40-55°C (LEE, 1996). Os agentes plasmolizantes (etanol e cloreto de sódio) auxiliam no processo de autólise desde que não alterem a atividade das enzimas intracelulares. O uso do álcool etílico como plasmolizante permite um rendimento de autólise consideravelmente alto, sendo que o maior rendimento obtido foi quando se utilizou a concentração de 5% p/p, em relação ao total de biomassa mais água e 1% de cloreto de sódio p/p (KOLLAR et al., 1992). Os autores utilizaram também como ativador de autólise uma suspensão de material pré-autolisado na concentração de 10% p/p, o qual contribuiu para o aumento do rendimento de autólise, visto que as enzimas intracelulares do pré-autolisado já estavam liberadas e auxiliaram no rompimento de novas células.

Os principais derivados de levedura são os autolisados (produzidos por autodigestão das células); o extrato de levedura que representa a parte solúvel do autolisado, obtendo-se ainda uma fração com elevado conteúdo de carboidratos derivados das paredes celulares. Esta fração carboidrática é composta por mananas, beta-glicanas e glicoproteínas com propriedades fisiológicas e funcionais bastante interessantes. As leveduras podem ainda oferecer enzimas de interesse comercial (proteínases, invertase, lactase), além de ácidos nucleicos, nucleotídeos e nucleosídeos empregados tanto em alimentos como na medicina (OTERO et al., 1996; SARWAR et al., 1985; DZIEZAK, 1987a; CARVER et al., 1990; CARVER; WALKER, 1995).

A parede celular de levedura de cerveja representa cerca de 25-30% do peso seco total da célula, onde os polissacarídeos são denominados genericamente glicana de levedura. As glicanas representam aproximadamente 50% da composição da parede celular de levedura. São polímeros álcali insolúveis constituídos de 1,3 D-glicose com ligações ramificadas β -1,6 (MANNERS et al., 1973).

As mananas representam aproximadamente 30% da composição da parede celular de levedura. São polímeros álcali solúveis de α -1,6 D-manose com

ramificações α -1,2 ou α -1,3 (DUFFUS et al., 1982, KRATOCHVILOVA, 1990). As glicoproteínas extraídas das leveduras têm sido utilizadas como suplemento protéico para ração de gado, embora apresentem propriedades interessantes como bioemulsificantes (CAMERON et al., 1988).

O objetivo das pesquisas descritas neste capítulo foi desenvolver uma metodologia para o tratamento de limpeza, autólise e fracionamento da parede celular e de suas respectivas frações: glicoproteína, glicana + manana, glicana insolúvel, glicana solúvel e manana.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material

- **Processo de lavagem da biomassa (levedura bruta)**

A biomassa de levedura (*Saccharomyces sp.*) coletada sem sofrer o processo de termólise foi recebida da usina São José Zillo Lorenzetti (Macatuba, SP), em suspensão de aproximadamente 20% (p/p) de células. Essa suspensão foi diluída (1:1) com água da rede de abastecimento municipal e separada em centrífuga contínua de pratos ALFA LAVAL, tipo BRPX 20739S60 (3500xg, fluxo de 150 Kg/h e descarga a cada 5 minutos), obtendo um sedimento de biomassa e um sobrenadante (água de saída). O sobrenadante foi recirculado na centrífuga para recuperar as células arrastadas na água de lavagem.

A biomassa foi desidratada em "spray dryer" Niro Atomizer CB3 104D com a temperatura da câmara a $180^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$ na entrada e $80^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$ na saída. A sequência completa das operações para obtenção da levedura íntegra desidratada está ilustrada na Figura 2.1.

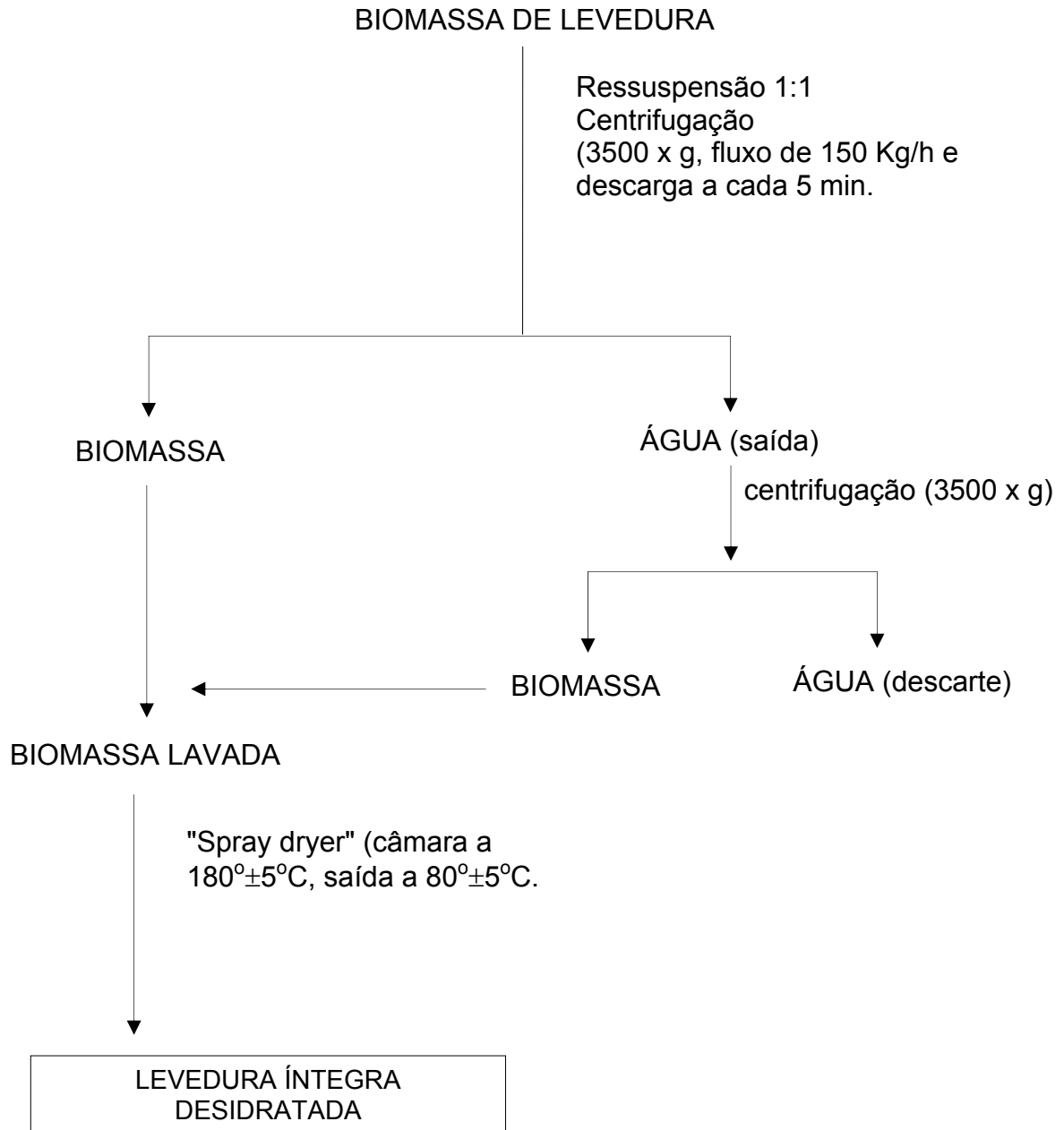


Figura 2.1.: Procedimento de lavagem e obtenção da biomassa de levedura desidratada

2.2.2 Métodos

- **Autólise da biomassa desidratada e fracionamento do autolisado para obtenção da parede celular**

A levedura íntegra desidratada foi ressuspensa em água (10% p/p) e adicionada de alguns agentes autolisantes e plasmolizantes, a saber: 15% (p/p) de um pré-autolisado, 7% (p/p) de etanol e 2% (p/p) de NaCl. A mistura ajustada ao pH 5,5 foi levada para fermentador de 250 L (New Brunswick - IF250) onde foi mantida à temperatura de 55°C por 24 horas, sob agitação mecânica. A autólise foi interrompida por aquecimento a 85°C por 15 minutos. O autolisado após secagem em "spray dryer" se transformou no autolisado desidratado (AUT). Parte do autolisado foi submetido a um fracionamento por centrifugação (centrífuga de pratos - 3500 x g, fluxo de 150 Kg/h e descarga a cada 5 minutos), para obtenção da fração insolúvel (parede celular bruta). A seqüência das várias operações está ilustrada na Figura 2.2.

A fração insolúvel (parede celular), obtida pela centrifugação do autolisado foi ressuspensa em água (10% p/p) e em seguida desidratada em "spray dryer" Niro Atomizer CB3 104D para obtenção da parede celular bruta desidratada.

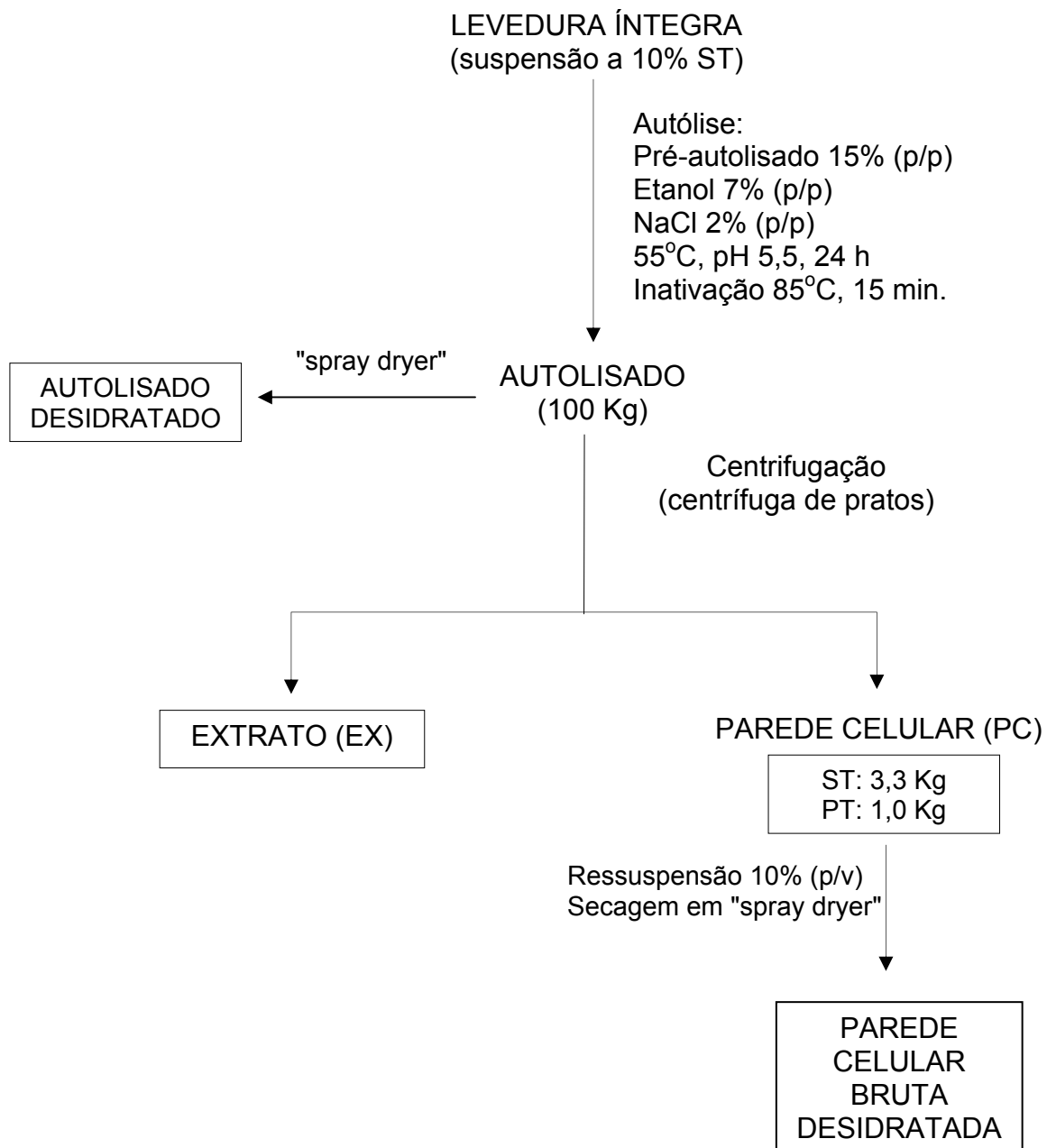


Figura 2.2.: Fluxograma do processo de autólise e obtenção da parede celular bruta

ST = sólidos totais; PT = proteínas totais

- **Extração da fração lipídica da parede celular desidratada**

A fração lipídica foi isolada da parede celular (desidratada) com etanol 95% na proporção de 1:2 (p/v) (2 extrações), n-hexano na proporção de 1:2 (p/v) (4 extrações). A combinação dos extratos obtidos com o etanol e com n-hexano foi filtrada e concentrada em rotovapor, conforme metodologia descrita por Kollar et al. (1992). Foram feitas algumas modificações, como: as extrações com etanol 95% (2 extrações), n-hexano (4 extrações) utilizando a rotação de 10.000 rpm, durante 20 min., à temperatura de 10°C.

A seqüência das operações de extração e caracterização da fração lipídica está ilustrada no Figura 2.3.

- **Extração da glicoproteína da parede celular desengordurada**

A extração da fração glicoproteína foi realizada de acordo com Otero et al. (1996). Parede celular desengordurada foi rehidratada com NaOH 1% na proporção (1:3), com homogeneização. Essa suspensão foi aquecida a 75°C durante 20 minutos, em banho com agitação. Após resfriamento, foi centrifugada a 13.200 x g por 30 minutos a 5°C. O sobrenadante foi concentrado a vácuo até 100 mL, adicionado a 300 mL de etanol 95°GL, sob agitação e deixado 12 horas a 4°C, para precipitação da glicoproteína que foi recuperada por centrifugação. A operação referente a extração da glicoproteína está mostrada na Figura 2.4.

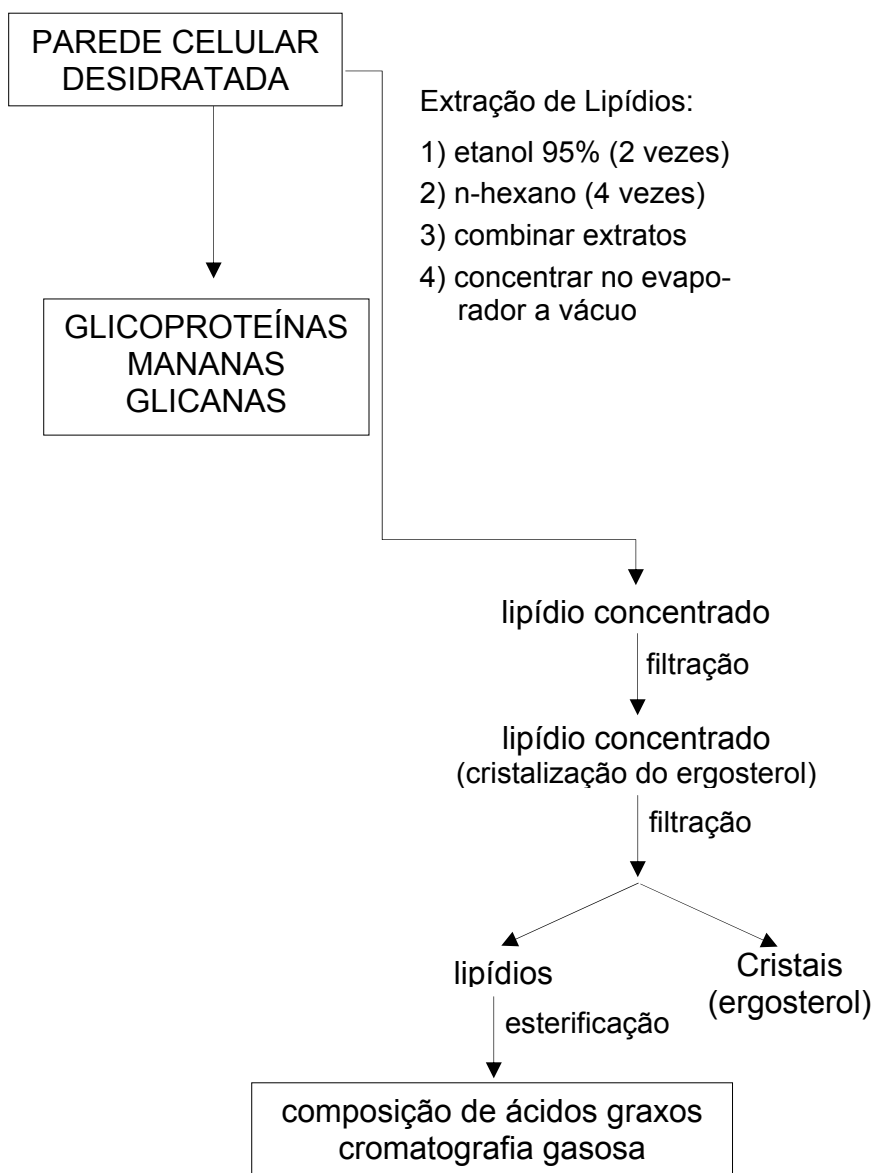


Figura 2.3.: Fluxograma de extração da fração lipídica da parede celular lavada e desidratada

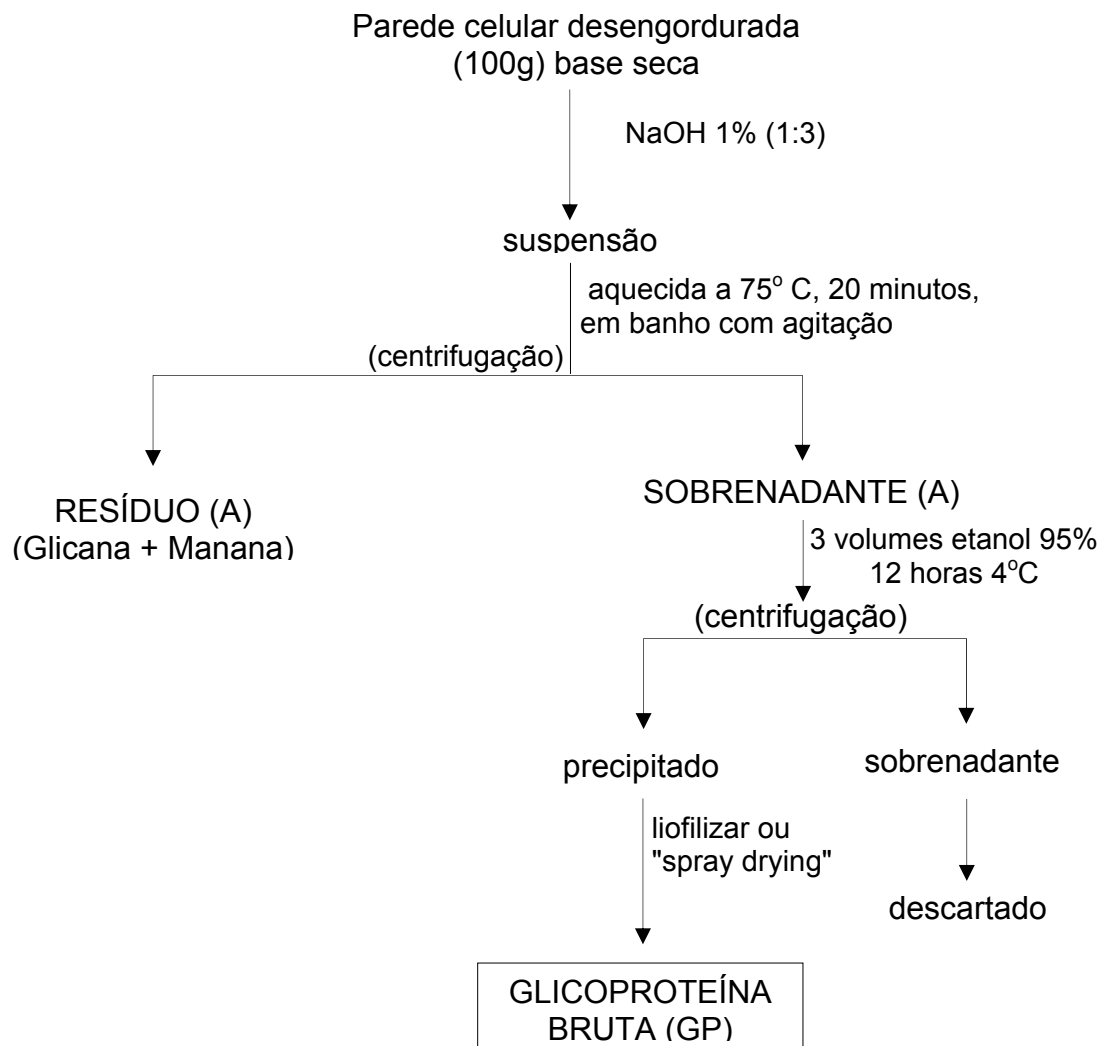


Figura 2.4.: Fluxograma de extração da fração glicoproteína

- **Extração das frações manana e glicana**

O resíduo remanescente, após a extração das glicoproteínas, foi submetido à extração com KOH 2% na proporção de 1:2 (1 extração) durante 3 horas a 93°C com agitação. Posteriormente, foi submetido à centrifugação a 14.000 g durante 30 minutos a 5°C e lavado com água destilada na proporção de 1:2 para obtenção da fração glicana. O sobrenadante da extração com KOH 2% foi tratado com 3 volumes de etanol 95% sob agitação durante 30 minutos, levado para câmara fria durante 12 horas a 4°C. Após esse tempo foi homogeneizado, centrifugado a 14.000 g durante 30 minutos a 5°C e lavado com etanol 95% na proporção de 1:3, para obtenção da fração manana. Estas frações foram extraídas conforme a metodologia de Barreto-Bergter et al. (1981).

A seqüência da extração das frações manana e glicana está ilustrada no Figura 2.5.

- **Procedimento para a solubilização da fração glicana (insolúvel)**

O maior obstáculo para utilização da β -1,3-D-glicana é a sua insolubilidade em meio aquoso. A possibilidade de se preparar uma glicana solúvel, com atividade imunológica, a partir da glicana de levedura insolúvel foi demonstrada por Williams et al. (1991). Nesta pesquisa, a glicana insolúvel foi transformada em glicana solúvel, segundo os passos descritos no fluxograma da Figura 2.6.

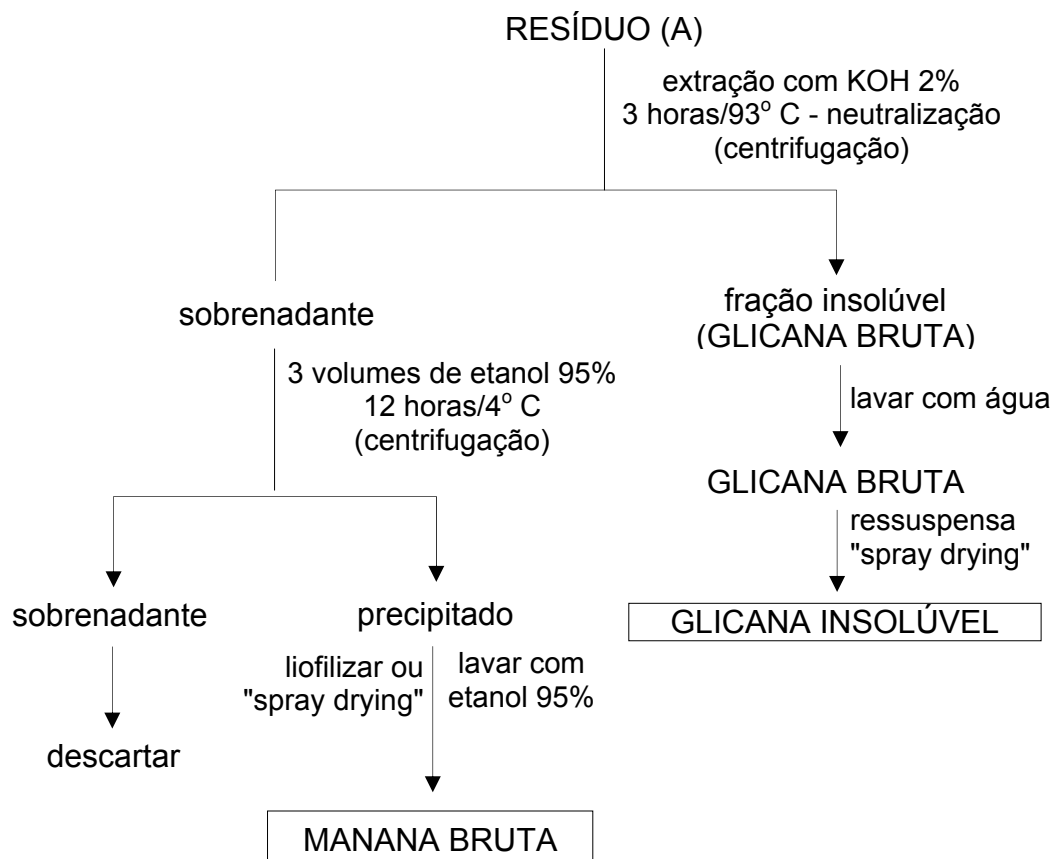


Figura 2.5.: Fluxograma de extração das frações manana e glicana bruta do resíduo da extração da glicoproteína

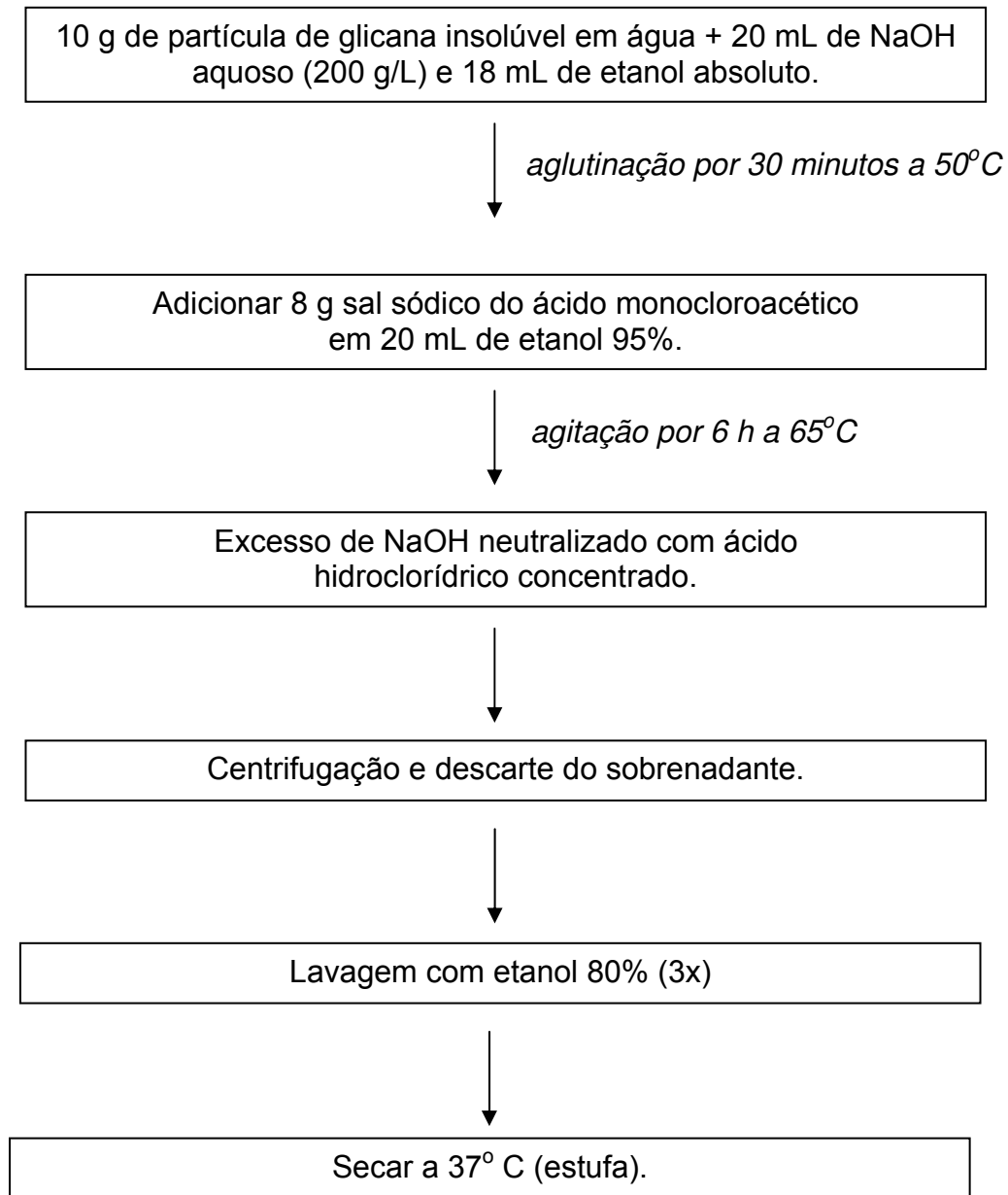


Figura 2.6.: Procedimento para solubilização da glicana bruta (DING; WANG, 1999)

- **Determinação do rendimento na obtenção das frações**

As frações obtidas em todo o processo de fracionamento, realizado em triplicata, foram dialisadas com água destilada 4°C, com agitação e troca de 3 vezes ao dia (volume 10L) durante 3 dias. O objetivo da diálise foi eliminar o NaCl e compostos de baixo peso molecular (PM<8000). Em seguida, as amostras dializadas foram liofilizadas ou desidratadas em "spray dryer" e pesadas para determinação do rendimento e armazenadas a -18° C para posterior realização dos estudos programados.

- **Caracterização química da parede celular (PC) e de suas respectivas frações**

A caracterização química foi realizada através da composição centesimal, perfil de aminoácidos totais, composição de alguns minerais, composição em ácidos graxos, extração e quantificação dos monossacarídeos e do ergosterol por cromatografia.

- **Composição centesimal**

A composição centesimal foi realizada para os seguintes materiais: parede celular (PC), glicoproteína (GP), glicana solúvel (GS), glicana insolúvel (GI) e manana (M). As determinações foram feitas a partir da média de três repetições analíticas com estimativas de desvio-padrão.

Umidade e sólidos totais. Umidade e sólidos totais foram determinados segundo "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC, 1998). Os sólidos totais foram obtidos pela diferença entre o peso total da amostra e o conteúdo em umidade, secagem em estufa a 105°C até peso constante.

Cinza. O teor de cinzas foi analisado de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (1998) que se fundamenta no resíduo que permanece após a incineração da amostra a 500 - 550°C, com destruição da matéria orgânica.

Ácido nucléico (RNA). determinado segundo método de Herbert et al., (1971). O teor de ácidos nucléicos na levedura e na parede celular bruta foi determinado pela reação do orcinol com a ribose. Após extração do RNA com ácido perclórico 0,05M, a temperatura de 37°C por 2 horas, o mesmo foi

hidrolisado a 100°C por 15 minutos, para liberação da ribose que se complexou com o reagente de orcinol, resultando uma coloração esverdeada. A intensidade da coloração foi medida por espectrofotometria (670nm), utilizando como padrão uma curva construída com RNA de levedura purificada (Sigma no. R 6625).

Determinação da fibra (solúvel e insolúvel). Os teores de fibra solúvel e insolúvel foram obtidos por método enzimático e gravimétrico (PROSKY et al., 1988), através do qual a amostra finamente moída foi resuspensa e submetida primeiramente à ação de protease (Sigma nº P-3930) e amiloglicosidase (Sigma nº A-9913). A partir deste hidrolisado, foram determinados os teores de fibra insolúvel por lavagem em um filtro com água e acetona e a fibra solúvel obtida do filtrado por precipitação com etanol a 95% e filtração seguida de lavagem no próprio filtro com etanol e acetona. A filtração foi realizada com auxílio de lã de vidro. Após secagem, o material foi pesado e corrigido pelos teores de proteína e cinza. A fibra alimentar total foi estimada pela soma dos teores de fibra insolúvel e solúvel.

Nitrogênio total (proteína bruta). Determinado pelo método de Kjeldahl semi-micro (AOAC, 1998). Fundamenta-se na digestão ácida da amostra em presença de catalisadores, formação de amônia, destilação em meio básico e titulação com solução padrão de ácido clorídrico, multiplicando-se o teor de N pelo fator 6,25 para obter o conteúdo de proteína.

Lipídios totais. Os lipídios polares e apolares foram determinados gravimetricamente após extração com uma mistura dos solventes clorofórmio: metanol: água na proporção de 10:20:0,8. Determinados de acordo com Bligh e Dyer (1959).

Carboidratos totais. As determinações foram feitas segundo procedimento de Dubois et al. (1956). Foram adicionados em tubos de ensaio 2mL de uma solução de amostra (30µg/mL), 0,05mL de fenol 80% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após agitação vigorosa e descanso de 10 minutos, essa mistura foi aquecida em banho-maria a 30°C por 20 minutos. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV-VIS (Perkin-Elmer 130) a 480nm. A manose e a glicose foram utilizadas como padrão na faixa de 10-70 µg/mL.

Açúcares redutores. A análise dos açúcares redutores foi realizada segundo “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1998). Inicialmente foi pipetada 25mL da amostra (ou pesada quantidade conveniente) e transferida para um balão volumétrico de 250mL com cerca de 100mL de água destilada aquecida a 70°C. Quando a solução estava fria, foi acrescida de 6mL de solução de ferrocianeto de potássio (105,60g em 1000mL de água) e 7mL de solução de acetato de zinco (109,75g em 600mL de água). Depois de agitada, o volume foi completado e filtrado para um Erlenmeyer de 300mL. Em um outro Erlenmeyer, foi pipetado 25mL de solução de Fehling “A” (34,64g de sulfato de cobre pentahidratado em água, transferir para um balão volumétrico de 500mL, adicionar 0,5mL de ácido sulfúrico concentrado e completar o volume), 25mL de solução de Fehling “B” (173,0g de tartarato de sódio e potássio e 50g de hidróxido de sódio em água e completar o volume) e 50mL de H₂O destilada. Esta solução (Fehling “A” + Fehling “B” + H₂O destilada) foi aquecida, de modo a entrar em ebulição dentro de 4 minutos. Foi adicionado nesta solução aquecida alíquotas convenientes de filtrado (10mL) e deixado em ebulição exatamente durante 2 minutos, filtrado a vácuo em cadinhos previamente tarados, lavando cuidadosamente o Erlenmeyer e os cadinhos com água destilada a 50°C e com 10mL de etanol. Os cadinhos foram levados para estufa a 150°C durante 1 hora, esfriados em dessecador e pesado para determinação do óxido cuproso formado.

- **Determinação da composição em aminoácidos totais**

Os aminoácidos presentes na parede celular (PC) foram determinados a partir de amostras liofilizadas, previamente hidrolisadas (HCl 6N, 110°C, 22h) em um analisador automático (Dionex Dx 300) dotado de uma coluna de troca catiônica e reação colorimétrica pós-coluna com ninidrina, conforme a metodologia clássica descrita por Spackman et al. (1958). Os teores de aminoácidos foram calculados usando-se como referência os padrões de aminoácidos Pierce (nº 20088 Amino Acid Standard H).

- **Composição Mineral**

A composição mineral (potássio, cálcio, fósforo, sódio, magnésio e cloreto) foi determinada em espectrômetro de plasma (ICP 2000 BAIRD, versão simultânea) com chama de argônio. Para tal, as amostras, depois de carbonizadas e incineradas em mufla, foram dissolvidas em solução de ácido nítrico a 5%. A quantificação foi realizada mediante comparações com padrão de pureza e contrações conhecidas. Os procedimentos para o preparo das amostras e quantificação dos minerais foram realizados segundo Angelucci e Mantovani (1986), assim como IMO Industries Inc. (1990).

- **Composição em ácidos graxos**

Foram determinados, após interesterificação ácida com metanol, separação e quantificação por cromatografia líquido-gasosa, segundo AOCS (1997).

- **Extração e quantificação dos monossacarídeos**

A extração dos monossacarídeos da parede celular (PC) e de suas respectivas frações foi realizada segundo a metodologia descrita por Prodolliet et al., 1995, com algumas modificações. Uma mistura contendo 1g de amostra (parede celular e de suas respectivas frações) e 25mL de HCl 1N foi submetida a um processo de hidrólise durante 2:30 horas à temperatura de 100°C. Em seguida, o material foi resfriado à temperatura ambiente, ajustado com KOH à pH 6 e acertado o volume para um balão volumétrico de 50mL com água deionizada. Depois foi filtrado em papel filtro e injetada no cromatógrafo HPLC (20µg de amostra).

Condições cromatográficas: a) coluna: Lichrospher 100 NH₂ (5µm 250 X 4mm) da Merck; b) fase móvel: acetonitrila + água (85:15); c) fluxo: 1,3mL por minuto; d) temperatura da coluna: ambiente; f) alça de amostragem (loop): 10µl; g) cromatógrafo: composto de uma bomba Phamarcia LKB-HPLC Pump 2248; um detector RID-10A Shimadzu; e um injetor Reodyne 7725i; h) foi usado um sistema de aquisição de dados Borwin 1,5.

- **Extração e quantificação do ergosterol da fração lipídica da parede celular**

A fração lipídica foi isolada da parede celular bruta (230g desidratada) com etanol 95% na proporção de 1:2 (2 extrações), n-hexano na proporção de 1:1 (4 extrações). Combinação dos extratos de etanol com n-hexano, que foi filtrado, concentrado no rotavapor e levado à refrigeração para obtenção do ergosterol (precipitado). O sobrenadante corresponde aos lipídios neutros e fosfolipídios (KOLLAR et al., 1992). Os lipídios foram separados do ergosterol com uma pipeta Pasteur (1,79g de ergosterol). Do peso total do ergosterol foi retirado 0,5g, que foi seco no nitrogênio, colocado 10mL de fase móvel (aceto nitrila + isopropanol) e levado para o ultra-som até dissolver. Depois foi filtrado em papel filtro e injetada no cromatógrafo HPLC (20µl de amostra). Foi utilizado padrão para identificação (padrão de ergosterol sigma, lote 116H1327), com base no tempo de retenção.

Condições cromatográficas: a) coluna: C18 merck (125 X 4mm, 5µm); b) fase móvel: acetonitrila + isopropanol (60:40); c) vazão: 1mL/min.; d) comprimento de onda: 282nm; e) temperatura da coluna: 30°C; f) alça de amostragem (loop): 20µl; g) cromatógrafo: Shimadzu, modelo MXA.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

- **Parede celular**

A fração parede celular bruta (PC) (Figura 2.2) representa 36% dos sólidos totais da biomassa e contém, em base seca, 27% de proteína. Parte dessa proteína é material contaminante do conteúdo celular, porém, a maior parte representa proteína estrutural associada às glicanas e mananas na forma de glicoproteínas. Antes de prosseguir com o subfracionamento desse material para obtenção de glicoproteínas, glicana e manana, parcialmente purificadas, a fração PC foi submetida a um processo de lavagens sucessivas, com água destilada, para eliminar completamente os sólidos solúveis, ficando apenas o material insolúvel em água.

A Tabela 2.1 e a Figura 2.7 mostram como foram eliminados os sólidos e as proteínas hidrosolúveis, no processo de lavagens sucessivas da fração parede celular bruta. Foram utilizados nesse processo 200 g de material seco e 6 litros de água destilada (1:30), o material foi homogeneizado e centrifugado a 12.000 rpm, a temperatura de 15°C, durante 15 minutos.

Tabela 2.1. Eliminação de sólidos e proteínas solúveis da parede celular bruta, através de lavagens sucessivas com água.

Lavagens com H ₂ O*	Concentração nas águas de lavagens	
	% sólidos solúveis	% proteína
1ª lavagem	1,85	1,13
2ª lavagem	0,81	0,54
3ª lavagem	0,32	0,14
4ª lavagem	0,16	0,14
5ª lavagem	0,08	0,06
6ª lavagem	0,06	0,05

*Resultados representam a média de duas determinações.

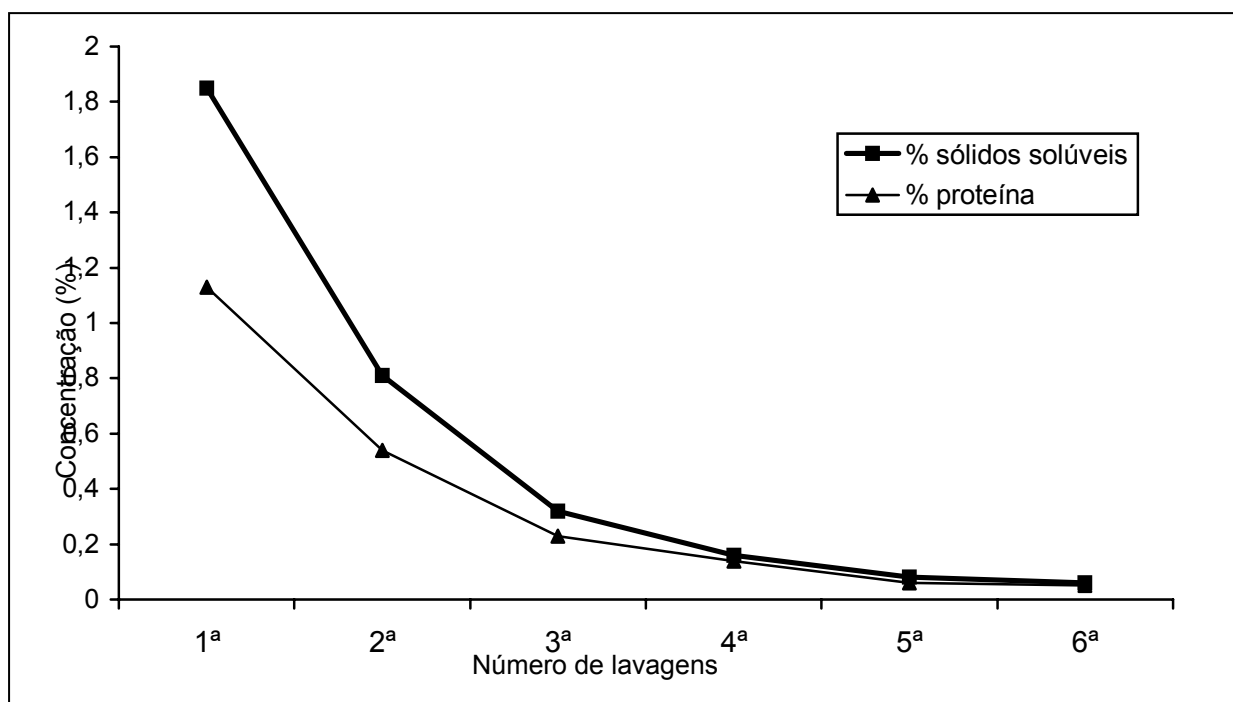


Figura 2.7. Eliminação de sólidos e proteínas solúveis da parede celular bruta (PC) por lavagens sucessivas com água.

- **Caracterização analítica da parede celular semi-purificada**

Composição centesimal. A composição centesimal da parede semi-purificada está apresentada na Tabela 2.2. A composição é bastante semelhante à relatada na literatura por vários pesquisadores, do Brasil e do exterior (KIHLEBERG, 1972; DZIEZAK, 1987a, b; PACHECO et al., 1997). Na fração parede celular (PC), o componente quantitativamente mais importante é a fibra (77,8%), com predominância (74%) de fibra solúvel. Mesmo depois de 6 lavagens com água, na parede celular permanece de 18 a 20% de proteína, que são glicoproteínas estruturais (VUKOVIC et al., 1995; FLEET; MANNERS, 1977; CAMERON et al., 1988).

A composição em aminoácidos da proteína da parede celular semi-purificada, de levedura de fermentação alcoólica, é mostrada na Tabela 2.3. Os aminoácidos mais abundantes na proteína são: ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, alanina, serina, treonina. Os aminoácidos sulfurados (metionina + cistina) e por vezes a leucina, encontram-se limitantes, quando comparados com o padrão da FAO/WHO (1989) para o estágio de vida de 2 a 5 anos de idade (Tabela 2.4).

A Tabela 2.4 apresenta o perfil de aminoácidos essenciais para a biomassa (BIO) de levedura de destilaria de álcool e para a parede celular semi-purificada. Quando comparados com o perfil teórico da FAO/WHO (1989), a biomassa praticamente não apresentou deficiência, enquanto que a parede celular semi-purificada (PC) apresentou deficiência (>50%) em aminoácidos sulfurados.

Alguns autores (MARIATH; ZUCAS, 1983; VAVANUVAT; KINSELLA, 1975; KINSELLA; SHETTY, 1978; VAVANUVAT, 1977) relataram limitação de aminoácidos sulfurados em proteína de levedura, mesmo as derivadas de cervejaria. Dentre os aminoácidos essenciais, a proteína da parede celular é particularmente rica em lisina e treonina, enquanto que a proteína da levedura é rica em lisina, treonina e histidina e, por esse motivo, tanto a proteína da parede celular quanto a proteína da levedura integral podem complementar muito bem o perfil de aminoácidos dos cereais, por serem estes normalmente limitantes em lisina e/ou treonina.

Os teores de triptofano não constam na Tabela 2.3 e 2.4, pelo fato de o aminoácido ser totalmente destruído na hidrólise ácida. Contudo, segundo a literatura (MARIATH; ZUCAS, 1983; VAVANUVAT; KINSELLA, 1975; VAVANUVAT, 1977; RAJCHEVA-ROSHOVA et al., 1989), o triptofano não se apresenta como aminoácido limitante em levedura.

Tabela 2.2. Composição centesimal da parede celular (PC) semi-purificada, de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial.

Componente (%b.s.)*	PC	BIO
Proteína (Nx6,25)	18,80 ± 0,61	39,60 ± 0,55
Fibra alimentar:		
Total	77,80 ± 0,80	31,40 ± 0,90
Insolúvel	3,80 ± 0,72	1,09 ± 0,70
Solúvel	74,00 ± 1,08	30,30 ± 0,78
Cinza	1,40 ± 0,16	7,30 ± 0,60
Lipídios totais	2,00 ± 0,50	0,50 ± 0,56
Ácido ribonucléico	3,40 ± 0,70	9,00 ± 0,77
Açúcares totais (diferença)	n.d.	11,5 ± 0,12

* Média de três determinações ± desvio padrão
n.d. = não determinados; BIO = biomassa de levedura

Tabela 2.3. Composição de aminoácidos da parede celular (PC) semi-purificada, de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial.

Aminoácido (g/100g P)*	PC	BIO
Ácido aspártico	9,8	9,12
Treonina	8,19	4,7
Serina	8,77	5,07
Ácido glutâmico	11,29	12,35
Prolina	3,95	3,02
Glicina	3,9	3,87
Alanina	6,88	6,55
Cisteína	0,46	0,97
Valina	5,33	4,78
Metionina	0,74	1,45
Isoleucina	4,13	4,21
Leucina	6,02	6,05
Tirosina	3,04	2,94
Fenilalanina	3,84	3,56
Lisina	8,19	7,77
Histidina	2,46	4,21
Arginina	2,18	2,52

*Resultados representam a média de duas determinações; BIO = Biomassa de levedura

Tabela 2.4. Adequação de aminoácidos essenciais da parede celular (PC) semi-purificada, de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial, com base no perfil recomendado pela FAO/WHO.

Aminoácido*	PC	BIO	FAO/WHO¹
Thr	8,19	4,70	3,4
Cys + Met	1,20	2,42	2,5
Val	5,33	4,78	3,5
Ile	4,13	4,21	2,8
Leu	6,02	6,05	6,6
Tyr + Phe	6,88	6,50	6,3
Lys	8,19	7,77	5,8
His	2,46	4,21	1,9
Trp			1,1
EAE	48,0% (Cys + Met)	91,2 (LEU)	

* Média de duas determinações.

BIO=biomassa de levedura; EAE=escore de aminoácidos essenciais; Trp, destruído na hidrólise ácida; FAO/WHO (1989), adequação para crianças na faixa etária de 2 a 5 anos.

Na Tabela 2.5 são mostrados os perfis de ácidos graxos para a biomassa de levedura (BIO) e para a fração parede celular semi-purificada (PC).

Embora, quantitativamente, os lipídios não sejam componentes importantes da levedura (Tabela 2.2), eles poderão tornar-se importantes na definição das características organolépticas, pela transformação em componentes voláteis que poderão contribuir para a melhoria ou deterioração do sabor e do aroma.

A composição em ácidos graxos das células de levedura pode variar em função do estado fisiológico e de exaustão das células (HALÁSZ; LÁSZTITY, 1991). Em células jovens, metabolicamente ativas, predominam fosfolipídios e ácidos graxos poliinsaturados; em células adultas e exauridas, como é o material deste estudo, os ácidos graxos poliinsaturados dão lugar aos monoinsaturados e saturados.

Os dados da Tabela 2.5 mostram para os dois materiais estudados, uma predominância de ácidos graxos saturados, seguido dos monoinsaturados e, por último, dos poliinsaturados. Dentre os saturados, predominam os ácidos palmítico e esteárico; dentre os monoinsaturados, o palmitoléico e o oléico e dentre os poliinsaturados, os ácidos linoléico e α -linolênico.

Ao comparar-se o perfil de ácidos graxos da parede celular (PC) com a biomassa de levedura (BIO), as diferenças mais marcantes são: teores mais elevados dos ácidos palmítico e esteárico e teores mais baixos dos ácidos oléico e linoléico, particularmente do linoléico na parede celular. Por esse motivo a PC, quando comparada com a biomassa apresenta predominância dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados, em detrimento dos poliinsaturados.

Um fato que pode despertar interesse é a presença na fração lipídica de elevada concentração de ergosterol (KOLLAR et al., 1992), que poderá ser usado como precursor na produção de vitamina D₂.

Tabela 2.5. Composição de ácidos graxos da parede celular (PC) semi-purificada, de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial.

Ácidos graxos (% do total)*	PC	BIO
Caprílico (C8:0)	n.d.	2,01
Cáprico (C10:0)	0,70	0,73
Hundecanóico (C11:0)	0,21	0,33
Láurico (C12:0)	2,69	2,03
Tridecanóico (C13:0)	0,10	n.d.
Mirístico (C14:0)	0,91	0,97
Pentadecanóico (C15:0)	0,30	0,33
Palmítico (C16:0)	27,90	24,60
Palmitoléico (C16:1 ω 7)	22,51	5,77
Esteárico (C18:0)	17,59	9,03
Eláidico (C18:1 ω 9T)	n.d.	1,57
Oléico (C18:1 ω 9)	18,20	22,47
Linoléico (C18:2 ω 6)	6,92	29,90
α -Linolênico (C18:3 ω 3 α)	n.d.	0,53
Araquídico (C20:0)	1,70	5,03
Saturados	50,70	40,56
Monoinsaturados	40,69	29,80
Poliinsaturados	8,60	29,93

* Média de duas determinações.

n.d. = não detectado; T = trans; ω = ômega; α = alfa; BIO = biomassa de levedura

Na Tabela 2.6 são apresentadas as concentrações dos principais elementos minerais na biomassa (BIO) e na parede celular semi-purificada (PC) da levedura proveniente de destilarias de álcool.

Os elementos presentes em maior concentração na parede celular são: cálcio, fósforo, potássio e ferro. É excelente fonte de cobre, zinco e manganês. Enquanto que na biomassa (BIO) os elementos que se apresentam em maior concentração são: cálcio, magnésio, fósforo e potássio.

A relação cálcio/fósforo (ideal 2:1) não se apresenta adequada na biomassa (BIO), nem na parede celular (PC) quando comparados com a ingestão diária (em miligramas) para os vários elementos NAS (National Academy of Science, 1989). A biomassa e a parede celular são excelentes fontes de ferro e cobre. Será importante, no futuro, determinar a biodisponibilidade do ferro destes produtos. Potássio e fósforo se apresentam relativamente baixos na parede celular (PC), comparados com os teores encontrados na biomassa (BIO) e com os valores de ingestão diária (em miligramas) para os vários elementos NAS (National Academy of Science, 1989).

Outro elemento relativamente abundante e nutricionalmente importante na levedura é o selênio (Se), que infelizmente não tivemos condições de dosá-lo.

Comparando os níveis de magnésio e manganês na parede celular (PC) e na biomassa, pode-se observar que houve uma diminuição desses minerais na parede celular (PC). Isso se deve ao fato de a parede celular (PC) ter sofrido autólise. SARWAR et al. (1985), ao produzirem autolisado da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de cana de açúcar, observaram que ocorreu uma redução considerável nos níveis de magnésio e manganês, o que consideraram ser decorrência do processo de autólise.

Tabela 2.6. Composição mineral da parede celular (PC) semi-purificada, de levedura da fermentação alcoólica, obtida pelo processo de autólise industrial.

Elemento (mg/100g)*	PC	BIO	Recomendação diária (humanos)***
Cálcio	140,20 (1,1)**	147,70 (1,4)**	1200
Magnésio	19,10 (0,2)	143,50 (0,3)	350
Fósforo	263,70 (6,7)	1516,00 (20,0)	1200
Cobre	5,00 (0,2)	4,94 (0,03)	2-3
Zinco	7,10 (0,2)	12,70 (0,1)	10-15
Sódio	26,80 (2,6)	6,30 (0,3)	2000
Potássio	40,30 (1,4)	2035,00 (5,0)	2500
Manganês	0,53 (0,01)	1,35 (0,01)	2-5
Ferro	47,20 (2,0)	38,00 (0,7)	10-15

BIO = biomassa de levedura; *Média de 3 determinações analíticas; **Valores entre parênteses são estimativas do desvio-padrão. *** Requerimento diário, conforme NAS (1989), para adultos jovens.

- **Rendimento e composição centesimal das frações da parede celular (PC) semi-purificada de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial**

As frações obtidas a partir do processo de fracionamento (Figuras 2.3, 2.4, 2.5) foram analisadas segundo seu rendimento em peso (Tabela 2.7) e composição centesimal (Tabelas 2.8, 2.9). A Figura 2.8 mostra a parede celular (PC) e suas respectivas frações: glicoproteína, glicana + manana, manana, glicana insolúvel e glicana solúvel.

Tabela 2.7. Fracionamento dos componentes da parede celular (PC) semi-purificada de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial.

Componentes	Quantidade (g)	Rendimento (%)
Parede celular (PC)	194,00	100,00
Fração lipídica	12,00	6,19
Glicoproteína	18,41	9,49
Mananas	48,76	25,13
Glicanas	83,26	42,92
Recuperação	162,43	83,73

Como se observa na Tabela 2.7, as frações com maior rendimento corresponderam as mananas 48,76 g (25,13%) e as glicanas 83,26 g (42,92%).

A literatura traz poucas referências à quantidade e proporção de frações de polissacarídeos na parede celular de *S. cerevisiae*. Além disso, três aspectos se destacam: a) são referências da década de 50 e 60; b) são analisadas células cultivadas em meio sintético de laboratório, em condições de crescimento ideais; c) os dados referem-se exclusivamente a duas frações com denominação de glicana e manana.

Macwilliam (1970) relata que glicanas representam 30 a 45% do peso seco da parede celular de levedura de cervejaria; e as mananas representam também 30 a 45%. Cita ainda que o valor médio para cada uma dessas frações é de 40%. Rose (1993) também cita que 60 a 90% da parede celular é composta por polissacarídeos.

Assim, a literatura aponta para a existência de glicanas e mananas em proporção praticamente igual na parede celular de *S. cerevisiae* e com teor total entre 60 a 90%.

A Tabela 2.8 apresenta a composição centesimal média percentual das frações extraídas da parede celular semi-purificada. O componente quantitativamente mais importante é a fibra, com uma predominância muito grande de fibra solúvel (70,54%) para as mananas, fibra insolúvel (87,78%) para as glicanas insolúveis e fibra solúvel (54,73%) para as glicanas solúveis.

A fração glicoproteína apresentou maior teor de proteína que as demais, com 23,74%. Nas demais frações, os teores de proteínas variaram entre 4,36% (mananas e glicanas insolúveis) e 2,00% (glicanas solúveis).

Foi observado um elevado teor de cinza, principalmente nas frações glicoproteínas, mananas, glicanas insolúveis e glicanas solúveis. Isto se deve ao fato dos reagentes utilizados durante o processo de extração da mesma, necessitando, desta forma, submeter estas frações a um processo de diálise para eliminação deste resíduo.

Na Tabela 2.9 está apresentada a composição centesimal média percentual das frações extraídas da parede celular semi-purificada dialisada. A diálise favoreceu a diminuição do teor de cinza e um aumento dos outros componentes. Foi observado com a diálise um aumento do teor de fibra solúvel (56,20%) e um aumento do teor de proteína (35,51%) na fração glicoproteína; um aumento do teor de fibra solúvel (9,20%) na fração glicana insolúvel e um aumento do teor de fibra solúvel de 54,7% para 70,73% na fração glicana solúvel.

Tabela 2.8. Composição média percentual das frações extraídas da parede celular (PC) semi-purificada de levedura de cana subproduto de processo de autólise industrial.

Componentes (% b.s.)¹	Glicoproteína	Mananas	Glicanas insolúveis	Glicanas solúveis
Proteína (N x 6,25)	23,74	4,36	4,36	2,00
Fibra alimentar:				
Total	45,46	82,52	90,02	60,43
Insolúvel	1,04	11,98	87,78	5,70
Solúvel	44,42	70,54	2,24	54,73
Cinza	25,98	18,25	7,86	18,59
Lipídios totais	0,082	0,83	4,41	0,70
Não determinados (diferença)	4,74	—	—	18,28

¹ Média de duas determinações

Os componentes não determinados das glicanas solúveis que representam 12,72% poderão ser oligossacarídeos ou monossacarídeos que não são precipitáveis pelo etanol 95% durante o processo de determinação de fibra solúvel e insolúvel.

Tabela 2.9. Composição média percentual das frações extraídas da parede celular (PC) semi-purificada de levedura de cana subproduto de processo de autólise industrial dialisada.

Componentes (% b.s.)¹	GP	M	GI	G+M	GS
Proteína (N x 6,25)	35,51	5,57	6,16	21,36	6,12
Fibra alimentar:					
Total	56,84	83,88	84,40	69,68	76,38
Insolúvel	0,64	13,54	75,20	9,45	5,65
Solúvel	56,20	70,34	9,20	60,23	70,73
Cinza	6,74	3,09	3,96	3,22	4,10
Lipídios totais	0,16	0,55	4,01	3,27	0,68
Não determinados (diferença)	0,75	6,91	1,47	2,47	12,72

¹ Média de duas determinações. GP = glicoproteína; M = manana; GI = glicanas insolúveis; G+M = glicana + manana; GS = glicanas solúveis.



Figura 2.8. – Fotografia da parede celular (PC) e suas respectivas frações:
1: PC; 2: GP; 3: G+M; 4: M; 5: GI; 6: GS

- **Extração e quantificação do ergosterol da fração lipídica da parede celular (PC) semi-purificada de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial**

A quantidade de ergosterol encontrada em 230 g de PC semi-purificada foi de 1 mg (6,18 min.). Segue o perfil cromatográfico da amostra obtida (Figura 2.9)

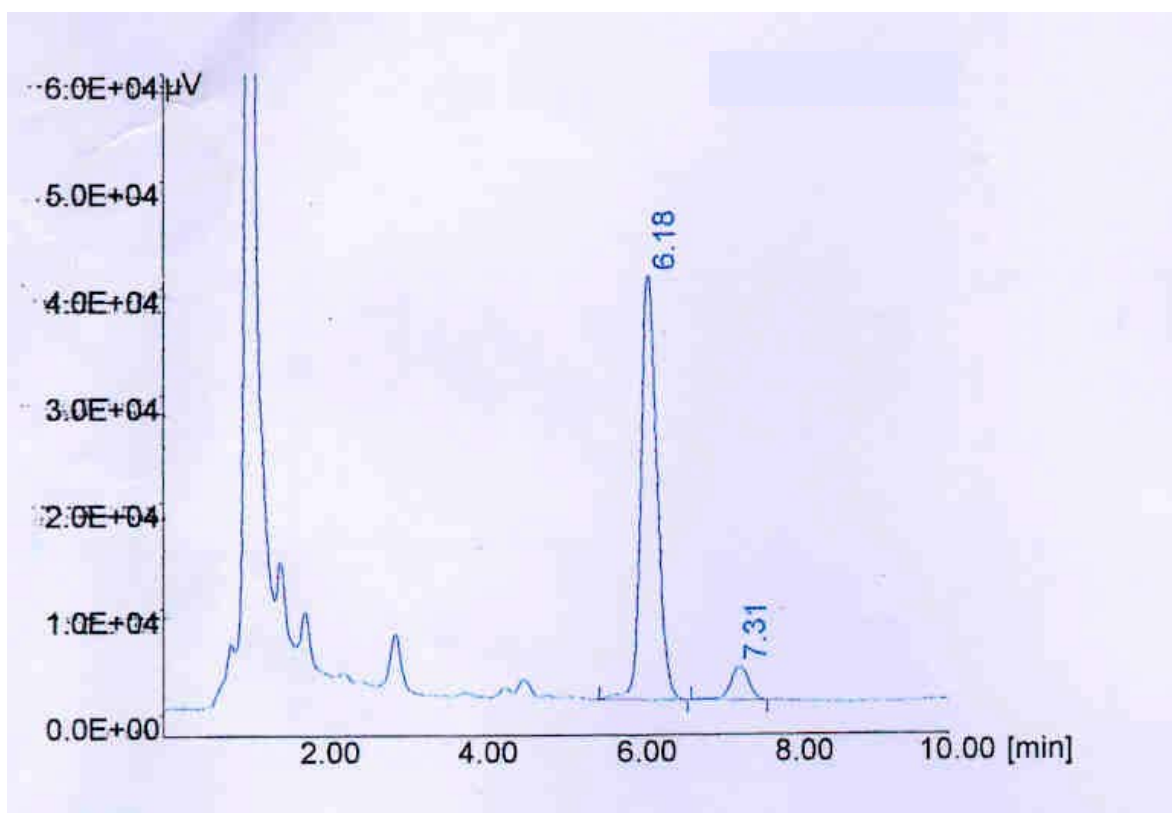


Figura 2.9. Cromatograma referente à quantificação do ergosterol da fração lipídica da parede celular (PC) proveniente da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial.

O ergosterol apresenta uma propriedade importante, podendo ser transformado em ergocalciferol (vitamina D₂) por exposição aos raios UV.

Observa-se na Figura 2.9 que o ergosterol obtido não se encontra 100% puro, apresenta alguns contaminantes.

- **Extração e quantificação dos monossacarídeos da parede celular (PC) e de suas respectivas frações, e análise de carboidratos totais e açúcares redutores**

Foi realizada uma análise visando à extração e quantificação dos monossacarídeos, açúcares redutores e carboidratos totais na parede celular (PC) e em suas respectivas frações. Com relação a esta análise, observou-se que a parede celular apresentou maior quantidade de açúcares totais 80,80 g/100g de amostra, em relação as outras frações. A fração manana apresentou a maior quantidade de açúcares redutores totais (70,02% de açúcares redutores) e também a maior quantidade de manose (48,40%) comparadas com as demais frações analisadas.

A glicose foi encontrada em maior porcentagem na fração glicana insolúvel (28,95% de glicose) e na fração glicana solúvel (25,07% de glicose).

A fração glicana + manana apresentou os menores níveis de carboidratos totais (22,08 g/100 g de amostra) e de redutores totais (20,02%) comparadas com as demais frações analisadas.

As análises de carboidratos totais, açúcares redutores totais e extração de monossacarídeos na parede celular (PC) e em suas respectivas frações se encontram na Tabela 2.10.

Tabela 2.10. Extração e quantificação dos monossacarídeos na parede celular (PC) e em suas respectivas frações, e análise de carboidratos totais e açúcares redutores.

Componente (%b.s.) ¹	Carboidratos totais g/100g de amostra	Redutores totais %	Glicose %	Manose %
P.C.	80,80±0,02 ^A	23,39±0,46 ^D	11,61±0,46 ^D	13,50±0,04 ^C
Glicoproteína	76,80±0,05 ^B	40,81±0,02 ^B	5,10±0,02 ^F	32,41±0,02 ^B
Glicana insolúvel	37,39±0,03 ^D	35,02±0,04 ^C	28,95±0,05 ^A	0 ^E
Manana	76,39±0,02 ^C	70,02±0,03 ^A	11,31±0,04 ^E	48,40±0,05 ^A
Glicana + Manana	22,08±0,36 ^F	20,02±0,02 ^F	14,60±0,02 ^C	6,30±0,03 ^D
Glicana solúvel	30,69±0,02 ^E	20,90±0,01 ^E	25,07±0,03 ^B	0 ^E

¹ Média de 3 replicatas.

Os resultados (médias ± desvio-padrão de 3 replicatas) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem no nível de 5% (p > 0,05), avaliação estatística feita através do teste de Tukey.

2.4 CONCLUSÕES

- Foi possível aprimorar metodologias para limpeza e fracionamento da parede celular (PC), em que as frações obtidas de maior rendimento foram as mananas (25,13%) e as glicanas (42,92%).
- A análise centesimal demonstrou que a parede celular (PC) é excelente fonte de minerais e fibra dietética.
- Os aminoácidos mais abundantes encontrados na parede celular (PC) foram: ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, serina e treonina. Os aminoácidos sulfurados e a leucina encontram-se limitantes.
- Foi observado na parede celular (PC) uma predominância de ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico), seguido dos monoinsaturados (palmitoléico e oléico) e, por último, dos poliinsaturados (linoléico e α -linolênico).
- A determinação de elementos minerais na parede celular (PC) revelou que a relação cálcio/fósforo (ideal 2:1) não se apresentou adequada. Os principais elementos minerais presentes na parede celular (PC) foram: cálcio, fósforo, potássio, ferro, cobre, zinco e manganês, sendo que a PC representa uma excelente fonte de ferro e cobre. Observou-se uma diminuição de magnésio e manganês quando comparada com a biomassa.
- O componente quantitativo mais importante das frações extraídas e dialisadas da parede celular (PC) foi a fibra, com uma predominância de fibra solúvel (70,34%) para as mananas, fibra insolúvel (75,20%) para as glicanas insolúveis e fibra solúvel (60,23%) para as glicanas + mananas.
- A parede celular (PC) apresentou maior quantidade de açúcares totais (80,80 g/100 g de amostra). A fração manana apresentou maior quantidade de açúcares redutores totais (70,02%) e uma maior quantidade de manose (48,40%). A glicose foi encontrada em maior porcentagem na fração glicana insolúvel (28,95%) e na fração glicana solúvel (25,07%).

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. **Association of Official Agricultural Chemists**, official methods of analysis, 16th ed., Washington D.C., 1998.

A.O.C.S. **American Oil Chemist Society**, official methods and recommended practices, 5th ed., Champaign, 1997.

ANGELUCCI, E.; MANTOVANI, D. M. B. **Minerais em alimentos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, 1986, 131p.

BABAYAN, T. L.; BEZRUJOU, M. G.; LATOU, U. K.; BELIKOU, V. M.; BELAUTSEVA, E. M.; TITOVA, E. Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: morphological effects, rheological, effects, and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. **Current Microbiology**. New York, v.5, n.3, p.163-168, 1991.

BARRETO-BERGTER, E.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. R. Cell constituents of mycelia and conidia of *Aspergillus fumigatus*. **Carbohydrate Research**, London, v. 95, n. 2, p. 205-217, 1981.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 6, p. 1420-1425, 1988.

CARVER, J. D.; WALKER, W. A. The role of nucleotides in human nutrition. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Los Altos, v. 6, n. 2, p. 58-72, 1995.

CARVER, J. D; COX, W. L.; BARNES, L. A. Dietary nucleotide effects upon murine natural killer cell activity and macrophage activation. **Journal of Parental and Enteral Nutrition**, Baltimore, v.14, n. 1, p.18-22, 1990.

DING, X. L.; WANG, M. Development of a Water soluble carboxymethyl- β -(1,3)-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. In: Food for health in the Pacific Rim. Eds: WHIBAKER, J. R.; HAARD, N. F.; SHOEMAKER, C. F.; SINGH, R. P. **Food and Nutrition Press Inc.**, Thrunbull, 1999, p. 412-419.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBER, P. A.; SMITH, E. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUFFUS, J. H.; LEVI, C.; MANNERS, D. J. Yeast cell-wall glucans. In: ROSE, A. H. Ed. **Advances in Microbial Physiology**. London: Academic Press, 1982, p.151-181.

DZIEZAK, J. D. (Ed.). Yeasts and yeast derivatives: Definitions, characteristics, and processing. **Food Technology**, Chicago, v. 41, n. 2, p. 104-121, 1987a.

DZIEZAK, J. D. (Ed.). Yeasts and yeast derivatives: Definitions, characteristics, and processing. **Food Technology**, Chicago, v. 41, p. 122-125, 1987b.

FAO/WHO. Protein quality evaluation. Report of the joint FAO/WHO expert consultation. Food and nutrition paper n°51. **Food and Agriculture Organizations and the World Health Organization**, 1989, Rome, Italy.

FLEET, G. H.; MANNERS, D. J. The enzymic degradation of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 98, p. 315-327, 1977.

FURCO, A. M. Produção de biomassa de levedura em destilarias de álcool. **Anais do “Wokshop” sobre produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal**, 1996, p. 52-58, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. New York, CRC Press, 1991, 312 p.

HERBERT, D.; RHIPPS, P. J.; SAMANGE, R. E. Chemical analysis of microbial cells. In: NORRIS, J. R.; RIBBONS, D. W. (Ed.). In: **Methods in Microbiology**. London: Academic Press, 1971, v.5B, p.249.

IEE - INSTITUTO DE ELETROTÉCNICA E ENERGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Cana-de-açúcar no Brasil**. [online]. [extraído em: 26.03.04]. URL: <http://infoener.iee.usp.br/scripts/biomassa/br_cana.asp>

IMO INDUSTRIES INC. **Baird Analytical Instruments Division**. ICP spectrometer user's guide. Bedford, Massachusetts, 1990.

KIHLBERG, R. Microbe as a source of food. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 26, p. 749-761, 1972.

KINSELLA, J. E.; SHETTY, H. J. Yeast protein recovery, nutrition and functional properties. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v.107, p.797-825, 1978.

KOLLAR, R.; STURKIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v. 6, n. 3, p. 225-237, 1992.

KRATOCHVILOVA, A. K. **Yeasts and Yeast-like Organisms**. New York: VCH Publishers Inc., 1990.

LEE, H. O. **Fundamentals of Food Biotechnology**. Ed. V.C.H. Publishers Inc. New York, 1996, 431p.

MACWILLIAM, I. C. The structure, synthesis and functions of the yeast cell wall - A review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 76, n. 6, p. 524-535, 1970.

MANNERS, D. J.; MASSON, A. J.; PATTERSON, J. C. The structure of β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan from yeast cell walls. **Biochemistry Journal**, London, v. 135, n. 1, p. 19-30, 1973.

MARIATH, J. G. R.; ZUCAS, S. M. Valor nutricional da proteína isolada do resíduo da cerveja. **Alimentação**, São Paulo, n.65, p.24-36, 1983.

NAS (National Academy of Science) - **Recommended Dietary Allowances**, 10th edition, National Academy Press, Washington, D.C., 1989.

OTERO, M. A.; VASALLO, M. C.; VERDIEIRA, O.; FERNANDEZ, V.; BETANCOURT, D. A process for the complete fractionation of baker's yeast. **Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology**, London, v. 67, n. 1, p. 67-71, 1996.

PACHECO, M. T. B.; CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrates. **Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology**, Tokyo, v. 43, n. 6, p. 601-612, 1997.

PEIXOTO, N. Processamento de produtos de biomassa de levedura para alimentação humana: potencial, mercado interno e externo. **Anais do “Wokshop” sobre produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal**, p.90-98, 1996. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP.

PRODOLLIET, J.; BRUELHART, M.; LADOR, F.; MARTINEZ, C.; OBERT, L. Determination of free and total carbohydrate profile in soluble coffee. **Journal of AOAC International**, San Francisco, v. 78, n. 3, p. 749-761, 1995.

PROSKY, L.; ASP, N.; SCHWEIZER, T. F.; DEVRIES, J. W.; FURDA, I. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v. 71, n. 5, p. 1017-1023, 1988.

RAJCHEVA-ROSHOVA, Z. G.; DKUZIANDJIEV. S. V.; PAVLOVA, K. I. Fractionation and characterization of yeast proteins. **Die Nahrung**, Berlim, v.333, n.4, p.319-323, 1989.

ROSE, A. H. Composition of the envelope layer of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. **Journal of Applied Bacteriology**. Symposium Supplement, Oxford, v. 74, supp. 22, p. 1105-1185, 1993.

SARWAR, G.; SHAH, B. G.; MONGEAU, R.; HAPPNER, K. Nucleic acid, fiber and nutrient composition of inactive dried food yeast products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 353-357, 1985.

SPACKMAN, D. C.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. **Analytical Biochemistry**. New York, v.30, n.9, p.1190-1206, 1958.

VAVANUVAT, P. Value of yeast protein for poultry feed. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 9, p. 325-343, 1977.

VAVANUVAT, P.; KINSELLA, J. E. Amino acid composition of protein isolates from *Saccharomyces fragilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 23, n. 3, p. 595-597, 1975.

VUKOVIC, R; HUNDINA-DOM LADO VEC, M.; MRSA, V. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Croatica Chemica Acta**, Zagreb, v. 68, n. 3, p. 597-605, 1995.

WILLIAMS, D. L.; PRETUS, H. A.; McNAMEE, R. B.; JONES, E. L.; ENSLEY, H. E.; BRONDER, I. W.; DI LUZIO, N. R. A method for the solubilization of a (1→3)-beta-D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.219, p. 203-213, 1991.

**Parede celular (PC) e respectivas frações:
propriedades funcionais tecnológicas**

Capítulo 3

Parede celular (PC) e respectivas frações: Propriedades funcionais tecnológicas

Resumo

A levedura é apresentada na literatura como um bom agente funcional. Visando explorar essa propriedade, este capítulo tem como objetivo a avaliação das qualificações da PC e suas respectivas frações quanto às propriedades funcionais tecnológicas. A solubilidade não foi influenciada pelo pH na PC e em suas respectivas frações. A glicana solúvel (GS) foi a fração que apresentou melhor resultado em relação à solubilidade para proteína nos vários pH(s) analisados e a fração glicana + manana (G + M) a que apresentou menor solubilidade para proteína. Os resultados de solubilidade em relação a porcentagem de sólidos solúveis mostraram que a fração glicana solúvel (GS) apresentou melhor solubilidade e a fração glicana insolúvel (GI) menor solubilidade devido ao fato desta amostra ser praticamente insolúvel em água. Observou-se que, na medida em que se acrescentou ovoalbumina (0,2%, 0,4% e 0,6%) à suspensão da PC e em suas respectivas frações, houve um aumento significativo na capacidade de emulsificação e estabilidade da emulsão. As diferenças do menor valor de absorção de água, 0,027 para PC para 1,53 glicana solúvel (GS) (mL de água / g amostra) e de óleo, 0,02 glicana solúvel (GS) para 0,45 glicana insolúvel (GI) (mL de óleo/g amostra) foram significativas. A fração glicana solúvel (GS) apresentou maior capacidade de reter água (14,36 g de água/g amostra), porém menor índice de solubilidade em água (0,06%) que as demais frações. A fração glicoproteína (GP) apresentou capacidade de retenção de água relativamente baixa (5,33 g de água / g de amostra), porém o maior índice de solubilidade em água (83,83%) que as demais frações. Os maiores índices de viscosidade ao redor de 50°C no aquecimento foram encontrados na fração glicana solúvel (GS). A viscosidade a 95°C e a viscosidade final (50°C)

obedeceram a seguinte ordem: glicana solúvel (GS) > glicana insolúvel (GI) > glicana + manana (G+M) > manana (M), glicoproteína (GP) e PC. Os melhores resultados dos parâmetros de textura dos géis foram observados na fração glicana insolúvel (GI) na concentração de 12% e 14% (p/v).

3.1 INTRODUÇÃO

A funcionalidade de um ingrediente está relacionada com as características físico-químicas mais relevantes do mesmo, e que exercem grande influência nos processos de elaboração, estocagem, qualidade e aceitação de um alimento como produto final (CHOU; MORR, 1979).

Na área de alimentos, muitos polissacarídeos de origem microbiana têm sido utilizados largamente, devido às suas propriedades de viscosidade em sistema aquoso, sendo empregados como espessantes. Outra aplicação de grande interesse é a utilização como substituto de gorduras em certos tipos de alimentos dietéticos, tais como coberturas de saladas, sorvetes etc., devido ao *flavor* agradável e textura suave (BELEM; LEE, 1998).

No uso da levedura e seus derivados em indústrias de alimentos para produção de sopas desidratadas e produtos cárneos, Kollar et al. (1992) ressalta a importância de propriedades funcionais específicas para estes produtos, a saber: solubilidade, absorção de água e óleo, retenção de água e capacidade emulsificante.

A solubilidade dos ingredientes de um alimento como sopa é muito importante, uma vez que poderá influenciar no sabor e textura do alimento. As proteínas de células isoladas de levedura possuem baixa solubilidade quando comparadas a outras proteínas vegetais como a soja, principalmente a valores de pH mais comuns nos alimentos (SCHACHTEL, 1981).

De acordo com De Kanterewicz et al. (1989), a capacidade de absorção de óleo tem grande importância na formulação de alimentos, podendo influenciar na ordem de adição dos ingredientes secos na mistura, além de ser usado para determinar os tempos de mistura de forma a se obter uma distribuição uniforme do

óleo ou gordura na mistura seca. Otero et al. (1996) observaram que a capacidade de absorver óleo do concentrado protéico de levedura foi aproximadamente 3 vezes o valor da absorção de óleo do isolado protéico de soja.

A absorção de água de um componente do alimento determina não somente a aceitabilidade do produto final em termos de textura e suculência, mas também a sua margem de lucro. Estes índices são essenciais em alimentos como a gelatina, onde se obtém um produto com aproximadamente 95% de água (HALL, 1996). De acordo com Kinsella (1976), a capacidade de retenção de água é de grande utilidade na fabricação de produtos cárneos, onde impedem a perda de água no processo de cozimento, em produtos de panificação e em alimentos viscosos como sopas. De acordo com Nagodawithana (1992), os nucleotídeos obtidos do RNA de levedura são atualmente empregados como flavorizantes com sabor à carne ou queijo em indústria de alimentos, o que indica a necessidade de avaliação de absorção de água.

A capacidade de uma proteína de formar e estabilizar uma emulsão é fator crítico para a produção de carnes moídas, massas para bolos, cremes para café, maioneses, molhos para saladas e sobremesas congeladas. Marques et al. (1998) afirma que o uso da glicana de levedura como emulsificante se destaca por ser de origem biológica. Lee (1996), ao avaliar a glicana, extraída de uma fração da parede celular de levedura, diz que a mesma poderá ser utilizada como emulsificante, estabilizante ou texturizante, além de ser útil na formulação de alimentos com baixo teor de gordura e baixas calorias.

Este capítulo tem como objetivo a avaliação das qualificações da PC e suas respectivas frações quanto às propriedades funcionais tecnológicas, para um melhor aproveitamento da mesma na elaboração de produtos e/ou ingredientes com potencial de aplicação na indústria de alimentos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

O material utilizado para estudo das propriedades funcionais tecnológicas, foram os mesmos preparados e caracterizados no capítulo anterior, sub-itens (2.2.1 e 2.2.2).

3.2.2 Métodos

- **Solubilidade (Nitrogênio solúvel)**

As determinações foram feitas segundo procedimento de Morr et al. (1985), que é uma modificação do procedimento do índice de solubilidade do nitrogênio. A solubilidade foi avaliada na faixa de pH de 2 a 12, em solução aquosa e salina 0,1M e os pHs ajustados com NaOH 0,1 N ou HCL 0,1 N. As suspensões foram deixadas em agitação por uma hora à temperatura ambiente sendo que a obtenção do teor de proteína foi determinado no sobrenadante após centrifugação pelo método Kjeldhal.

- **Solubilidade (Nitrogênio e sólidos solúveis)**

As determinações foram feitas segundo procedimento de Morr et al. (1985), que é uma modificação do procedimento do índice de solubilidade do nitrogênio. A solubilidade foi avaliada na faixa de pH de 2 a 12, em solução aquosa e salina 0,1M e os pHs ajustados com NaOH 0,1 N ou HCL 0,1 N. As suspensões foram deixadas em agitação por uma hora à temperatura ambiente sendo que a obtenção do teor de proteína determinado no sobrenadante após centrifugação, pelo método de Kjeldhal e os sólidos solúveis gravimetricamente até obtenção de peso constante.

- **Capacidade de Retenção de Água (C.R.A.) e Índice de Solubilidade em Água (I.S.A.)**

Foram determinados segundo Anderson et al. (1969). Uma mistura contendo 2,5 g das amostras e 30 mL de água foi mantida sob agitação por 30

min. Em seguida, o material foi centrifugado a 1611 x g. O sedimento foi pesado e no sobrenadante foi determinado o resíduo seco (sólidos solúveis) após evaporação. Os índices foram calculados de acordo com as seguintes expressões:

$$\text{C.R.A.} = \frac{\text{Peso do resíduo de centrifugação (g)}}{\text{Peso da amostra (b.s.) (g)} - \text{Peso do resíduo da evaporação}}$$

$$\text{I.S.A.} = \frac{\text{Peso do resíduo de evaporação (g)} \times 100}{\text{Peso da amostra (b.s.) (g)}}$$

- **Geleificação**

Inicialmente foram preparadas dispersões da amostra em diferentes concentrações, para determinar a concentração mínima de amostra onde ocorre geleificação, conforme metodologia de Sathe e Salunke (1981), com algumas modificações. Dispersões de 2, 4, 6, 8 e 10% foram preparadas em 10 mL de tampão fosfato 20 mM, pH 7,0, e colocadas em tubos de ensaio. Os tubos foram aquecidos por 1 hora a temperatura de 90° C, resfriados rapidamente e mantidos por 2 horas a 4° C. A menor concentração capaz de promover geleificação foi aquela onde os tubos foram invertidos e as amostras não caíram ou deslizaram pela parede do tubo.

- **Textura dos géis**

As medidas de textura dos géis foram realizadas pelo método de compressão, usando o analisador de textura TA-XT₂ (Figura 3.1). Os parâmetros de dureza, fraturabilidade e adesividade determinadas neste estudo correspondem ao pico de força durante a primeira compressão (programa "return to start").

A fraturabilidade, de acordo com Bourne (1978), corresponde à resistência oferecida pelo gel até o momento de ruptura, a dureza corresponde a resistência do gel à compressão a uma dada profundidade e a adesividade representa o trabalho necessário para remover a sonda compressora da amostra após a compressão. O diâmetro da sonda foi de 1 polegada, a velocidade de 1 mm/min., em temperatura ambiente, realizando 50% de compressão. Foi escolhida a concentração de 12% e 14% para realizar as medidas de força do gel das

amostras glicana solúvel e glicana insolúvel. Os géis para análise de textura foram preparados em tampão fosfato 20 mM, pH 7,0.

As dispersões foram pré-aquecidas por aproximadamente 3 minutos à temperatura de 40°C, colocadas em tubos com diâmetro de 11 mm e desaeradas por centrifugação a 400 g por 10 minutos na temperatura de 20°C. A seguir, os tubos foram colocados em banho de água a 90°C por 30 minutos e, em seguida, resfriados rapidamente. Os géis foram cortados em amostras de 2 cm de altura para as determinações no texturômetro, e comprimidos em 50% de sua altura original.



Figura 3.1. Analisador de textura TA-XT₂

- **Capacidade emulsificante (C.E.)**

Para avaliação prévia foi empregado o procedimento descrito por De Kanterewicz et al. (1987), combinando-se dispersões de amostras a 1% e óleo de soja refinado comercial tipo 1 Tupã em volume final de 50 mL. Após 3 min de homogeneização (em banho de gelo) em homogeneizador Ultra-Turrax T₂₅, a 1.000 rpm, o óleo foi adicionado a partir de uma bureta mediante homogeneização

simultânea até a inversão das fases. Como esta visualização não é muito precisa, o ponto de inversão das fases foi determinado de acordo com o método descrito por Dagorn-Scaviner et al. (1987) com algumas modificações, ou seja, preparava-se a mistura de dispersões de óleo de soja em proporção próximas ao ponto de quebra determinado pelo método de De Kanterwicz et al. (1987), homogeneizando-se por 1 minuto a 1.000 rpm em banho de gelo. A seguir, o óleo era adicionado gota a gota sobre a mistura em agitação até inversão das fases caracterizada pela quebra da emulsão visualizada pela mudança de coloração e separação das fases. Para melhor visualização da quebra foi utilizado 7 gotas de uma solução de sudan 3 (0,1 g de sudan 3, 50 mL de glicerina líquida e 50 mL de álcool etílico 95%). O resultado final foi expresso em mL de óleo, adicionados até o ponto de inversão, por g de amostra.

- **Estabilidade da emulsão (E.E.)**

Foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Acton e Saffle (1970), com algumas adaptações às condições do laboratório. Foi tomada uma proporção da dispersão/solução quando ocorreu a quebra da emulsão da mesma amostra que estava sendo feita a capacidade de emulsificação, após as quais foi coletada uma alíquota de 5 mL para determinação de umidade. Uma alíquota de 10 mL foi mantida em tubos à temperatura ambiente por 24 horas, da qual foi coletada nova amostra de 5 mL, da parte inferior do tubo, para determinação de umidade.

$$E.E. (\%) = \frac{100 - U_{24 \text{ horas}}}{100 - U_{\text{original}}} \times 100$$

$U_{24 \text{ horas}}$ = porcentagem de umidade após 24 horas

U_{original} = porcentagem de umidade na emulsão recém preparada.

- **Capacidade de absorção espontânea de água (C.A.A.)**

Foi determinada usando modificação do aparelho de Baumann efetuada por Torgensen e Toledo (1977). O aparelho consiste de um funil conectado a um capilar horizontal (pipeta de 1,0 a 2,0 mL, graduada em centésimos de mL). A

amostra (1,00 g) foi espalhada em um papel de filtro Whatman nº 1, úmido, colocado no topo de um funil de Büchner com água ao nível da placa perfurada, com o cuidado de retirar o excedente de água, mediante papel absorvente. O ensaio foi conduzido à temperatura ambiente de 25° C. A absorção de água pela amostra, ao longo de 35 minutos foi lida na pipeta, a intervalos de tempo cronometrados, e expressa em mL de água absorvida por g de amostra. As determinações foram efetuadas em triplicata, e quando necessário em quintuplicata, devido à variabilidade intrínseca do método.

- **Capacidade de absorção espontânea de óleo (C.A.O.)**

Foi realizada no mesmo equipamento descrito para absorção de água, seguindo-se a metodologia de De Kanterewicz et al. (1987) empregando filtro de microfibras de vidro WHATMAN GF/C, e óleo de soja tipo 1 Tupã, por um período de dez minutos, a intervalos de tempo cronometrados. O resultado foi expresso em mL de óleo absorvido por g de amostra.

- **Viscosidade**

Estudo comparativo da viscosidade (URV) da PC semi-purificada e frações da parede celular de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial, foi realizado usando-se o analisador rápido de viscosidade (Rapid Visco Analyzer), modelo RVA-3D da *Newport Scientific Pty. Ltd.*, Sidney, Austrália, provido do software *Termocline*.

O analisador rápido de viscosidade foi projetado para determinação de viscosidade de produtos amiláceos a partir de pequenas quantidades de amostra (3 a 4 g), em um curto espaço de tempo (13 a 20 min.). As etapas de aquecimento, temperatura constante e resfriamento são monitoradas automaticamente por computador (WHALEN et al., 1997).

O RVA expressa os resultados em uma curva onde são identificados vários parâmetros para avaliação das amostras como viscosidade final do produto após aquecimento, retrogradação do amido, temperatura de pasta, dentre outras. Essas informações são usadas para avaliar a qualidade de produtos amiláceos,

determinar comportamento de produtos no cozimento, vida de prateleira de produtos, dentre outras características (Newport Scientific Pty. Ltd., 1998).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

- **Caracterização analítica da parede celular semi-purificada e das frações**

A composição centesimal da parede semi-purificada e de suas respectivas frações está apresentada na Tabela 3.1. A composição centesimal da parede semi-purificada é bastante semelhante à relatada na literatura por vários pesquisadores, do Brasil e do exterior (KIHLEBERG, 1972; DZIEZAK, 1987a, b; PACHECO et al., 1997). Na fração PC, o componente quantitativamente mais importante é a fibra (77,8%), com uma predominância de fibra solúvel (74%).

Na PC permanece, mesmo depois de lavada exaustivamente com água, de 18 a 20% de proteína, que são glicoproteínas estruturais (VUKOVIC et al., 1995; FLEET; MANNERS, 1977; CAMERON et al., 1988).

O componente quantitativamente mais importante da composição centesimal média porcentual das frações extraídas da PC semi-purificada é a fibra, com predominância de fibra solúvel (70,34%) para as mananas, fibra insolúvel (75,20%) para as glicanas insolúveis e fibra solúvel (60,23%) para as glicanas + mananas e fibra solúvel (70,73%) para as glicanas solúveis.

A fração glicoproteína apresentou maior teor de proteína que as demais (35,51%), seguida pela fração glicana + manana (21,36%). Nas demais frações, os teores de proteínas variaram entre 6,16% à 6,12% (glicana solúvel e insolúvel) e 5,57% para as mananas.

Os componentes não determinados das glicanas solúveis que representam 12,72% poderão ser oligossacarídeos ou monossacarídeos que não foram precipitados pelo etanol 95% durante o processo de determinação de fibra solúvel e insolúvel.

Tabela 3.1. Composição centesimal da PC semi-purificada de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial e de suas respectivas frações dialisadas.

Componente (% b.s.)¹	PC	GP	M	GI	G+M	GS
Proteína (Nx6,25)	18,80	35,51	5,57	6,16	21,36	6,12
Fibra alimentar:						
Total	77,80	56,84	83,88	84,40	69,68	76,38
Insolúvel	3,80	0,64	13,54	75,20	9,45	5,65
Solúvel	74,00	56,20	70,34	9,20	60,23	70,73
Cinza	1,40	6,74	3,09	3,96	3,22	4,10
Lipídios totais	2,00	0,16	0,55	4,01	3,27	0,68
Não determinados (diferença)	0	0,75	6,91	1,47	2,47	12,72

¹ Média de duas determinações

PC = parede celular; GP = glicoproteína; M = Manana; GI = glicana insolúvel; G+M = glicana + manana; GS = glicana solúvel.

- **Propriedades funcionais da PC semi-purificada e frações da parede celular de levedura**

Vários fatores, como polissacarídeos, lipídios, tipo e composição de aminoácidos que compõem um ingrediente e os vários métodos utilizados para extração e fracionamento podem ter afetado as propriedades funcionais da PC e de suas respectivas frações.

Solubilidade (nitrogênio e sólidos solúveis). Os resultados de solubilidade (N x 6,25) e sólidos solúveis totais são mostrados nas Figuras 3.2 e 3.3. Ao se observar os dados de solubilidade na PC semi-purificada e nas frações da parede celular de levedura da fermentação alcoólica, em função do pH, percebemos que não apresentam curvas características de uma proteína (com os valores do ponto isoelétrico definido) como mostrado por Pacheco (1996), que preparou isolados protéicos de levedura e observou valores inferiores a 10% de solubilidade quando o pH se apresentava entre 2,0 e 4,0. Isto pode ser devido a uma hidrólise protéica durante a autólise, e a predominância nas amostras de carboidratos.

Pode-se observar que a solubilidade não foi influenciada pelo pH, pois as solubilidades não se alteraram nas mesmas amostras com a variação do pH. Ocorreu apenas uma leve alteração no resultado da solubilidade na fração glicana insolúvel nos vários pHs analisados.

A glicana solúvel foi a fração que apresentou maior solubilidade da proteína em relação à solubilidade nos vários pHs analisados e a fração glicana + manana (G + M) a que apresentou menor resultado de solubilidade (Figura 3.2).

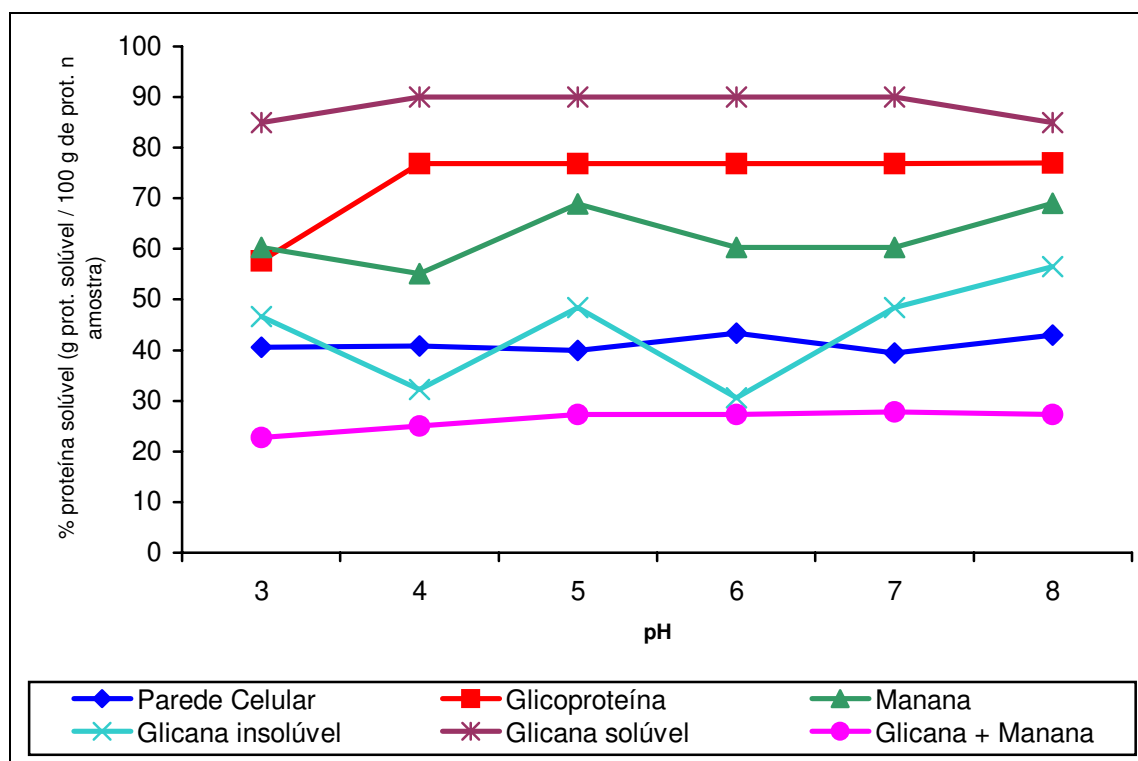


Figura 3.2. Perfil de solubilidade protéica (%N x 6,25) na PC semi-purificada e nas frações da parede celular de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial.

Os resultados de solubilidade em relação a % de sólidos solúveis mostraram que a fração glicana solúvel apresenta melhor solubilidade e a fração glicana insolúvel menor solubilidade devido ao fato desta amostra ser praticamente insolúvel em água (Figura 3.3).

De acordo com Chou e Morr (1979), os primeiros sítios de interação do sistema proteína/água são os grupos funcionais dos aminoácidos polares, onde os grupos NH_2 e -COOH são os que ligam o maior número de moléculas de água respectivamente. Podemos constatar que possivelmente houve interação entre a parede celular e algumas de suas frações, principalmente a glicana insolúvel e

estes grupos que fazem ligação com água provenientes das moléculas protéicas hidrolisadas, diminuindo assim sua solubilidade.

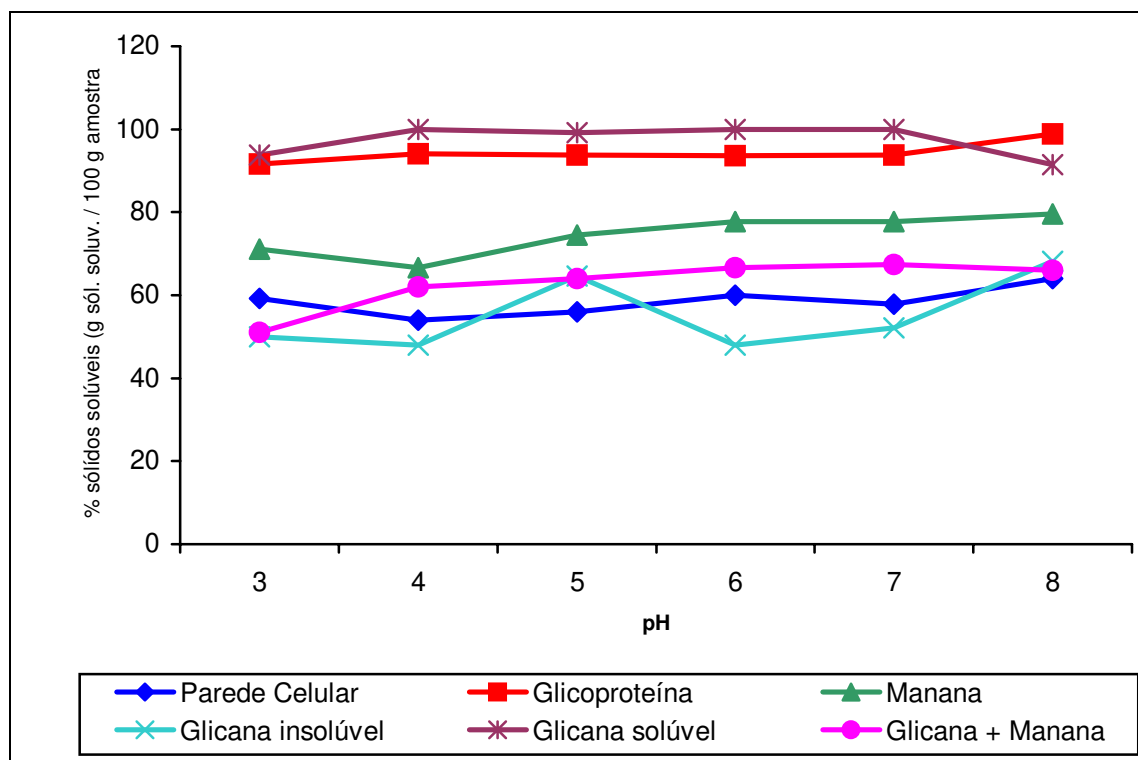


Figura 3.3. Perfil de solubilidade para sólidos solúveis na PC semi-purificada e nas frações da parede celular de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial.

Propriedades emulsificantes. Os valores da capacidade emulsificante (C.E.) e estabilidade da emulsão (E.E.) encontram-se nas Figuras 3.4 e 3.5.

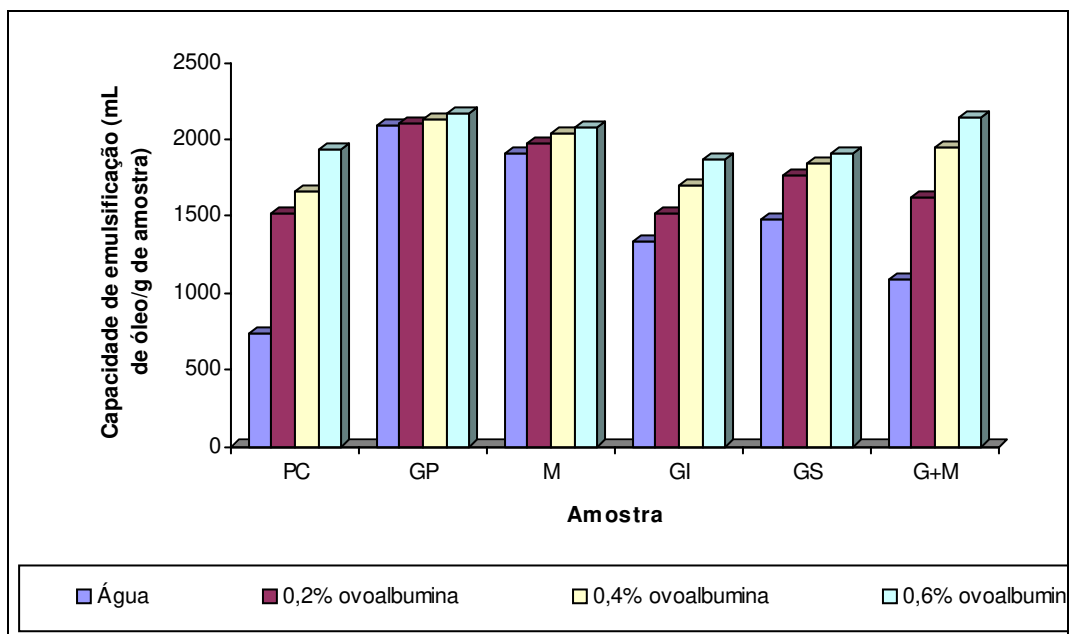
A quantidade máxima de óleo que pode ser emulsificada (mL de óleo/g de amostra) pela dispersão a 0,23% de amostra foi da glicoproteína, que se mostrou superior as demais amostras, e a da parede celular foi inferior as demais amostras. Observou-se, porém, que à medida que utilizamos misturas de ovoalbumina (soluções a 0,2%, 0,4% e 0,6%) em combinação com a PC e suas respectivas frações, houve um aumento significativo na capacidade de emulsificação das frações glicana insolúvel, glicana solúvel e principalmente glicana+manana. As diferenças na capacidade emulsificante poderiam ser atribuídas a diferenças na composição das amostras, alterações provocadas pelo

método de extração na estrutura conformacional das moléculas, mudanças na solubilidade, nas características lipofílicas e hidrofílicas, que conseqüentemente interferem no comportamento interfacial do agente emulsificante (Figura 3.4).

De acordo com Dickinson e Stainsby (1987), as modificações químicas geralmente ajudam a aumentar a carga líquida negativa da proteína, ocasionando mudança na estrutura e hidrofobicidade da molécula, afetando sua atividade de superfície. Em preparação da levedura *Candida utilis*, foram encontrados os valores de C.E. variando de 1213,8 a 1540,1 mL óleo/g de proteína e a estabilidade da emulsão obtida por aquecimento a 95° C / 30 min entre 79,1% a 87,5%, de acordo com o procedimento de preparo dos concentrados (SCHACHTEL, 1981). Para dispersões a 5% de proteína de soja, Genovese e Lajolo (1993) encontraram o valor de 1143 g de óleo/g de proteína para a capacidade emulsificante.

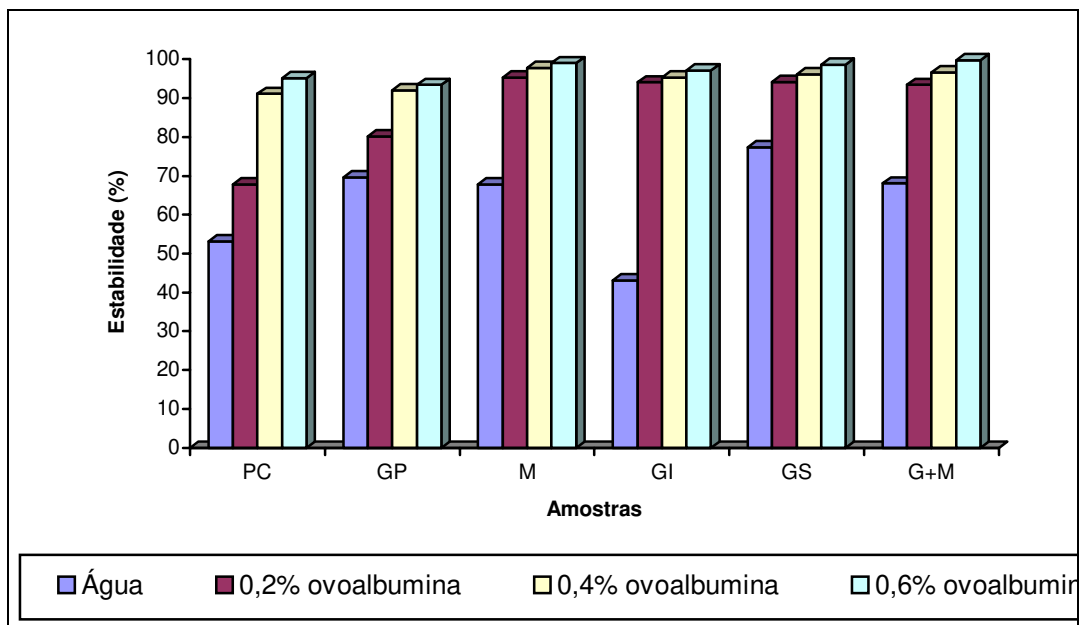
Na avaliação da estabilidade da emulsão após 24 horas, a emulsão preparada com a fração glicana solúvel da PC semi-purificada mostrou maior habilidade em permanecer inalterada e a fração glicana insolúvel apresentou a menor estabilidade. Em geral, emulsificantes de diferentes origens variam imensamente em sua habilidade de estabilizar emulsões, refletindo suas diferenças na composição e rigidez estrutural.

Verifica-se, contudo, que a estabilidade da emulsão foi afetada favoravelmente na medida em que acrescentaram-se soluções de ovoalbumina (0,2%, 0,4% e 0,6%) à PC e às suas respectivas frações (Figura 3.5). Os resultados foram concordantes com Elizalde et al. (1991) que encontraram uma correlação significativa entre o aumento da concentração de proteína e de óleo, com a estabilidade da emulsão. De acordo com Leman e Kinsella (1989), as proteínas formam uma camada de cargas ao redor das gotículas de gordura, causando uma repulsão mútua, reduzindo a tensão interfacial e prevenindo a coalescência. O aumento da concentração de proteína facilita a adsorção de maior número de proteínas nos glóbulos de gordura, resultando num aumento da estabilidade da emulsão.



PC = parede celular; GP = glicoproteína; M = Manana; GI = glicana insolúvel; G+M = glicana + manana; GS = glicana solúvel.

Figura 3.4. Representação gráfica da capacidade emulsificante (C.E.) da PC semi-purificada e suas respectivas frações, feitas com uma dispersão de 0,23% da amostra em água ou em combinação de diferentes concentrações de ovoalbumina (0,2%, 0,4% e 0,6%).



PC = parede celular; GP = glicoproteína; M = Manana; GI = glicana insolúvel; G+M = glicana + manana; GS = glicana solúvel.

Figura 3.5. Representação gráfica da estabilidade das emulsões (%) da PC semi-purificada e suas respectivas frações, feitas com uma dispersão de 0,23% da amostra em água ou em combinação de diferentes concentrações de ovoalbumina (0,2%, 0,4% e 0,6%), após tempos (T_{0h} e T_{24h}).

Observou-se que à medida que se acrescentaram ovoalbumina (0,2%, 0,4% e 0,6%) à suspensão de PC semipurificada e às suas respectivas frações, houve um aumento significativo na capacidade de emulsificação (mL óleo/g amostra) e na estabilidade da emulsão (%), em um período de 24 h, o que sugere a possibilidade de uso da PC e suas respectivas frações como agente flavorizante e estabilizante, em emulsões do tipo óleo/água. VILELA (2000) encontrou um aumento do volume de óleo necessário para que ocorresse a quebra da emulsão quando adicionou amostras de levedura à solução de ovoalbumina 0,2%.

Devido ao fato da PC e suas respectivas frações conterem pequenas quantidades de proteína, o cálculo tanto para capacidade de emulsificação, quanto para estabilidade da emulsão foi baseado em g de amostras e não g de proteínas.

Capacidade de absorção espontânea de água e de óleo. As Figuras 3.6 e 3.7 mostram os perfis de absorção de água e óleo pela PC e de suas respectivas frações. A análise destas Figuras mostra que a fração glicana solúvel, seguido da fração glicana insolúvel apresentaram maiores valores de absorção espontânea de água e as frações glicoproteína e glicana insolúvel apresentaram maiores valores de absorção de óleo. A confiança nos valores registrados reside no fato de que foram confirmados por grande número de repetições. Verifica-se que as diferenças do menor para o maior valor para absorção de água, 0,03 parede celular para 1,53 glicana solúvel (mL de água/g amostra) e de óleo, 0,02 glicana solúvel para 0,45 glicana insolúvel (mL de óleo/g amostra) foram significativas. Mostrando que existe uma atração hidrofílica que é medida pelo grau de hidratação (água/g de amostra) na fração glicana solúvel e glicana insolúvel.

Observou-se que a fração glicana solúvel absorveu água rapidamente de depois se estabilizou, isso se deve ao fato da estrutura de sua amostra ter facilidade em capturar água formando um gel (rede tridimensional). A fração glicana + manana apresentou uma atração hidrofílica intermediária enquanto que a PC e as frações glicoproteína e manana foram as que apresentaram menor atração hidrofílica, devido ao fato da estrutura dessas amostras não se ligarem facilmente à água (baixo grau de hidratação).

Constatamos que o inverso ocorreu com a capacidade de absorção de óleo. A fração glicoproteína que apresentou pouca atração hidrofílica teve uma elevada atração lipofílica, a fração glicana solúvel que apresentou uma elevada atração hidrofílica teve pouca atração lipofílica e a fração manana que apresentou pouca atração hidrofílica teve uma atração lipofílica intermediária.

A fração glicana insolúvel porém apresentou elevada atração hidrofílica e lipofílica, a PC apresentou baixa atração hidrofílica e lipofílica e a fração glicana + manana apresentou atração hidrofílica e lipofílica intermediária.

Estas propriedades têm grande importância na avaliação de uma amostra quanto às características emulsificantes, uma vez que para avaliar a capacidade de formação de uma emulsão pode-se utilizar o balanço de propriedades hidrofílicas e lipofílicas da proteína ou ingredientes (DE KANTEREWICZ et al., 1987).

Os tratamentos empregados para extrair ou fracionar e também as diferentes estruturas das amostras analisadas podem influenciar na absorção de água e na absorção de óleo.

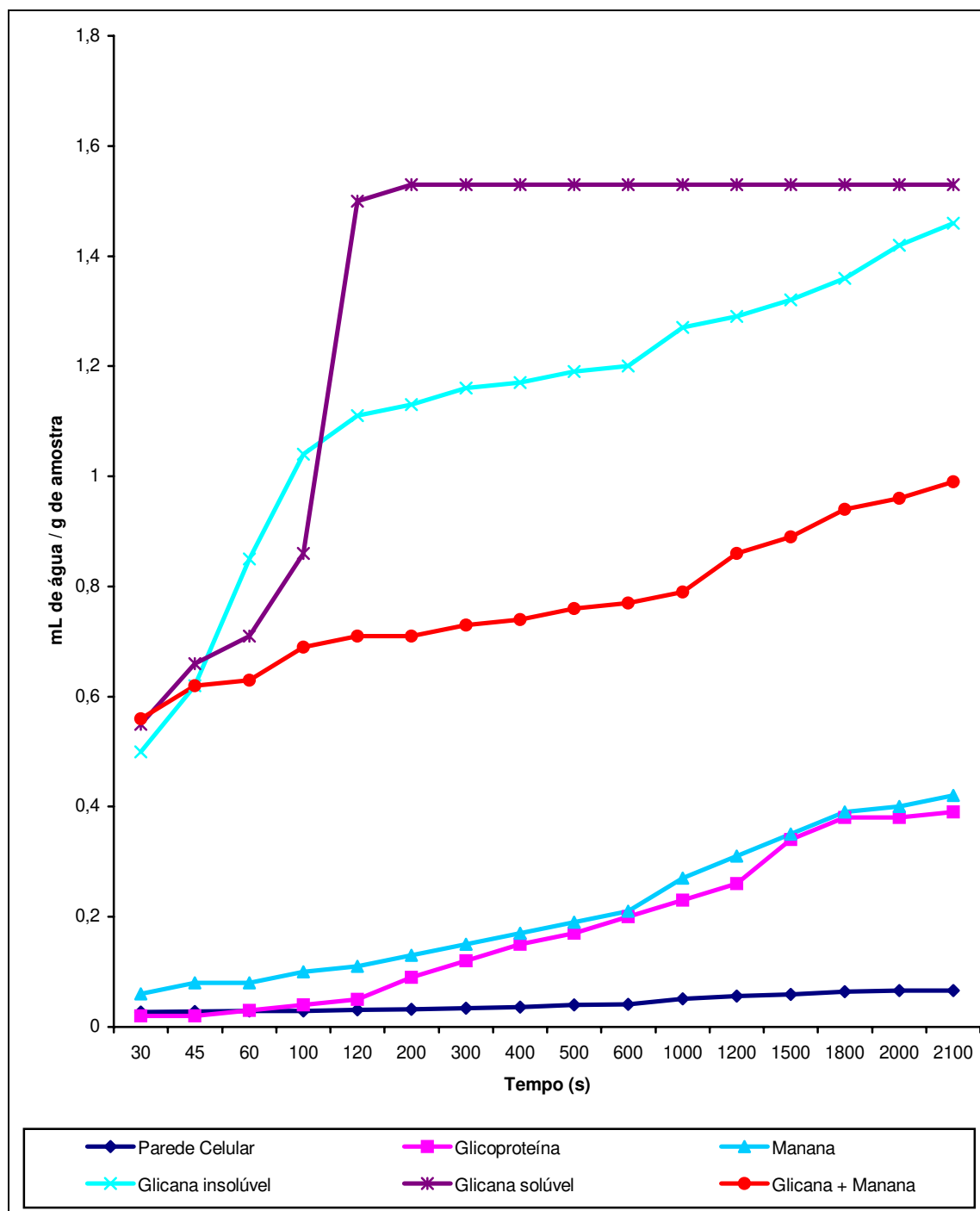


Figura 3.6. Capacidade de absorção espontânea de água pela PC semi-purificada e pelas frações da parede celular de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial.

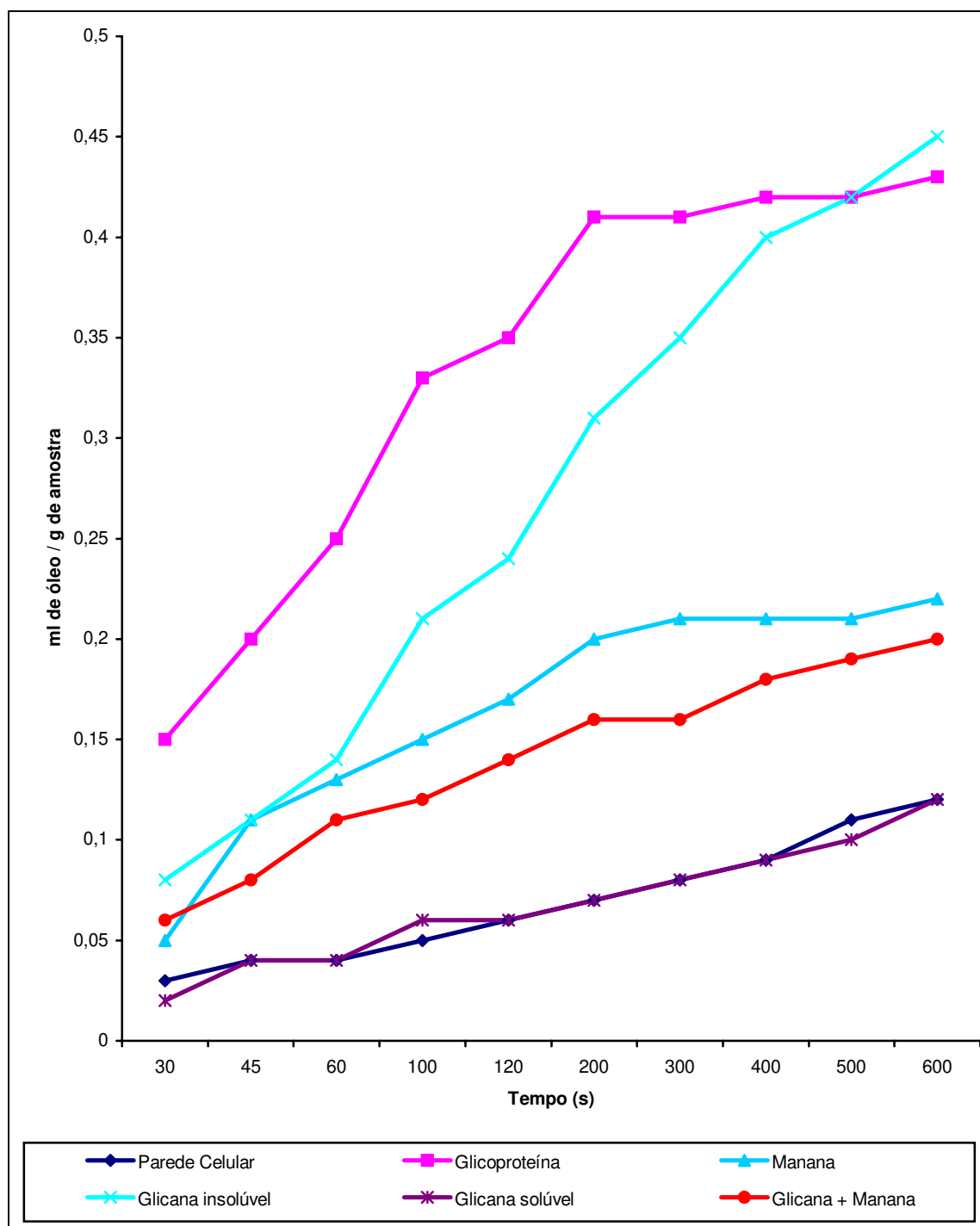


Figura 3.7. Capacidade de absorção espontânea de óleo pela PC semi-purificada e pelas frações da parede celular de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial.

Capacidade de Retenção de Água (C.R.A.) e Índice de Solubilidade em Água (I.S.A.). A fração glicana solúvel apresentou maior capacidade de reter água (14,36 g de água / g de amostra), porém menor índice de solubilidade em água (0,06%). Isso se deve ao fato da fração glicana solúvel quando diluída em água formar um gel (rede tridimensional) capaz de reter os sólidos solúveis (Tabela 3.2). A capacidade de retenção de água da fração glicana insolúvel foi inferior às demais amostras (1,66 g de água / g de amostra). Devido ao fato da estrutura da sua amostra apresentar baixa capacidade de se ligar à água, formando uma rede de proteção. Foi observado (Tabela 3.2) que a fração glicoproteína apesar de apresentar baixa capacidade de retenção de água, teve o maior índice de solubilidade em água, devido ao fato desta fração ser facilmente hidratada (solúvel) em água.

Kinsela (1976) observou que a retenção de água é afetada por outras propriedades, como a solubilidade e a viscosidade.

Tabela 3.2. Capacidade de retenção de água (g de água retida / g de amostra) e índice de solubilidade em água na PC semi-purificada e frações da parede celular de levedura alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial: Relação sólido - líquido (S/L) 2,5 g : 30 mL de água.

Amostra*	C.R.A	I.S.A. (%)
	(g de água / g de amostra)	
Parede celular	4,60 ± 0,15 ^c	1,87 ± 0,015 ^d
Glicoproteína	5,33 ± 0,01 ^c	83,83 ± 0,015 ^a
Mananas	9,83 ± 0,01 ^b	60,15 ± 0,01 ^b
Glicana insolúvel	1,66 ± 0,015 ^d	1,26 ± 0,015 ^d
Glicana solúvel	14,36 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,015 ^d
Glicana + Manana	7,45 ± 0,005 ^b	37,10 ± 0,01 ^c

* Média de três determinações.

Os resultados (média ± desvio padrão de três determinações) seguidos de mesma letra minúscula (coluna) não diferem no nível de 5% (p>0,05), avaliação estatística através do teste de Tukey. C.R.A. = capacidade de retenção de água; I.S.A. = índice de solubilidade em água

A quantidade mínima necessária para formação de géis varia de acordo com a natureza do agente geleificante, sendo necessário que o agente apresente solubilidade para interagir com o solvente, e capacidade de reter água na matriz tridimensional de macromoléculas (ARMSTRONG et al., 1994).

Para a fração glicana insolúvel, foi necessária concentração de 6% para formar gel, e para fração glicana solúvel, a concentração de 3,5% foi suficiente para a geleificação, sendo que nestas concentrações, invertendo-se os tubos, os géis formados não desmanchavam, nem escorriam pelas paredes dos tubos. No entanto, uma vez retirados do tubo, os géis fracos de 3,5% (glicana solúvel) e 4% (glicana insolúvel) não apresentaram consistência suficiente para manterem-se firmes.

Para a PC e as frações, glicoproteína, manana e (glicana + manana), não houve formação de géis em nenhuma das concentrações nas mesmas condições, observando-se uma separação de fases durante o período de transição de prógel-gel, no resfriamento.

Baseado nos resultados obtidos da alta capacidade de retenção de água, onde evidenciou-se a presença marcante de interações do tipo agente geleificante-água, poder-se-ia supor como mecanismos de geleificação da amostra, a imobilização de água por adsorção. Esse mecanismo, contudo, talvez não seja o único responsável pela geleificação, mas provavelmente exerce um efeito predominante, pois as outras amostras da fração parede celular e a própria PC, nas mesmas condições do teste, não formaram géis.

Segundo Sgarbieri (1996), a teoria de adsorção de solvente fundamenta-se na ocorrência de um aumento do volume das moléculas durante o resfriamento que acabam se tocando ou sobrepondo de tal maneira que todo o sistema (solvente/soluto) torna-se imobilizado e rijo. Provavelmente o inchamento e sobreposição das moléculas do agente geleificante tenha viabilizado a formação de uma estrutura ordenada, com ligações intermoleculares que reforçaram a estrutura do gel, durante o resfriamento.

Em géis de isolado protéico de soja (IPS) a 20% de concentração, Furukawa e Otha (1982) observaram também uma correlação positiva da formação de géis com a capacidade de retenção de água.

Nos testes de avaliação de textura foram utilizados géis preparados com 12% e 14% das frações glicana solúvel e insolúvel. Como estas frações apresentaram apenas 6% de proteína, uma capacidade de retenção de água muito grande e uma absorção instantânea, as dispersões a 12% e 14% formavam uma pasta muito espessa, de difícil homogeneização e manipulação para serem colocadas nos tubos de testes. Para contornar essa dificuldade, as dispersões, dentro do bequer, foram aquecidas em banho de água 40°C e desta maneira tornaram-se mais fluidas, permitindo melhor homogeneização e escoamento para dentro dos tubos.

Os parâmetros de textura dos géis formados com 12% e 14% de amostra encontram-se na Tabela 3.3. Os melhores resultados foram observados na fração glicana insolúvel (12% e 14%) que apresentou melhores parâmetros de dureza, ou seja, uma melhor resistência do gel à compressão em uma dada profundidade. Em relação a fraturabilidade foi constatado resultados semelhantes para ambas frações nas concentrações analisadas, demonstrando uma boa resistência a penetração da sonda, devido a consistência firme dos géis formados, refletindo posteriormente na adesividade, ou seja, na aderência do gel à sonda, havendo necessidade de menor esforço para a sonda retornar a posição inicial.

Fiora et al. (1990) observaram a existência de correlação positiva da dureza e fraturabilidade do gel com a capacidade de absorção e retenção de água. Concluíram, no entanto, que embora o mecanismo de geleificação possa estar baseado na imobilização de água por adsorção, existe adicionalmente a formação de uma rede tridimensional através da desnaturação e formação de ligações cruzadas.

Tabela 3.3. Parâmetro de textura para as frações glicana solúvel e insolúvel em diferentes concentrações.

Parâmetro*	GS12%	GS14%	GI 12%	GI 14%
Dureza	17,02 ± 0,34 ^d	28,16 ± 2,86 ^c	34,96 ± 3,24 ^b	45,02 ± 2,46 ^a
Fracturabilidade	2,67 ± 0,96 ^b	3,59 ± 1,33 ^a	3,12 ± 0,62 ^{a,b}	3,96 ± 0,26 ^a
Adesividade	-2,38 ± 1,51 ^c	0,43 ± 0,12 ^b	-4,13 ± 1,76 ^a	-6,19 ± 1,19 ^a

* Média de três determinações.

Os resultados (média ± desvio padrão de três determinações) seguidos de mesma letra minúscula (coluna) não diferem no nível de 5% ($p > 0,05$), avaliação estatística através do teste de Tukey.

GS: glicana solúvel; GI: glicana insolúvel.

Viscosidade. A reologia de uma dispersão de macromoléculas é dependente do seu volume hidrodinâmico, forma e concentração das partículas dispersas e da força de interação entre as partículas. Através de um reômetro adequado, pode-se avaliar a reologia de um sistema, pela análise das curvas de comportamento obtidas das medições experimentais.

Observou-se que a viscosidade monitorada pela variação da curva de viscosidade x tempo (Newport Scientific Pty. Ltd., 1998) na PC e nas frações manana e glicoproteína não apresentaram variações ao longo do tempo. Os maiores índices da curva de viscosidade foram encontrados nas frações glicana solúvel e glicana insolúvel, seguidas da fração glicana + manana, onde podemos observar variações ao longo do tempo (Figura 3.8).

Para sistemas altamente solvatados, ocorre formação de uma estrutura de camadas com imobilização de solvente. Em menores taxas de deformação existe pouco efeito nessa estrutura em camadas e as interações permanecem como agregados de tamanho constante. Entretanto, quando a taxa de deformação aumenta, ocorre uma remoção das camadas solvatadas, reduzindo o tamanho do agregado e conseqüentemente uma redução da viscosidade. Em taxas de deformação elevadas, as camadas de solvatação seriam completamente removidas, resultando uma viscosidade constante (TUNG, 1978).

A variação da viscosidade tanto pode ser correlacionada com a solubilidade quanto com a capacidade de inchamento da amostra em água. Hermansson e

Akesson (1975) observaram uma correlação altamente positiva entre a solubilidade e as propriedades de inchamento da proteína isolada com as propriedades de fluxo. Proteínas solúveis com alta capacidade de inchamento, mostraram que o aumento da viscosidade depende da concentração. No entanto, amostras com baixa solubilidade, mas alta capacidade de inchamento, exibiram alta viscosidade a concentrações relativamente baixas.

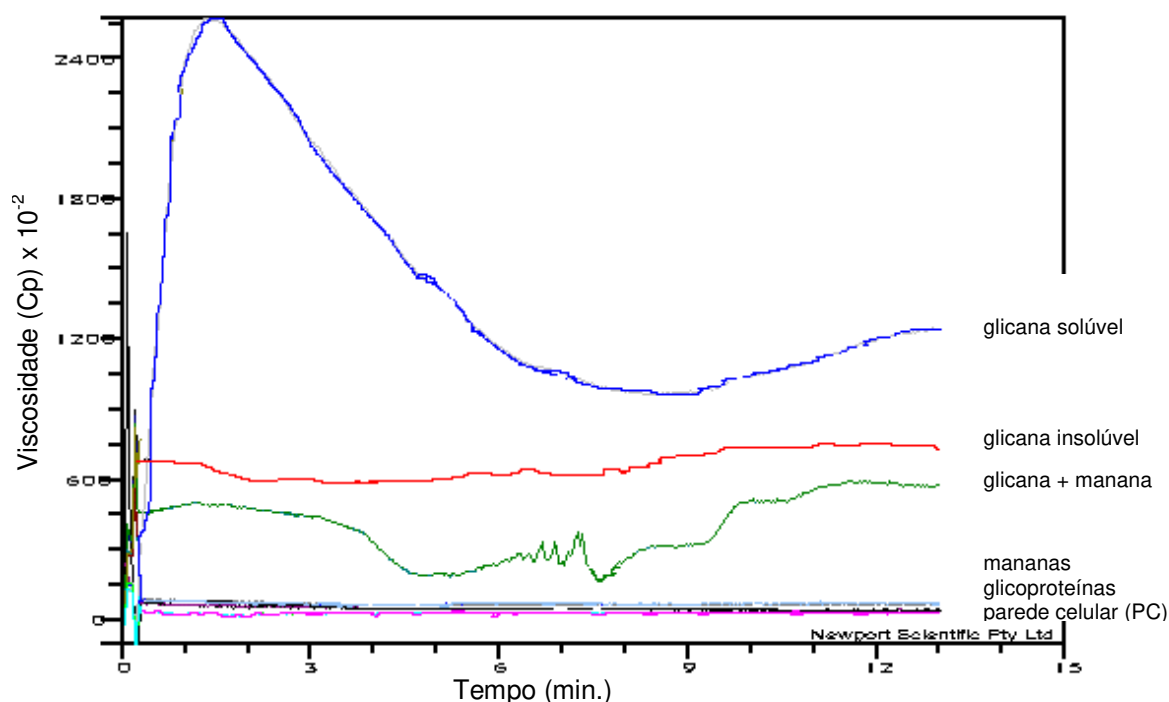


Figura 3.8. Curva de viscosidade gerada pelo *Viscoanalyzer* em função do tempo de aquecimento e da temperatura na PC semi-purificada e frações da parede celular de levedura de fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial.

3.4 CONCLUSÕES

- Vários fatores, como polissacarídeos, lipídios, tipo e composição de aminoácidos que compõe diferentes ingredientes e os vários métodos utilizados para extração e fracionamento podem ter afetado as propriedades funcionais da PC e de suas respectivas frações.

- De um modo geral, a solubilidade da PC e de suas frações não foi influenciada pelo pH.
- Observou-se que, misturas de ovoalbumina (0,2%, 0,4% e 0,6%) à suspensão (0,23%) de PC e de suas frações, resultou em um efeito sinérgico na capacidade de emulsificação, em relação a cada uma das amostras em separado.
- A emulsão preparada com a fração glicana solúvel apresentou maior estabilidade e a glicana insolúvel a menor estabilidade. A estabilidade da emulsão foi favorecida na medida em que se acrescentou ovoalbumina (2%, 0,4% e 0,6%) nas suspensões da PC ou de suas frações.
- Observou-se que a fração glicana solúvel apresentou maior capacidade de reter água (14,36 g de água / g de amostra) porém menor índice de solubilidade em água (0,06%) que as demais frações. A fração glicoproteína apresentou capacidade de retenção de água relativamente baixa (5,33g de água / g de amostra), porém o maior índice de solubilidade em água (83,83%).
- Os melhores resultados de textura dos géis foram observados na fração glicana insolúvel (suspensão a 12% e 14%), que apresentou os melhores parâmetros de dureza.
- Observou-se que a viscosidade monitorada pela variação da temperatura em função do tempo para a PC e para as frações mananas e glicoproteínas não apresentaram variações. O maior índice de viscosidade ao redor de 50°C no aquecimento foi encontrado na fração glicana solúvel. A viscosidade a 95°C e a viscosidade final (50°C) obedeceram a seguinte ordem: glicana solúvel > glicana insolúvel > glicana + manana > manana, glicoproteína e PC.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, J. C.; SAFFLE, R. L. Stability of oil-in-water emulsion. 1. Effects of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 35, n. 6, p. 852-855, 1970.

ANDERSON, R. A.; CONWAY, H. F.; PFEIFER, U. F.; GRIFFIN JR., E. L. Gelatination of corn grits by roll and extrusion cooking. **Cereal Science Today**, St. Paul, Minnesota, v. 14, n. 1, p. 4-7, 11-12, 1969.

ARMSTRONG, H. J.; HILL, S. E.; SCHROOYEN, P.; MITCHEL, J. R. A comparison of the viscoelastic properties of conventional and maillard protein gels. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 25, n. 3, p. 285-298, 1994.

BELEM, M. A.; LEE, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* on Whey: an alternative. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 38, n. 7, p. 565-598, 1998.

BOURNE, M. C. Texture profile analysis. **Food Technology**, Chicago, v. 32, n. 7, p. 62-72, 1978.

CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 6, p. 1420-1425, 1988.

CHOU, D. H.; MORR, C. V. Protein water interactions and functional properties. **Journal of American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 56, n. 1, p. 53a-62a, 1979.

DAGORN-SCAVINER, C.; GUEGUEN, J.; LEFEB-VRE, J. Emulsifying properties of pea globulin as related to their adsorption behaviors. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 2, n. 2, p. 335-341, 1987.

DE KANTEREWICZ, R. J.; PILOSOF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. A simple method for determining oil absorption capacity of protein and the kinetics of oil

uptake. **Journal of American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 66, n. 6, p. 809-812, 1989.

DE KANTERWICZ, R.; ELIZALDE, B. E.; PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Water-oil absorption index (WOAI): a simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 52, n. 5, p. 1381-1383, 1987.

DICKSON, E.; STAINSBY, G. Progress in formulation of food emulsions and foams. **Food Technology**, Chicago, v. 41, n. 9, p. 74-81, 1987.

DZIEZAK, J. D. (Ed.). Yeasts and yeast derivatives: Definitions, characteristics, and processing. **Food Technology**, Chicago, v. 41, n. 2, p. 104-112, 119-120, 1987a.

DZIEZAK, J. D. (Ed.). Yeasts and yeast derivatives: Definitions, characteristics, and processing. **Food Technology**, Chicago, v. 41, p. 122-125, 1987b.

ELIZALDE, B. E.; PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Prescription of emulsion instability from emulsion composition and physicochemical properties of proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 1, p. 116-120, 1991.

FIORA, F. A.; PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Physicochemical properties of soybean proteins related to flow, viscoelastic, mechanical, and water-holding characteristics of gels. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 133-136, 1990.

FLEET, G. H.; MANNERS, D. J. The enzymic degradation of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 98, p. 315-327, 1977.

FURUKAWA, T.; OTHA, S. Mechanical and Water-holding properties of heat-induced soy proteins gels as related to their structural aspects. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 13, n. 1, p. 59-69, 1992.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Composition and structural characteristics of isolated soy proteins from broken and damaged seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.1, p. 148-157, 1993.

HALL, G. M. **Methods of Testing Protein Functionality**. Blackie academic & professional. London, 1996, 265p.

HERMANSSON, A. M.; AKESSON, C. Functional properties of added proteins correlated with properties of meat systems. 2. Effect of salt on water binding properties of model meat systems. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 40, n. 3, p. 603-610, 1975.

KIHLBERG, R. The microbe as a source of food. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.26, p.426-465, 1972.

KINSELLA, J. E. Functional properties in foods; a survey. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 7, n. 3, p. 219-280, 1976.

KOLLAR, R.; STURKIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v. 6, n. 3, p. 225-237, 1992.

LEE, H. O. **Fundamentals of Food Biotechnology**. Ed. V.C.H. Publishers Inc. New York, 1996, 431p.

LEMAN, J.; KINSELLA, J. E. Surface activity, film formation, and emulsifying properties of milk proteins. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 28, n. 2, p. 115-138, 1989.

MACWILLIAM, I. C. The structure, synthesis and functions of the yeast cell wall - A review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 76, n. 6, p. 524-535, 1970.

MARQUES, A.; OETTERER, M.; HORII, J. Caracterização da levedura e seu uso na alimentação. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 89-98, 1998.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985.

NAGODAWITHANA, T. W. Yeast-derived flavor and flavor enhancers and their probable mode of action. **Food Technology**, Chicago, v.46, n.11, p.138-144, 1992.

NEWPORT Scientific Application **Manual for the RapidVisco Analyzer**, Warriewood, 1998.

OTERO, M. A.; VASALLO, M. C.; VERDIEIA, O.; FERNANDEZ, V.; BETANCOURT, D. A process for the complete fractionation of baker's yeast. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, London, v. 67, n. 1, p. 67-71, 1996.

PACHECO, M. T. B. **Propriedades funcionais, nutricionais e toxicológicas de concentrados protéicos de levedura (*Saccharomyces sp.*), obtidos por diferentes processos de extração**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas (SP), 1996, 158 p.

PACHECO, M. T. B.; CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrates. **Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology**, Tokyo, v.43, n.6, p.601-612, 1997.

SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). Proteins: emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 46, n. 1, p. 71-74, 1981.

SCHACHTEL, A. P. Effects of preparative process on the composition and

functional properties of protein preparation from *Candida utilis*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 46, n. 2, p. 377-382, 1981.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996, 517 p.

TORGERSEN, H.; TOLEDO, R. T. Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, n. 6, p. 1615-1620, 1977.

TUNG, M. A. Rheology of protein dispersions. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 9, n. 1, p. 3-31, 1978.

VILELA, E. S. D. **Obtenção e caracterização de derivados da biomassa de levedura (*Saccharomyces* sp.): propriedades nutricionais e funcionais**. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 142 p., 2000.

VUKOVIC, R; HUNDINA-DOM LADO VEC, M.; MRSA, V. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Croatica Chemica Acta**, Zagreb, v. 68, n. 3, p. 597-605, 1995.

WHALEN, P. J.; BASON, M. L.; BOOTH, R. I.; WALKER, C. E.; WILLIAMS, P. J. Measurement of extrusion effects by viscosity profile using the rapid viscoanalyser. **Cereal Foods World**, Saint Paul, v. 42, n. 6, p. 469-475, 1997.

**Propriedades nutritivas e fisiológicas da parede celular (PC)
e de suas frações: ensaio biológico com ratos**

Capítulo 4

Propriedades nutritivas e fisiológicas da parede celular (PC) e de suas frações: ensaio biológico com ratos

RESUMO

As amostras (G+M, GI, GS e M) obtidas pelo fracionamento da levedura residual da fermentação alcoólica foram submetidas a ensaio biológico com ratos Wistar em crescimento com o objetivo de avaliar os aspectos nutricionais, a influência sobre os índices séricos de glicose e lipídios, a produção de ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeias curtas e influência das frações sobre a microbiota intestinal. Os animais que receberam a dieta com a fração glicana mais manana (G + M) ganharam menos peso em relação às outras dietas. A dieta AIN modificada (AIN-M) e a dieta com a fração manana (M) foram as que proporcionaram um maior ganho de peso, seguidas pela dieta AIN padrão (AIN-P) e a dieta com a fração glicana insolúvel (GI). Quanto ao quociente de eficiência da dieta (QED), observou-se que ao longo dos 28 dias a dieta com a fração glicana mais manana (G+M) foi a que apresentou os menores índices. Os maiores índices de digestibilidade aparente (Da) foram observados nas dietas AIN modificada (AIN-M), AIN padrão (AIN-P) e dieta com a fração manana (M). Com exceção da dieta com a fração glicana mais manana (G + M), observou-se efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico em todas as dietas e também um efeito hiperglicêmico com relação ao valor de referência que foi o tempo inicial (T_0). De um modo geral, não houve modificações significativas na microbiota intestinal dos animais em nenhuma das dietas. As quantidades de lipídios totais e colesterol excretadas nas fezes variaram bastante entre as dietas, sendo que a dieta formulada com a fração manana (M) apresentou maior excreção do colesterol. Dentre os ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeias curtas, o ácido acético foi o predominante, seguido do propiônico e do butírico, em todas as dietas estudadas. O ácido acético aumentou de concentração em função do tempo, em todas as

dietas. O ácido propiônico aumentou consideravelmente em todas as dietas no intervalo do tempo inicial (T_0) a 14 dias (T_{14}), com tendência de estabilização a partir de 14 dias(T_{14}) até 28 dias (T_{28}). O ácido butírico mostrou uma tendência contínua de aumento em todas as dietas, atingido um máximo na faixa de 0,55 a 0,58 mg/g de conteúdo intestinal (cólon, cecum reto) nas dietas AIN modificadas (AIN-M), dieta com a fração glicana mais manana (G + M), dieta com a fração glicana insolúvel (GI) e dieta com a fração manana (M) e de 0,46 mg/g de conteúdo intestinal (cólon, cecum, reto) na dieta AIN padrão (AIN-P). As concentrações de ácido butírico nas dietas contendo manana e glicana foram significativamente superiores aos das dietas padrões (AIN-P) e AIN modificada (AIN-M).

4.1 INTRODUÇÃO

A levedura, subproduto da produção de álcool por via fermentativa, é normalmente descartada ou usada somente como ração animal. A fim de fazer melhor uso destas leveduras e diminuir a poluição ambiental, tem sido conduzido estudos para extração e recuperação deste subproduto da produção de álcool (SALGADO; SARRUGE, 1976; BENASSI et al., 1990; FILHO et al., 1996).

O uso de levedura íntegra em processamento de alimentos é geralmente limitado devido ao odor e sabor indesejáveis da levedura seca (HALÁSZ; LÁSZTITY, 1991). No entanto, o fracionamento da levedura produz derivados que podem ser adicionados em alimentos. Alguns desses derivados seriam o autolisado, obtido pelo processamento de autólise da célula; o extrato de levedura e parede celular, obtidos pelo fracionamento do autolisado em fração solúvel (extrato) e insolúvel (parede celular) e o concentrado protéico.

Os principais componentes da parede celular da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) têm sido isolados e purificados com algumas de suas propriedades nutricionais estudadas (KOLLAR et al., 1992; ASSIS, 1996). A fração referente à parede celular integral da levedura é composta de polissacarídeos que podem

servir como fonte de fibra dietética e serem considerados como agentes hipocolesterolêmicos (ABREU; MILLÁN, 1994; ROSE, 1993).

Estudos experimentais e epidemiológicos mostraram que as fibras apresentam entre outras a propriedade de atuar como um regulador intestinal, com efeito laxante. As fibras também apresentam propriedades que ajudam no tratamento de doenças como diabetes e hipercolesterolemia, e por estas características atuam na prevenção de doenças coronárias e câncer de cólon (SLAVIN, 1987). A eficiência das fibras não depende somente da quantidade de fibras ingeridas, mas também da natureza da fibra e do grau de refino na preparação dos alimentos (FRANCO, 1992). No combate à hipercolesterolemia, é importante não apenas o tipo de fibra, mas também os níveis de colesterol dos pacientes (BELL et al., 1989).

A glicana incorporada na dieta hipercolesterolêmica de ratos baixou rapidamente e de forma significativa os níveis de colesterol sérico, podendo ser considerada um agente hipocolesterolêmico (ROBBINS; SEELEY, 1977).

Na área médica a β -glicana isolada de *Saccharomyces cerevisiae* tem sido referida como apresentando propriedades imunoestimulantes. Essa glicana pertence à classe das drogas conhecidas como Modificadoras da Resposta Biológica (*Biological Response Modifiers* – BRMs), com efeito benéfico em uma variedade de patologias experimentais causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas. Além disso, atua como modificadora da supressão imunológica e também de doenças neoplásicas em nível experimental (WILLIAMS et al., 1991).

As fibras apresentam grande importância na alimentação e na manutenção da saúde. Por isso, faz-se necessário avaliar e pesquisar mais sobre este componente alimentar e suas interações com outros componentes na dieta em nível metabólico. Tendo em vista que a parede celular é composta por carboidratos que auxiliam na redução do colesterol, é de interesse deste trabalho estudar a eficiência das frações obtidas (G+M, GI, GS e M) no fracionamento da parede celular (PC) proveniente do processo industrial de produção de etanol, como fonte de fibra. Na tentativa de elucidar estes efeitos da fibra contida na parede celular (PC), o presente trabalho teve como objetivos: avaliar os aspectos

nutricionais, influências sobre os índices séricos de glicose e lipídios, produção de ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeias curtas e influência das frações sobre a microbiota intestinal.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material

O material utilizado para o ensaio biológico com ratos foram os mesmos preparados e caracterizados no capítulo 2, sub-itens (2.2.1 e 2.2.2).

4.2.2 Métodos

- **Animais experimentais**

Foram utilizados para o estudo ratos machos Wistar adquiridos do Centro de Bioterismo da UNICAMP, com idade de 21 dias, os quais foram inicialmente pesados e separados em grupos. Cada grupo continha 8 animais que foram sacrificados nos tempos T_{14} (8 de cada tratamento) e T_{28} (8 de cada tratamento).

Para a realização do ensaio foram selecionados 104 animais, sendo que 8 animais foram sacrificados no início do experimento, após jejum de 16 horas, para coleta de sangue por punção cardíaca. Seu soro foi analisado e os valores considerados como de referência. Os demais foram distribuídos em seis grupos de 16 animais ($T_{14} \rightarrow 8$ animais de cada tratamento foram sacrificados e $T_{28} \rightarrow 8$ animais de cada tratamento sacrificados), permanecendo por 28 dias nas dietas.

- **Avaliação biológica com ratos**

Os ensaios biológicos tiveram duração de 28 dias e as dietas foram elaboradas seguindo-se as recomendações da AIN-93G (REEVES et al., 1993) com algumas modificações, descritas a seguir.

- **Preparação das dietas**

Para o ensaio biológico foram elaboradas as seguintes dietas: 1. Dieta controle com 17% de caseína e 5% de celulose (AIN-P); 2. Dieta controle (AIN-M) modificada com 10% de celulose comercial e adicionada de 1% colesterol e 10% de gordura de coco; 3. Dieta com 10% da fração G+M no lugar da celulose comercial e adicionada de 1% de colesterol e 10% de gordura de coco; 4. Dieta com 10% da fração GI no lugar da celulose comercial e adicionada de 1% de colesterol e 10% de gordura de coco; 5. Dieta contendo 10% da fração GS no lugar da celulose comercial e adicionada de 1% de colesterol e 10% de gordura de coco; 6. Dieta com 10% manana (M) e adicionada de 1% de colesterol e 10% de gordura de coco.

As dietas foram preparadas variando-se apenas os componentes mencionados. Os outros nutrientes, ajustados de acordo com a dieta controle (AIN-93G) utilizando a caseína como fonte protéica em 17% (p/p). A gordura de coco contém grande percentagem de ácidos graxos saturados e é freqüentemente usada em dietas experimentais semipurificadas (MILLÁN; ABREU, 1996) com o objetivo de promover hipercolesterolemia. A Tabela 4.1 mostra a composição dessas dietas, as Tabelas 4.2 e 4.3 apresentam, respectivamente, a composição das misturas mineral e vitamínica acrescentadas às dietas e a Figura 4.1 mostra as dietas utilizadas no ensaio biológico (AIN-P; AIN-M; G+M; GI; GS e M).

Tabela 4.1. Composição da dieta controle (AIN-P) e das dietas hipercolesterolêmicas suplementadas com diferentes amostras de fibras (mananas, glicana solúvel, glicana insolúvel e glicana + manana) utilizadas no ensaio biológico (g/kg dieta).

Componentes	AIN-P	AIN-M	Tratamentos*			
			M	GI	GS	G+M
Amido	404,3	264,33	258,00	259,5	247,63	265,60
Fonte protéica	207,2	207,2	199,00	198,33	197,45	169,86
Amido dextrinizado	132,00	132,00	132,00	132,00	132,00	132,0
Sacarose	93,83	93,83	94,07	94,09	96,10	94,94
Óleo de soja	66,57	46,57	45,33	46,00	45,01	41,88
Colesterol (1%)	---	10,00	10,00	10,00	10,00	10,0
Gordura de coco (10%)	---	100,00	100,00	100,00	100,00	100,0
Fibra	50,0	100,00	119,2	118,5	130,92	143,51
Mist. Mineral	30,55	30,55	27,05	26,05	25,38	26,73
Mist. Vitamínica	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,0
L-cistina	3,00	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,50	2,50	2,50	2,5	2,5	2,5
T. Butilhidroquinona	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014

* Dietas contendo fibras das frações da parede celular; M: manana; GI: glicana insolúvel; GS: glicana solúvel; G+M: glicana + manana.

Tabela 4.2. Mistura Mineral (AIN-93G-MX) que supre as concentrações recomendadas de elementos para a dieta AIN-93G.

Componentes	Quantidades
<u>Elementos minerais essenciais:</u>	g/kg mistura
Carbonato de cálcio anidro - 40,04% de Ca	357,00
Fosfato de potássio monobásico - 22,76% de P, 28,76% de K	196,00
Citrato de potássio, tripotássio monoidratado - 36,16 de K	70,78
Cloreto de sódio - 39,34% de Na, 60,66% de CL	74,00
Sulfato de potássio - 44,87% de K, 18,39% de S	46,60
Óxido de magnésio - 60,32% de Mg	24,00
Citrato férrico - 16,5% de Fe	6,06
Carbonato de zinco - 52,14% de Zn	1,65
Carbonato manganoso - 47,79% de Mn	0,63
Carbonato cúprico - 57,47% de Cu	0,30
Iodato de potássio - 59,3% de I	0,01
Selenato de sódio anidro - 41,79% de Se	0,01025
Paramolibdato de amônio, 4H ₂ O - 54,31% de Mo	0,00795
<u>Elementos minerais potencialmente benéficos:</u>	
Meta-silicato de sódio, 9 hidrato, 9,88% de Si	1,45
Sulfato de cromo e potássio, 12 H ₂ O - 10,42% de Cr	0,275
Cloreto de lítio - 16,38% de Li	0,0174
Ácido bórico - 17,5% de B	0,0815
Fluoreto de sódio - 45,24% de F	0,0635
Carbonato de níquel - 45% de Ni	0,0318
Vanadato de amônio - 43,55% de V	0,0066
Sacarose (q.s.p.)	221,026

Fonte: REEVES *et al.* (1993)

Tabela 4.3. Mistura vitamínica (AIN-93-VX) que supre as concentrações recomendadas de vitaminas para as dietas AIN-93G.

Componentes	Quantidades g/kg mistura
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de Ca	1,600
Prididoxina - HCL	0,700
Iamina - HCL	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
D-Biotina	0,020
Vitamina B12 (cianocobalamina) - 0,1% de manitol	2,500
Vitamina E (acetato de tocoferol) - 500 UI/g	15,000
Vitamina A (retinil palmitato) - 500.000 UI/g	0,800
Vitamina D3 (colecalfiferol) - 400.000 UI/g	0,250
Vitamina K	0,075
Sacarose (q.s.p.)	974,655

Fonte: REEVES *et al.* (1993)



Figura 4.1. Fotografia das dietas utilizadas no ensaio biológico:
1: AIN-P; 2: AIN-M; 3: G+M; 4: GI; 5:GS; 6: M.

• Protocolo experimental

Foram realizados 6 tratamentos, onde 8 ratos de cada tratamento foram sacrificados nos tempos iniciais (T_0), 14 dias (T_{14}) e 28 dias (T_{28}) para as seguintes determinações:

tempo inicial (T_0) → peso corporal (p_1) de todos os ratos. Foram sacrificados 8 ratos recém desmamados para: coleta de sangue (soro) para as seguintes análises: glicose, colesterol, triacilglicerol, lipídios totais. Avaliação da microflora do conteúdo intestinal de 3 ratos e extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta no conteúdo intestinal de 3 ratos tomados aleatoriamente.

tempo inicial (T_0) a 7 dias (T_7) → nos ratos de cada tratamento foram realizadas coleta de fezes, peso corporal no 7º dia (p_2).

7 dias (T_7) a 14 dias (T_{14}) → nos ratos de cada tratamento foram realizadas coleta de fezes, peso corporal no 14º dia (p_3). Foram sacrificados 8 ratos de cada tratamento para coleta de sangue (soro) para as análises: glicose, colesterol, triacilglicerol, lipídios totais. Avaliação da microflora do conteúdo intestinal de 3 ratos e extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta no conteúdo intestinal de 3 ratos tomados aleatoriamente.

14 dias (T_{14}) a 21 dias (T_{21}) → nos ratos de cada tratamento foram realizadas coleta de fezes, peso corporal no 21º dia (p_4).

21 dias (T_{21}) a 28 dias (T_{28}) → nos ratos de cada tratamento foram realizadas coletas de fezes, peso corporal no 28º dia (p_5). Foram sacrificados 8 ratos de cada tratamento para coleta de sangue (soro) para as análises: glicose, colesterol, triacilglicerol, lipídios totais. Avaliação da microflora do conteúdo intestinal de 3 ratos e extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta no conteúdo intestinal de 3 ratos tomados aleatoriamente.

- **Acompanhamento nutricional**

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, onde receberam as dietas experimentais e água "ad libitum". Durante o ensaio, a temperatura do laboratório foi mantida em $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo que a iluminação foi controlada em períodos alternados de luz e obscuridade de 12 h. Concomitantemente foram realizadas pesagens dos animais nos tempos T_0 a T_7 e nos tempos T_{14} a T_{28} para acompanhamento da evolução do crescimento.

As fezes foram cuidadosamente coletadas, separando-as de possíveis contaminantes (partículas de alimentos, pelos, etc.) secas em estufa à temperatura (105°C) para moagem posterior e análises.

- **Avaliações nutricionais: influência das frações**

Digestibilidade aparente. Representa a percentagem das proteínas da dieta que são hidrolisadas pelas enzimas gastrointestinais e que são absorvidas como compostos nitrogenados. O seu cálculo pode ser representado pela seguinte expressão:

$$Da = \frac{NI - NF}{NI} \times 100$$

onde: Da = Digestibilidade aparente

NI = Nitrogênio ingerido

NF = Nitrogênio fecal

Quociente de Eficiência da Dieta. Foi usado para estimar a eficiência da dieta, como um todo. A expressão utilizada no cálculo foi a seguinte:

$$QED = \frac{GP(g)}{DC(g)}$$

onde: QED = Quociente de eficiência da dieta

GP = Ganho de peso (g)

DC = Dieta consumida (g)

- **Determinações químicas do material biológico recolhido**

Nitrogênio total. O nitrogênio total das fezes dos grupos experimentais de ratos foi determinado pelo método Kjeldahl, segundo AOAC (1998). Utilizou-se o sulfato de potássio, sulfato de cobre e dióxido de titânio como catalisadores (WILLIAMS, 1973). A proteína bruta foi calculada pelo produto entre a percentagem de nitrogênio e o fator de conversão 6,25.

Determinação de lipídios totais nas fezes. Foi realizada segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985). Pesaram-se 5 g de amostra, juntadas

a 100 mL de água e 60 mL de ácido clorídrico p.a. Esta mistura foi colocada em uma chapa elétrica, sendo o béquer (500 mL) coberto com vidro de relógio e colocado 3 pérolas de vidro, quando atingido a ebulição foi marcado 30 minutos. A amostra foi deixada $\pm$ 20 minutos em temperatura ambiente para esfriar, em seguida foi filtrada em papel filtro duplo comum, lavando-se o papel filtro com água destilada até ausência de cloreto no filtrado. O funil juntamente com o papel filtro foi colocado em um béquer, em uma bandeja e levado para secar por 2 horas a $\pm$ 70°C. O papel filtro após 2 horas a $\pm$ 70°C foi dobrado em forma de cartucho e colocado no extrator de Soxhlet, juntamente com um balão de fundo chato tarado contendo 80 mL de éter de petróleo, por 6 a 8 horas para extração dos lipídios. Foi evaporado o éter de petróleo e o resíduo de óleo que sobrou no balão foi pesado.

O cálculo de lipídios totais foi feito pela seguinte expressão:

$$\% \text{ de lipídios totais} = \frac{(\text{peso balão} + \text{matéria graxa}) - \text{tara do balão}}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

Determinação de colesterol nas fezes. A determinação de colesterol nas fezes foi realizada segundo a metodologia descrita por Jiang et al. (1991), com algumas modificações.

Pesou-se 0,25 $\pm$ 0,01g de amostra em um tubo de ensaio de 70 mL com tampa rosqueável, adicionaram-se 5 mL de KOH 2% em etanol absoluto, deixou-se em banho maria a 50°C durante 2 horas com agitação. Adicionaram-se 5 mL de H₂O destilada, deixando-se em repouso até resfriar. Adicionaram-se 10 mL de hexano e agitou-se por 1 minuto. Esperou-se separar as fases e transferiu-se 5 mL do hexano (fase superior) para um tubo de ensaio de 15 mL com tampa rosqueável. Secou-se completamente em banho maria na presença de N₂ a 40°C. Guardou-se em freezer até o momento de ser injetado no cromatógrafo gasoso.

A amostra seca foi diluída em um volume adequado de solução de padrão interno em isopropanol (3 a 30 μ L), de modo que a concentração de colesterol ficasse dentro da curva de calibração. Injetou-se no cromatógrafo gasoso (1 μ L). Padrão interno: 5 α -colestano 100 μ g/mL em isopropanol. A quantificação foi

feita utilizando-se uma curva de calibração com padronização interna. Concentração do colesterol na curva: 12 a 160 µg/mL.

Condições cromatográficas: a) coluna: DB5, 30 m, 0,25 mm d.i.; 0,25 µm de filme; b) temperaturas: coluna - 160°C/2 min. – 160 a 300 (8°C/min.) – 300°C/20 min., injetor – 270°C, detector - 300°C; c) pressão na coluna: 12 psi (300°C); d) Make up (N₂): 30 mL/min.; e) hidrogênio: 30 mL/min.; f) ar sintético: 300 mL/min.; g) split: 1:50; h) volume injetado: 1 µL.

- **Determinação dos índices séricos de glicose e lipídios**

Índices séricos. O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca, no início e no final do experimento, após jejum de 16 horas. As amostras de sangue individuais foram deixadas em banho-maria a 37° C por 30 minutos e a seguir centrifugadas a 2.500 rpm/15 minutos. Foram recolhidos os soros sobrenadante, para as análises bioquímicas: colesterol total, triacilgliceróis, lipídios totais e glicose, dosados através de "kits" comerciais.

Determinação de colesterol total. O método baseia-se na desesterificação enzimática, pela colesterol esterase, a oxidação do colesterol livre pela colesterol oxidase, com formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O H₂O₂ reage com o reagente fenol-4-aminoantipirina produzindo, pela ação da peroxidase, o cromóforo antipirilquinonimina, cuja cor vermelha absorve a 500 nm. A determinação se baseia na reação de Lieberman-Buchard e o método foi descrito por Huang et al. (1961). Utilizou-se Kit Labtest (Labcenter, Campinas, SP).

Determinação de triacilgliceróis. Foi utilizado o método de Bucolo e David (1973). Os triacilgliceróis foram extraídos com uma mistura de varsol, isopropanol e ácido sulfúrico, havendo separação em fases, com recuperação quantitativa dos triacilgliceróis na fase não-polar (superior), juntamente com as proteínas. Os triacilgliceróis extraídos são saponificados a glicerol e ácidos graxos. O glicerol é oxidado a formaldeído, que forma um complexo (dihidrolutidina, amarelo), através da reação de Hantzsch. Utilizou-se Kit Labtest (Labcenter, Campinas, SP).

Determinação de lipídios totais. Foram determinados pelo método de Frings e Dunn (1970). Os lipídios séricos, incluindo os ácidos graxos insaturados livres e esterificados e o colesterol livre e seus ésteres, reagem com a vanilina em ácido fosfórico, primeiramente reagindo com ácido sulfúrico aquecido. O cromóforo rosa violáceo assim obtido é lido espectrofotometricamente em 530 nm e é proporcional à concentração dos lipídios totais da amostra; utilizou-se Kit CELM (Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, SP).

Determinação de glicose sérica. Foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico (GOD-POD), segundo Lott e Turner (1975). Foram coletados 20 µL de amostra e posteriormente foram adicionados 2 mL de reativo de trabalho. A amostra foi incubada por 10 minutos em banho maria a 37° C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm, utilizou-se Kit CELM (Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, SP).

- **Influência das frações sobre a microbiota intestinal e produção de ácidos graxos voláteis (ACV) de cadeias curtas**

Contagem e classificação da microflora intestinal. A coleta do conteúdo intestinal (cólon, cecum e reto) foi realizada utilizando-se pinças e tesouras estéreis. O material foi recolhido em placas de Petri estéreis e encaminhado imediatamente ao laboratório de Microbiologia do ITAL (não ultrapassando 8 horas após a coleta). Foram utilizadas jarras de anaerobiose contendo o Kit Anaerobac (Probac do Brasil) para o transporte das amostras, o que garantiu a atmosfera anaeróbica. Foram pesadas 1,0 g do conteúdo intestinal (cólon, cecum e reto) e transferidos assepticamente, com espátula estéril, para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de diluente, conforme metodologia de Tanaka e Mutai (1980). Foram realizadas em seguida as diluições decimais necessárias e o plaqueamento em superfície (0,1 mL) nos meios específicos para cada microrganismo.

- **Contagem total de anaeróbios** - Meio de caldo de carne e levedura 0,2% Glicose (MVL-G) (Tanaka; Mutai, 1980), incubação a 37°C/48 h em jarro anaeróbio, utilizando sistema comercial de geração de

atmosfera anaeróbica (GasPak Anaerobic System BBL 70304, Gas Generating Kit Oxoid BR 38, Anaerocult A Merck 13829).

- **Contagem de bifidobactérias** - Meio 25 para Bifidobactérias (BIM-25) (Munoa; Pares, 1988; Gibson; Wang, 1994), incubação a 37°C/72 h em jarro anaeróbio, utilizando sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbia (GasPak Anaerobic System BBL 70304, Gas Generating Kit Oxoid BR 38, Anaerocult A Merck 13829).
- **Contagem de lactobacilos** - LBS Agar (Rogosa SL Agar) (BBL 11327, DIFCO 0480, Merck 5413, OXOID CM 627) (Yoshioka et al., 1983), incubação a 37°C/48 h.
- **Contagem de bacteróides** - Meio de caldo de carne e levedura 0,2% Glucose (MVL-G) (Tanaka; Mutai, 1980) suplementado com 7,5 µg/mL de vancomicina e 5 µg/mL de gentamicina (YOSHIOKA et al., 1983), incubação a 37°C/48 h em jarro anaeróbio, utilizando sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbica (GasPak Anaerobic System BBL 70304, Gas Generating Kit Oxoid BR 38, Anaerocult A Merck 13829).
- **Contagem de clostrídios** - Meio reforçado para Clostrídio (RMC) (DIFCO 1808, Merck 5411, BBL 11566, Oxoid CM 149), incubação a 37°C/48 h em jarro anaeróbio, utilizando sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbica (GasPak Anaerobic System BBL 70304, Gas Generating Kit Oxoid BR 38, Anaerocult A Merck 13829).
- **Contagem de enterobactérias** - Desoxicolato Sulfeto de Hidrogênio Lactose (DHL) Agar (Merck 11435) (YOSHIOKA et al., 1983), incubação a 37°C/24h.
- **Contagem de enterococos** - KF *streptococcus* Agar (DIFCO 0496, Merck 10707, BBL 11313, OXOID CM 701) (YOSHIOKA et al., 1983), incubação a 37°C/48 h.

- **Extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta no conteúdo intestinal**

A extração dos ácidos graxos foi feita a partir do conteúdo do cecum, cólon e reto. O material cuidadosamente coletado foi tratado com etanol (40% v/v) mais formaldeído (1% v/v) e homogeneizado. O homogenado foi submetido à centrifugação (20.000 x g, 15 min.). O volume do sobrenadante foi medido e estocado em refrigerador ou congelador até a análise (SPILLER et al., 1980). A quantificação dos ácidos graxos de cadeias curtas (acético, propiônico e butírico) foi feita pelo método de Cochrane (1975) com algumas modificações. Utilizou-se um cromatógrafo VARIAN 3700, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna Megabore (AT-WAX, 30 metros de comprimento, diâmetro interno 0,53 mm, espessura de filme 2,50 μ m). Todos os resultados da análise cromatográfica foram expressos em gramas de conteúdo intestinal (base úmida).

Condições da análise: temperatura da coluna - isotérmica 120°C, após 8 minutos 220°C por 10 minutos (para limpeza da coluna); Temperatura do injetor - 150°C; Temperatura do detector - 230°C; Vazões - coluna: 30 μ L por minuto (H_2); injetor: split 30 mL por minuto; detector: H_2 , 30 mL por minuto (H_2 da coluna). Ar 300 mL por minuto. Make-up - 30 mL por minuto (N_2). Sensibilidade do detector: 10^{-12} (A/mv).

Antes de cada injeção de amostra, foi injetado 1 μ L de ácido fórmico (98%) para evitar o aparecimento de picos fantasmas, após 2 minutos foi injetada 1 μ L de amostra. Foram usados padrões para identificação, com base nos tempos de retenção.

As Figuras 4.2 e 4.3 mostram os segmentos intestinais (cecum, cólon e reto) extraídos dos animais que foram alimentados com as dietas: AIN-P, AIN-M, G+M, GI, GS e M. A Figura 4.2 mostra os segmentos (cecum, cólon e reto) dos animais sacrificados no T_{14} e a Figura 4.3 mostra os mesmos segmentos (cecum, cólon e reto) dos animais sacrificados no T_{28} .

Ao longo dos 28 dias, os animais alimentados com a dieta GS apresentaram muita diarreia, estavam visivelmente fracos e vieram a morrer,

impossibilitando assim, a extração do conteúdo intestinal (cecum, cólon e reto) desses animais no T28 (Figura 4.3).

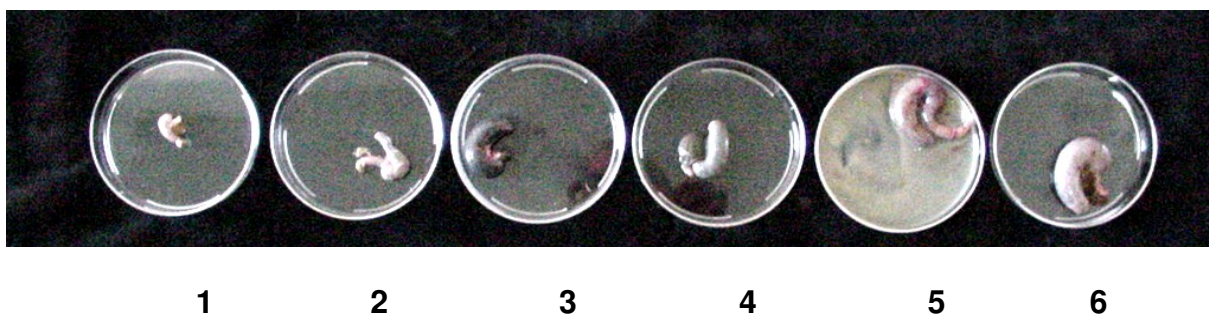


Figura 4.2. Fotografia da porção do intestino grosso do qual foi extraído o conteúdo intestinal para análise no T14 (cecum, cólon e reto) das dietas: 1: AIN-P; 2: AIN-M; 3: G+M; 4: GI; 5: GS; 6: M.

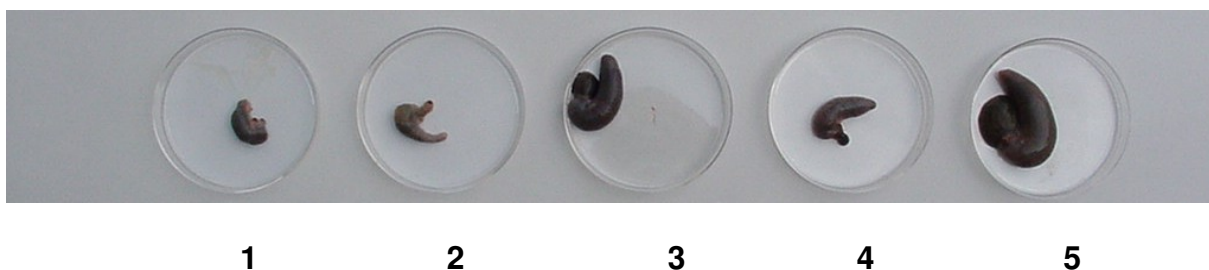


Figura 4.3. - Fotografia da porção do intestino grosso do qual foi extraído o conteúdo intestinal para análise no T28 (cecum, cólon e reto) das dietas: 1: AIN-P; 2: AIN-M; 3: G+M; 4: GI; 5: M.

- **Análise estatística**

Os resultados experimentais foram comparados utilizando a média e desvios padrão pelo método ANOVA e teste de Tukey para determinação da diferença estatística entre médias, com probabilidade mínima de erro de 5% ($p < 0,05$).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação nutricional. Os animais que foram alimentados com a dieta contendo 10% da fração glicana solúvel (GS) no lugar da celulose comercial, adicionada de 1% de colesterol e 10% de gordura de coco apresentaram muita

diarréia, estavam visivelmente fracos e todos (16 animais) morreram ao longo dos 28 dias (T₂₈). Supõe-se que tal fato tenha ocorrido devido a algum reagente contaminante que foi utilizado durante o preparo da fração glicana solúvel, porém não é possível identificar, neste estágio, qual possa ter sido o composto responsável. Somente um estudo mais aprofundado é que poderá esclarecer o fato ocorrido.

Curvas de crescimento. Notou-se que os animais submetidos aos vários tratamentos inicialmente ganharam peso no mesmo ritmo. Entre 21 e 28 dias observou-se que os grupos apresentaram um ritmo mais lento no ganho de peso, isto pode ter ocorrido em função da maior idade dos animais. Observou-se que as dietas: controle AIN-P; a dieta controle AIN-M (10% celulose comercial) e dieta contendo M, mostraram-se ligeiramente superiores às demais. As dietas com frações GI e por último a dieta contendo fração G+M que foi a que promoveu crescimento inferior a todas as demais dietas.

Os valores relativos à curva de crescimento encontram-se na Tabela 4.4 e na Figura 4.4.

Tabela 4.4. Ganho cumulativo de peso em gramas de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, 28 dias.

TRATAMENTOS (fonte de fibras)	GANHO DE PESO (G)				
	T0	T7	T14	T21	T28
AIN-P	100,24±10,61 ^{dA}	144,84±12,14 ^{cA}	194,44±12,14 ^{bA}	238,46±19,65 ^{aA}	253,74±27,45 ^{aA}
AIN-M	100,48±10,42 ^{eA}	144,50±12,89 ^{dA}	192,70±15,58 ^{cA}	238,78±16,85 ^{bA}	261,56±17,64 ^{aA}
G+M	99,14±8,75 ^{dA}	136,39±8,02 ^{cA}	175,52±8,22 ^{bA}	207,06±10,18 ^{aB}	211,49±11,15 ^{aB}
GI	98,57±8,50 ^{dA}	141,77±8,25 ^{cA}	188,35±9,19 ^{bA}	230,14±12,01 ^{aAB}	237,66±12,16 ^{aAB}
M	95,99±8,35 ^{dA}	140,06±6,46 ^{cA}	187,80±15,79 ^{bA}	237,05±19,64 ^{aA}	253,29±23,29 ^{aA}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: controle (**AIN-M**) → 10% celulose comercial; **G+M** → 10% glicana + manana; **GI** → 10% glicana insolúvel; **M** → 10% manana.
- Os resultados (médias ± desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% (p > 0,05).
- Os resultados (médias ± desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% (p > 0,05).
- T0, T7, T14, T21 e T28 → duração do ensaio biológico (dias): tempo inicial (T0), 7 dias (T7), 14 dias (T14), 21 dias (T21) e 28 dias (T28).

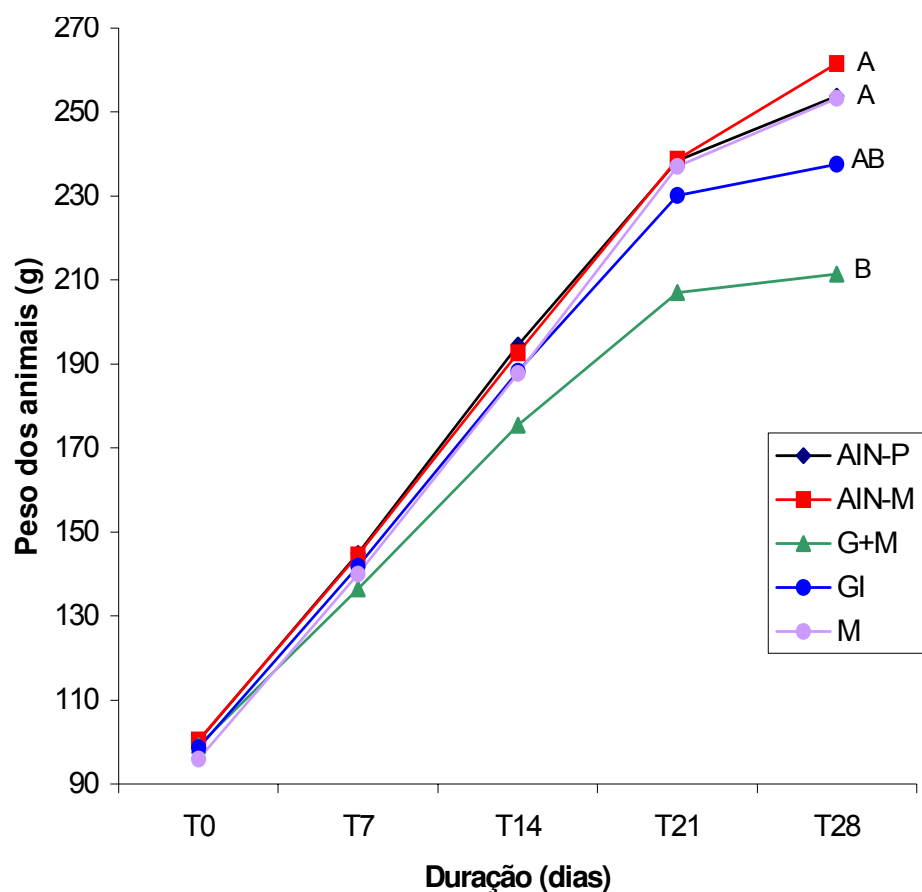


Figura 4.4. Curva de ganho de peso (g) (média $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta), para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 17% de proteína (caseína): **AIN-P** $\rightarrow$ dieta padrão AIN-93G; dietas modificadas: controle (**AIN-M**) $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.

- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).

Ganho de peso (GP) aos 28 dias. Ao final de 28 dias, os animais que receberam a dieta G+M ganharam menos peso em relação às outras dietas (Figura 4.5). As outras dietas não diferiram estatisticamente em relação ao ganho de peso. As dietas controle AIN-M e M foram as que proporcionaram um maior ganho de peso, seguidas pelas dietas AIN-P e GI.

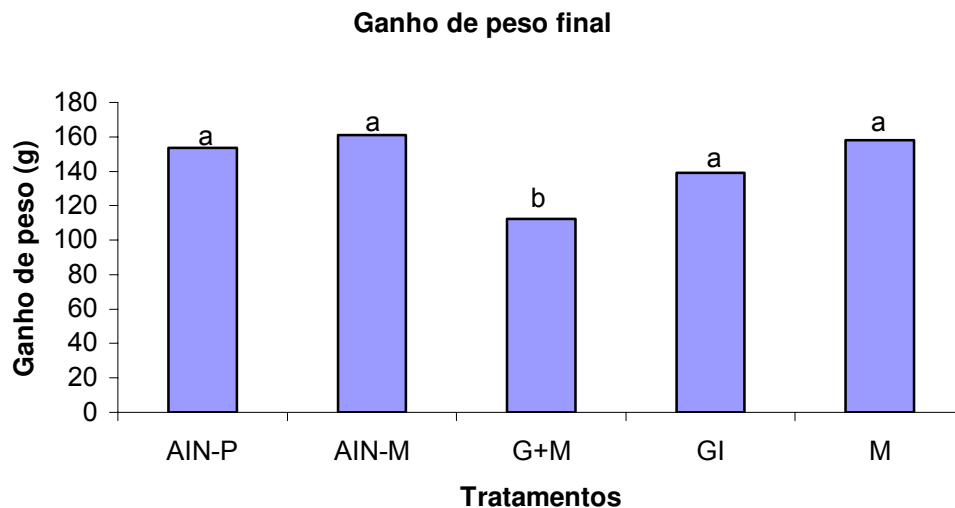


Figura 4.5. Valores médios de ganho de peso final (g) (média $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta), para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 17% de proteína (caseína): **AIN-P** $\rightarrow$ dieta padrão AIN-93G; dietas modificadas: **Controle (AIN-M)** $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.

- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).

Consumo de dieta. Verificou-se que os animais alimentados com a dieta G+M apresentaram menor consumo não diferindo estatisticamente quando comparado a dieta GI. Conseqüentemente, o ganho de peso dos animais alimentados com a dieta G+M foi também significativamente menor (Figura 4.5), demonstrando talvez a propriedade da fração glicana + manana (G+M) de promover saciedade, resultando em perda de apetite, promovendo baixo consumo da dieta e do ganho de peso. Os animais em dietas AIN-P, AIN-M e M foram os que consumiram maior quantidade de dieta em relação às demais durante todo o experimento (Tabela 4.5).

Frias (1996) trabalhou com fibras (goma guar e celulose) em ratos e observou que as dietas contendo celulose (10% e 20%) tiveram maior consumo quando comparadas com as dietas contendo goma guar, mas também não alterou o ganho de peso dos animais.

Tabela 4.5. Consumo de dieta (g) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0-7, 7-14, 14-21, e 21-28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Consumo de dieta (g)			
	T0-T7	T17-T14	T14-T21	T21-T28
AIN-P	111,25±10,41 ^{cB}	156,31±11,58 ^{aA}	137,74±13,73 ^{bA}	131,46±16,55 ^{bA}
AIN-M	108,75±8,55 ^{cBC}	148,78±7,20 ^{aA}	126,88±14,71 ^{bA}	132,22±11,35 ^{bA}
G+M	91,11±7,26 ^{bD}	125,97±7,39 ^{aB}	93,69±6,48 ^{bB}	95,90±8,93 ^{bB}
GI	97,10±7,65 ^{bCD}	136,01±6,53 ^{aB}	102,91±8,24 ^{bB}	106,53±6,07 ^{bB}
M	126,86±7,89 ^{aA}	105,36±10,56 ^{bC}	124,75±7,80 ^{aA}	129,92±9,41 ^{aA}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: controle (**AIN-M**) → 10% celulose comercial; **G+M** → 10% glicana + manana; **GI** → 10% glicana insolúvel; **M** → 10% manana.
- Os resultados (médias ± desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias ± desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T₀-T₇, T₇-T₁₄ e T₂₁-T₂₈ → duração do ensaio biológico (dias): tempo inicial (T₀), 7 dias (T₇), 14 dias (T₁₄), 21 dias (T₂₁) e 28 dias (T₂₈).

Consumo total de dieta (g) aos 28 dias. Ao final de 28 dias, os animais que receberam dietas G+M e GI consumiram menor quantidade de dietas (Figura 4.6). As outras dietas praticamente apresentaram resultados similares em relação ao consumo, não diferindo estatisticamente. As dietas AIN-M e AIN-P foram as que proporcionaram um maior consumo de dieta, não diferindo estatisticamente da dieta M.

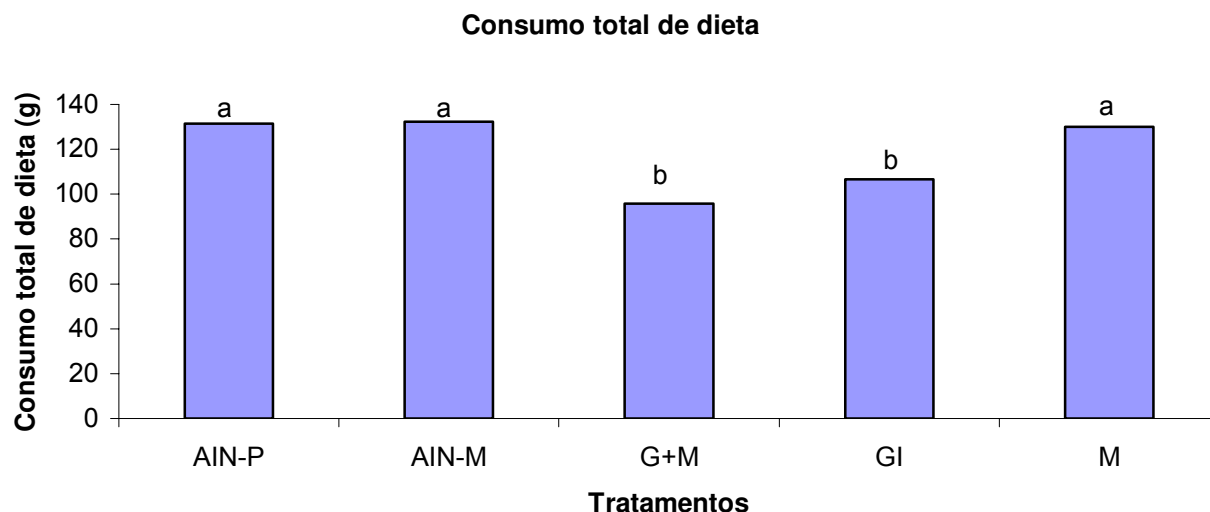


Figura 4.6. Valores médios de consumo total de dieta (g) aos 28 dias (média $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta), para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 17% de proteína (caseína): **AIN-P** $\rightarrow$ dieta padrão AIN-93G; dietas modificadas: Controle (**AIN-M**) $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.

- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).

Quociente de eficiência da dieta (QED). Quanto ao QED, observou-se que ao longo dos 28 dias a dieta G+M foi a que apresentou os menores índices. A dieta M apesar de apresentar o menor índice no período 0-7, ao longo dos 28 dias apresentou um dos melhores índices de QED.

Observa-se uma diminuição sensível do QED no período T21-T28 para todos os tratamentos. (Tabela 4.6)

Tabela 4.6. Quociente de eficiência da dieta (QED) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0-7, 7-14, 14-21 e 21-28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Quociente de eficiência da dieta (QED)			
	T0-T7	T7-T14	T14-T21	T21-T28
AIN-P	0,40±0,05 ^{aA}	0,32±0,03 ^{bB}	0,32±0,03 ^{bB}	0,15±0,03 ^{cA}
AIN-M	0,41±0,03 ^{aA}	0,33±0,02 ^{bB}	0,37±0,04 ^{bAB}	0,17±0,02 ^{cA}
G+M	0,41±0,04 ^{aA}	0,31±0,02 ^{bB}	0,34±0,03 ^{bB}	0,07±0,03 ^{cB}
GI	0,44±0,04 ^{aA}	0,34±0,02 ^{bB}	0,41±0,04 ^{aA}	0,06±0,02 ^{bB}
M	0,34±0,08 ^{bB}	0,50±0,04 ^{aA}	0,39±0,07 ^{bAB}	0,15±0,03 ^{cA}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: **Controle (AIN-M)** → 10% celulose comercial; **G+M** → 10% glicana + manana; **GI** → 10% glicana insolúvel; **M** → 10% manana.
- Os resultados (médias ± desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias ± desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T₀-T₇, T₇-T₁₄ e T₂₁-T₂₈ → duração do ensaio biológico (dias): tempo inicial (T₀), 7 dias (T₇), 14 dias (T₁₄), 21 dias (T₂₁) e 28 dias (T₂₈).

Digestibilidade aparente da proteína (Da). A quantidade de nitrogênio fecal e ingerido durante o período de 0-7, 7-14, 14-21 e 21-28 dias de balanço permitiram o cálculo da digestibilidade aparente (Da) para os vários tratamentos, apresentado na Tabela 4.7.

Observou-se que a digestibilidade aparente foi menor para dieta G+M, seguida pela dieta GI, quando comparado com as demais dietas nos diferentes tempos, provavelmente devido ao fato de que a fibra contida na dieta G+M faz com que o volume fecal aumente, conseqüentemente, acarrete maior perda de nitrogênio nas fezes, que leva a uma menor digestibilidade aparente. Os maiores índices de digestibilidade aparente foram observados nas dietas AIN-M, AIN-P e M.

Comparando as várias dietas analisadas pode-se constatar que não houve uma variação significativa em relação a digestibilidade aparente, apenas algumas

dietas como a G+M e a GI nos tempos $T_{14} - T_{21}$ e $T_{21} - T_{28}$ e também a dieta M no $T_7 - T_{14}$, apresentaram valores menores, quando comparado com as demais dietas.

Tabela 4.7. Digestibilidade aparente da proteína (Da) (média±desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0-7, 7-14, 14-21 e 21-28 dias.

Tratamentos (fontes de fibras)	Digestibilidade aparente da proteína (Da)			
	T0-T7	T7-T14	T14-T21	T21-T28
AIN-P	98,92±0,08 ^{abB}	99,33±0,03 ^{aA}	98,81±0,31 ^{bB}	98,85±0,18 ^{bB}
AIN-M	99,26±0,04 ^{bA}	99,53±0,05 ^{aA}	99,33±0,07 ^{bA}	99,33±0,11 ^{bA}
G+M	98,32±0,13 ^{aC}	98,43±0,26 ^{aB}	97,53±0,08 ^{bC}	97,46±0,03 ^{bD}
GI	98,49±0,05 ^{bC}	98,77±0,10 ^{aB}	97,84±0,02 ^{cC}	97,95±0,08 ^{cC}
M	98,46±0,02 ^{cB}	97,83±0,10 ^{cC}	98,91±0,02 ^{aB}	99,04±0,07 ^{aB}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: **Controle (AIN-M)** → 10% celulose comercial; **G+M** → 10% glicana + manana; **GI** → 10% glicana insolúvel; **M** → 10% manana.
- Os resultados (médias ± desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias ± desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T_0-T_7 , T_7-T_{14} e $T_{21}-T_{28}$ → duração do ensaio biológico (dias): tempo inicial (T_0), 7 dias (T_7), 14 dias (T_{14}), 21 dias (T_{21}) e 28 dias (T_{28}).

Quantidade de fezes excretadas (g). As maiores quantidades de fezes excretadas (g) foram encontradas na dieta AIN-M. Os menores índices de fezes excretadas no T_0-T_7 e T_7-T_{14} foram observadas na dieta M e no $T_{14}-T_{21}$ e $T_{21}-T_{28}$ na dieta GI.

Nas dietas GI e G+M foi constatado uma diminuição na quantidade de fezes excretadas ao longo dos 28 dias. Por outro lado observou-se que houve um aumento na quantidade de fezes excretadas nas dietas AIN-P, AIN-M e M ao longo dos 28 dias (Tabela 4.8). Alguns autores observaram que quanto maior for a

fermentação da fibra no cólon, menor será o volume fecal (MONGEAU et al., 1990; PÉREZ OLHEROS et al., 1999).

Tabela 4.8. Quantidade de fezes excretadas (g) em base seca (média $\pm$ desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0-7, 7-14, 14-21 e 21-28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Quantidade de fezes excretadas (g)			
	T0-T7	T7-T14	T14-T21	T21-T28
AIN-P	9,58 $\pm$ 0,23 ^{bD}	9,44 $\pm$ 0,18 ^{bD}	11,44 $\pm$ 0,31 ^{aC}	11,62 $\pm$ 0,26 ^{aC}
AIN-M	13,52 $\pm$ 0,29 ^{cA}	13,56 $\pm$ 0,38 ^{cA}	16,73 $\pm$ 0,18 ^{bA}	19,55 $\pm$ 0,24 ^{aA}
G+M	11,40 $\pm$ 0,29 ^{aB}	11,37 $\pm$ 0,31 ^{aB}	10,60 $\pm$ 0,24 ^{bD}	10,42 $\pm$ 0,24 ^{bD}
GI	10,53 $\pm$ 0,33 ^{aC}	10,52 $\pm$ 0,38 ^{aC}	8,63 $\pm$ 0,31 ^{bE}	7,54 $\pm$ 0,36 ^{cE}
M	3,50 $\pm$ 0,30 ^{dE}	5,43 $\pm$ 0,25 ^{cE}	14,37 $\pm$ 0,25 ^{bB}	15,38 $\pm$ 0,28 ^{aB}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: **Controle (AIN-M)** $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T₀-T₇, T₇-T₁₄ e T₂₁-T₂₈ $\rightarrow$ duração do ensaio biológico (dias): tempo inicial (T₀), 7 dias (T₇), 14 dias (T₁₄), 21 dias (T₂₁) e 28 dias (T₂₈).

Quantidade total de fezes excretadas (g) aos 28 dias. Ao final de 28 dias, os animais que receberam a dieta GI excretaram menos fezes em relação às outras dietas (Figura 4.7). Notou-se uma variação significativa em relação à quantidade de fezes excretadas nas dietas analisadas, diferindo estatisticamente. A dieta AIN-M foi a que proporcionou uma maior excreção de fezes, seguidas pelas dietas M, AIN-P, G+M.

Alguns autores verificaram que os componentes da fração fibra da dieta apresentam diferentes afinidades de adsorção em relação aos sais biliares no

lúmen intestinal, provocando modificações no perfil dos ácidos biliares. A ligação dos ácidos biliares com a fibra solúvel, no lúmen intestinal, tem como consequência uma redução na sua reabsorção no trato gastrointestinal inferior (parte distal do íleo) e aumento na excreção fecal (STORY; THOMAS, 1982; 1991; STORY, 1995).

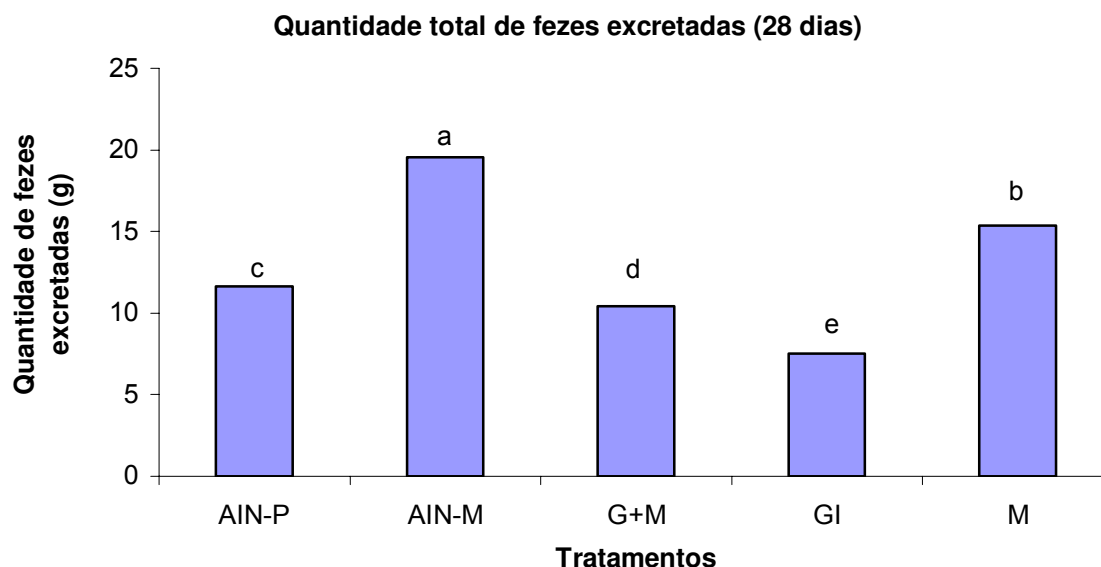


Figura 4.7. Valores médios de quantidade total de fezes excretadas (g) aos 28 dias (média $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta), para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 17% de proteína (caseína): **AIN-P** $\rightarrow$ dieta padrão AIN-93G; dietas modificadas: Controle (**AIN-M**) $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).

Porcentagem de lipídios totais nas fezes. As maiores porcentagens de lipídios totais (%) nas fezes (base seca) foram encontradas nas dietas G+M no período T_0 - T_7 , M no T_7 - T_{14} e GI no T_{14} - T_{21} e no T_{21} - T_{28} . Foi observada variações significativas nessas dietas nos vários tempos analisados.

Comparando as dietas analisadas pode-se constatar que a dieta AIN-P foi a que apresentou menores concentrações de lipídios totais (%) nas fezes, com algumas variações significativas entre os tempos analisados (Tabela 4.9).

Tabela 4.9. Porcentagem de lipídios totais nas fezes (média $\pm$ desvio-padrão) nas fezes (base seca) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0-7, 7-14, 14-21 e 21-28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Lipídios totais nas fezes (%)			
	T0-T7	T7-T14	T14-T21	T21-T28
AIN-P	1,70 $\pm$ 0,11 ^{cD}	1,76 $\pm$ 0,04 ^{cE}	2,21 $\pm$ 0,05 ^{bE}	2,83 $\pm$ 0,06 ^{aE}
AIN-M	4,39 $\pm$ 0,06 ^{cC}	8,68 $\pm$ 0,03 ^{bC}	9,05 $\pm$ 0,07 ^{aB}	9,09 $\pm$ 0,09 ^{aC}
G+M	11,52 $\pm$ 0,11 ^{bA}	5,90 $\pm$ 0,08 ^{dD}	6,84 $\pm$ 0,01 ^{cD}	11,71 $\pm$ 0,02 ^{aB}
GI	8,69 $\pm$ 0,06 ^{cB}	10,28 $\pm$ 0,04 ^{bB}	10,20 $\pm$ 0,02 ^{bA}	18,03 $\pm$ 0,07 ^{aA}
M	8,72 $\pm$ 0,05 ^{bB}	13,58 $\pm$ 0,05 ^{aA}	8,27 $\pm$ 0,04 ^{cC}	6,27 $\pm$ 0,04 ^{dD}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: **Controle (AIN-M)** $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T₀-T₇, T₇-T₁₄ e T₂₁-T₂₈ $\rightarrow$ duração do ensaio biológico (dias): tempo inicial (T₀), 7 dias (T₇), 14 dias (T₁₄), 21 dias (T₂₁) e 28 dias (T₂₈).

Concentração de colesterol nas fezes (mg/100g). Em relação à concentração de colesterol nas fezes (base seca) observou-se que as maiores concentrações foram na dieta M nos intervalos T₀-T₇ e T₇-T₁₄ e na dieta GI nos tempos T₁₄-T₂₁ e T₂₁-T₂₈. Porém foi observado variações significativas nessas dietas ao longo dos diferentes tempos analisados.

As menores concentrações de colesterol (mg/100g) foram observadas na dieta AIN-P ao longo dos vários tempos analisados, porém constatou-se que ocorreu variações significativas entre os tempos (Tabela 4.10).

Tabela 4.10. Concentração de colesterol nas fezes (mg/100g) (média $\pm$ desvio-padrão) nas fezes (base seca) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0-7, 7-14, 14-21 e 21-28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Colesterol nas fezes (mg/100g)			
	T0-T7	T7-T14	T14-T21	T21-T28
AIN-P	116,82 $\pm$ 1,39 ^{aE}	79,26 $\pm$ 3,5 ^{bE}	68,29 $\pm$ 2,35 ^{cE}	109,19 $\pm$ 3,91 ^{aE}
AIN-M	3740,82 $\pm$ 22,68 ^{cC}	5142,47 $\pm$ 9,98 ^{aB}	4851,80 $\pm$ 31,79 ^{bD}	4852,10 $\pm$ 29,18 ^{bB}
G+M	3245,52 $\pm$ 36,02 ^{cD}	5044,94 $\pm$ 16,46 ^{bC}	5149,37 $\pm$ 35,22 ^{aC}	3258,63 $\pm$ 31,47 ^{cD}
GI	4036,76 $\pm$ 11,03 ^{dB}	4752,17 $\pm$ 28,96 ^{cD}	8439,59 $\pm$ 28,96 ^{bA}	10641,54 $\pm$ 147,08 ^{aA}
M	4773,01 $\pm$ 4,14 ^{cA}	9069,04 $\pm$ 31,01 ^{aA}	7641,51 $\pm$ 18,31 ^{bB}	4051,42 $\pm$ 36,59 ^{dC}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: **Controle (AIN-M)** $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T₀-T₇, T₇-T₁₄ e T₂₁-T₂₈ $\rightarrow$ duração do ensaio biológico (dias): tempo inicial (T₀), 7 dias (T₇), 14 dias (T₁₄), 21 dias (T₂₁) e 28 dias (T₂₈).

Na Tabela 4.11 podemos observar que a dieta que promoveu maior excreção de fezes, em todo o ensaio, foi a AIN-M, seguida pelas dietas AIN-P e G+M. As dietas GI e M foram as que produziram quantidades menores de fezes.

As quantidades de fezes excretadas não correspondem às quantidades de lipídios e colesterol excretados. A dieta AIN-P eliminou nas fezes quantidades bastante reduzidas de lipídios totais e de colesterol. A dieta que mais excretou lipídios e colesterol foi a AIN-M seguida da GI e da M.

É interessante notar que as relações entre colesterol e lipídios totais excretados nas fezes foram bem diferentes para as várias dietas. A relação percentual colesterol/lipídios totais (Col/Lip x 100) variou na faixa de 4,4 para a dieta AIN-P até 74,4 para a dieta M. Isto sugere uma especificidade de certas fibras não digeríveis pela ligação e excreção do colesterol.

Tabela 4.11. Quantidades (médias) totais de fezes produzidas, lipídios totais e colesterol excretados no decorrer do ensaio (28 dias).

Dietas	Total de fezes (g)	Lipídios totais (g)	Colesterol (g)	Col/Lip x 100
AIN-P	42,08	0,91	0,04	4,39
AIN-M	63,36	5,06	2,96	58,50
G+M	43,79	3,93	1,83	46,56
GI	37,22	4,23	2,45	57,92
M	38,68	3,20	2,38	74,37

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: **Controle (AIN-M)** → 10% celulose comercial; **G+M** → 10% glicana + manana; **GI** → 10% glicana insolúvel; **M** → 10% manana.

- **Influência sobre os índices séricos de glicose e lipídios**

Níveis de colesterol sérico. Na Tabela 4.12 estão apresentadas as concentrações de colesterol sérico para a média dos ratos submetidos aos vários tratamentos. A dieta G+M apresentou valor significativamente mais elevado nos tempos T₁₄ e T₂₈. A dieta M, apesar de ter produzido uma elevação em T₁₄, revela nível abaixo do inicial em T₂₈.

Considerando os níveis de colesterol to tempo zero (T₀) e no tempo 28 (T₂₈) as demais dietas, com exceção da GI e G+M apresentaram efeito hipocolesterolêmico, considerando as dietas de natureza hipercolesterolêmica.

Matheson et al. (1995) estudando a atividade da enzima 7 α -hidroxilase, em experimentos realizados com ratos, observaram que a presença de fibra solúvel influenciou no metabolismo do colesterol, causando alterações no perfil dos ácidos biliares circulantes.

Horton et al. (1994) verificaram em experimentos realizados com hamsters, um efeito hipocolesterolêmico pela adição de 7,5% de psilium (fibra solúvel) à ração. Os autores atribuíram este efeito ao aumento da atividade da enzima 7 α -hidroxilase, que é similar àquele produzido pela presença de 1% de colestiramina.

Em experimentos realizados com fibra natural, como o farelo de trigo e com componentes isolados - fibra refinada como a celulose, alguns autores

observaram resultados negativos em relação à diminuição dos níveis de colesterol sérico, indicando que a fibra insolúvel não promove a diminuição dos níveis de colesterol sérico (PRATHER, 1966; KIRUJAMA et al., 1979; SUNDARAVALLI et al., 1971; MORGAN et al., 1972; RANHOTRA, 1973).

Trabalho realizado por Derivi e Pourchet-Campos (1984), estudando duas variedades de feijões: feijão carioca (*Phaseolus vulgaris*) e feijão macassar (*Vigna sinensis*), identificou a pectina como um componente hipocolesterolêmico presente nas leguminosas. Os autores verificaram que o acentuado efeito hipocolesterolêmico apresentado pelo feijão carioca era devido à presença de um alto teor de pectina solúvel - 1,46g%, enquanto que este efeito não foi observado no feijão macassar que apresentava 0,64g% de pectina solúvel.

A fibra solúvel apresenta a propriedade de hidratar-se no meio aquoso do intestino, formando géis caracterizados por ligações cruzadas que se ligam aos ácidos biliares (EASTWOOD; KAY, 1979). A viscosidade da fibra solúvel está diretamente relacionada a seu efeito hipocolesterolêmico, e uma redução mais acentuada nas taxas de colesterol plasmático foi observada em presença de compostos altamente viscosos (THIFFAULT et al., 1970; THOMAS et al., 1984; SUPERKO et al., 1988; TOPPING, 1991; WANG et al., 1992; GALLAHER; HASSEL, 1995).

Testando o efeito hipocolesterolêmico de produtos de aveia (farelo, flocos) e cevada, alguns autores obtiveram resultados positivos, com modificações na relação das lipoproteínas LDL e HDL (KIRBY et al., 1981; ANDERSON et al., 1984; BENGTSSON et al., 1990; DAVIDSON et al., 1991; LEADBETTER et al., 1991; ZHANG et al., 1994). Este efeito é atribuído à presença de β -glicanas, homopolissacarídeos neutros, lineares, compostos de unidade de glicopiranosil, com ligações β (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 4), apresentando características reológicas semelhantes às da goma guar. A viscosidade produzida por este polissacarídeo no trato digestivo é responsável por seus efeitos fisiológicos (WANG et al., 1992; WOOD, 1993).

Tabela 4.12. Níveis de colesterol sérico em mg/dL (média $\pm$ desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Colesterol sérico (mg/dL)		
	T0	T14	T28
AIN-P	40,74 $\pm$ 1,10 ^{aA}	31,23 $\pm$ 2,39 ^{bC}	27,08 $\pm$ 1,55 ^{cD}
AIN-M	40,74 $\pm$ 1,10 ^{aA}	29,97 $\pm$ 1,51 ^{bC}	30,13 $\pm$ 0,84 ^{bC}
G+M	40,74 $\pm$ 1,10 ^{bA}	65,66 $\pm$ 3,64 ^{aA}	44,83 $\pm$ 1,53 ^{bA}
GI	40,74 $\pm$ 1,10 ^{aA}	32,40 $\pm$ 2,16 ^{bC}	39,41 $\pm$ 1,33 ^{aB}
M	40,74 $\pm$ 1,10 ^{bA}	45,32 $\pm$ 2,07 ^{aB}	37,83 $\pm$ 1,36 ^{bB}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: **Controle (AIN-M)** $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T₀, T₁₄ e T₂₈ $\rightarrow$ duração do ensaio (dias): tempo inicial (T₀), 14 dias (T₁₄), e 28 dias (T₂₈).

Níveis de glicose sérica. Em relação aos níveis de glicose sérica, observamos que a dieta M apresentou valor significativamente maior nos tempos T₁₄ e T₂₈, seguida pela dieta GI. Porém, observou-se que no T₂₈ houve uma diminuição dos níveis de glicose tanto para os animais alimentados com a dieta M quanto para os alimentados com a dieta GI. A tendência de queda aos 28 dias após uma elevação significativa aos 14 dias foi geral, diferentemente da dieta AIN-P, onde houve uma elevação contínua, porém mais lenta até os 28 dias do tratamento. Os níveis mais baixos de glicose sérica foram observados na dieta AIN-P no T₁₄ e na dieta G+M no T₂₈.

Considerando a glicose sérica no início do experimento (T₀), observou-se uma elevação geral da glicemia sugerindo um efeito hiperglicêmico das dietas estudadas (Tabela 4.13).

As fibras solúveis aumentam o tempo de trânsito intestinal, diminuem a velocidade de esvaziamento gástrico e reduzem a elevação da glicemia pós-prandial e do colesterol sérico. As fibras insolúveis, por outro lado, diminuem o

volume fecal e reduzem a absorção da glicose (CAVALCANTI, 1989; ANDERSON et al., 1990; HUGHES, 1991; PERIAGO et al., 1993; AREAS; REYES, 1995).

Diferentes estudos têm demonstrado que a suplementação com goma guar reduz a resposta glicêmica em comida rica em hidratos de carbono (LECLERE et al., 1994; ELLIS et al., 1995; BRENELLI et al., 1997; DIEZ et al., 1998). Pode-se dizer que o efeito da fibra dietética sobre a glicemia é devido à fração solúvel.

Jenkin et al. (1986) observaram em diferentes estudos *in vitro* que a adição de fibra solúvel viscosa em bolsas de diálises, diminui a difusão da glicose através da membrana.

Existem estudos *in vivo* que relatam que a suplementação com fibras viscosas diminui a resposta glicêmica frente a uma ingestão elevada de hidratos de carbono (GATTI et al., 1984; ANDERSON et al., 1990; GROOP et al., 1993; LECLERE et al., 1994; WOOD et al., 1994; CHERBUT et al., 1994; ELLIS et al., 1995). A causa deste efeito pode estar na ação dos polissacarídeos viscosos sobre as propriedades físicas do conteúdo intestinal, porém este mecanismo fisiológico não está todo esclarecido, já que existem numerosos fatores que podem contribuir para esta maior tolerância à glicose, como: o atraso no esvaziamento gástrico que, segundo alguns autores, é o principal fator na modificação da movimentação intestinal; a redução na velocidade de difusão da glicose nas células da mucosa e, por último, o aumento da viscosidade do conteúdo intestinal e a diminuição do acesso da enzima alfa-amilase a seu substrato.

Tabela 4.13. Níveis de glicose sérica em mg/dL (média $\pm$ desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Glicose sérica (mg/dL)		
	T0	T14	T28
AIN-P	69,35 $\pm$ 1,04 ^{cA}	102,43 $\pm$ 7,00 ^{bE}	121,47 $\pm$ 2,34 ^{aC}
AIN-M	69,35 $\pm$ 1,04 ^{cA}	137,98 $\pm$ 2,11 ^{aC}	123,34 $\pm$ 2,38 ^{bC}
G+M	69,35 $\pm$ 1,04 ^{cA}	126,54 $\pm$ 3,05 ^{aD}	105,04 $\pm$ 0,93 ^{bD}
GI	69,35 $\pm$ 1,04 ^{cA}	153,56 $\pm$ 3,38 ^{aB}	134,83 $\pm$ 3,70 ^{bB}
M	69,35 $\pm$ 1,04 ^{cA}	165,84 $\pm$ 2,60 ^{aA}	145,22 $\pm$ 5,18 ^{bA}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: **Controle (AIN-M)** $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T₀, T₁₄ e T₂₈ $\rightarrow$ duração do ensaio (dias): tempo inicial (T₀), 14 dias (T₁₄), e 28 dias (T₂₈).

Níveis de lipídios séricos totais. A Tabela 4.14 apresenta as concentrações de lipídios séricos dos ratos das dietas submetidos aos diferentes tratamentos. Em relação aos níveis de lipídios séricos, a dieta G+M foi a que apresentou valor significativamente mais elevado no tempo T₁₄. No tempo T₂₈, as dietas AIN-P e G+M se igualaram apresentando o segundo valor mais elevado, para esse tempo. Os níveis mais baixos de lipídios séricos foram observados na dieta M e na dieta GI no T₁₄ e nas dietas AIN-M e AIN-P, seguida pela dieta M no T₂₈.

Na dieta GI foi observado que não houve variações significativas nos níveis de lipídios séricos nos T₁₄ e T₂₈. Porém, em relação às dietas AIN-P, AIN-M, M e G+M observamos uma diminuição nos níveis de lipídios séricos em relação ao T₂₈.

Considerando o tempo zero (T₀) e T₂₈, todas as dietas provocaram uma queda dos índices lipidêmicos, apesar da natureza hiperlipidêmica da fração lipídica das dietas, sugerindo uma ação hipolipidêmica dos vários tipos de fibra que compuseram as dietas.

Componentes da dieta, como fibras de grãos de leguminosas e outros vegetais apresentaram resposta na alteração do metabolismo lipídico, em humano e animais de experimentação, com redução dos lipídios circulantes e aumento de excreção fecal de ácidos biliares (VAHOUNY, 1982; ARVILL; BODIN, 1995; KRITCHEVSKY, 1997; JENKINS et al., 1998; HYUN; SUN, 1998; FELDMAN, 2001).

A inclusão de 5% de fibra (farelo de trigo, soja e milho) em dietas hipercolesterolêmicas contendo 1% de colesterol, reduziu os níveis de lipídios totais do plasma e do tecido hepático e cardíaco de ratos machos Wistar durante um período de 4 semanas de alimentação (UBEROI et al., 1992).

Tabela 4.14. Níveis de lipídios séricos em mg/dL (média $\pm$ desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Lipídios séricos (mg/dL)		
	T0	T14	T28
AIN-P	351,22 $\pm$ 3,53 ^{aA}	250,04 $\pm$ 3,13 ^{bB}	145,09 $\pm$ 10,36 ^{cC}
AIN-M	351,22 $\pm$ 3,53 ^{aA}	233,89 $\pm$ 2,88 ^{bC}	121,91 $\pm$ 2,61 ^{cD}
G+M	351,22 $\pm$ 3,53 ^{bA}	373,87 $\pm$ 4,62 ^{aA}	214,49 $\pm$ 3,99 ^{cA}
GI	351,22 $\pm$ 3,53 ^{aA}	219,74 $\pm$ 4,89 ^{bD}	219,64 $\pm$ 2,24 ^{bA}
M	351,22 $\pm$ 3,53 ^{aA}	214,35 $\pm$ 4,76 ^{bD}	173,71 $\pm$ 2,89 ^{cB}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: Controle (**AIN-M**) $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T₀, T₁₄ e T₂₈ $\rightarrow$ duração do ensaio (dias): tempo inicial (T₀), 14 dias (T₁₄), e 28 dias (T₂₈).

Níveis de triacilgliceróis séricos. Em relação aos níveis de triacilgliceróis observou-se que a dieta AIN-P foi a que apresentou valor significativamente mais elevado nos tempos T₁₄ e T₂₈. Os níveis mais baixos de triacilgliceróis nos tempos

T₁₄ foram constatados para as dietas G+M e GI e no tempo T₂₈ para as dietas AIN-M e M. Observou-se que no T₂₈ houve uma tendência a elevação dos níveis de triacilgliceróis séricos em todos os tratamentos analisados, quando comparados com o T₁₄, embora ainda tivessem permanecido significativamente inferior ao tempo T₀, sugerindo mais uma vez um efeito hipolipidêmico das dietas que poderia ser atribuído à fração fibra das dietas (Tabela 4.15).

Em estudos realizados por Robbins e Seely (1977), com 20 ratos albinos (10 machos e 10 fêmeas) que receberam dietas hipercolesterolêmicas (1% de colesterol) com adição de 5 a 20% de celulose, e 20% de parede celular de levedura (β -glicana), por um período de 5 meses, foi constatado que a dieta com 20% de parede celular (β -glicana) baixou os níveis de triacilgliceróis quando comparados com as dietas de 5% e 20% de celulose.

Tabela 4.15. Níveis de triacilgliceróis séricos em mg/dL (média $\pm$ desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Triacilgliceróis séricos (mg/dL)		
	T0	T14	T28
AIN-P	193,05 $\pm$ 6,34 ^{aA}	26,86 $\pm$ 1,60 ^{cA}	70,14 $\pm$ 1,62 ^{bA}
AIN-M	193,05 $\pm$ 6,34 ^{aA}	24,40 $\pm$ 2,45 ^{bAB}	28,25 $\pm$ 3,07 ^{bC}
G+M	193,05 $\pm$ 6,34 ^{aA}	15,09 $\pm$ 0,82 ^{cD}	39,42 $\pm$ 1,62 ^{bB}
GI	193,05 $\pm$ 6,34 ^{aA}	16,91 $\pm$ 3,60 ^{cCD}	38,82 $\pm$ 2,95 ^{bB}
M	193,05 $\pm$ 6,34 ^{aA}	20,34 $\pm$ 2,35 ^{cBC}	31,39 $\pm$ 1,26 ^{bC}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: controle (**AIN-M**) $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 8 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T₀, T₁₄ e T₂₈ $\rightarrow$ duração do ensaio (dias): tempo inicial (T₀), 14 dias (T₁₄), e 28 dias (T₂₈).

- **Caracterização da microbiota intestinal: contagem e classificação da microflora**

O acúmulo de evidências que comprovam o papel da microbiota intestinal na saúde e bem-estar do organismo tem levado a um interesse crescente por fatores da dieta que permitam aumentar a população dos lactobacilos e bifidobactérias, consideradas bactérias funcionais do intestino. Por esse motivo tem se observado no mercado um número cada vez maior de produtos com essa finalidade chamados de prebióticos que são suplementos alimentares contendo compostos utilizados preferencialmente pelos lactobacilos e bifidobactérias, estimulando o seu crescimento.

Contagem total de bactérias anaeróbicas. A microbiota intestinal do organismo humano é composta predominantemente por bactérias que podem atingir uma população da ordem de 10^{12} microrganismos/g (peso úmido) do conteúdo do intestino grosso (TANNOCK, 1995). Nessa complexa comunidade podem ser encontrados pelo menos 400 espécies de bactérias, porém 99% da população é representada por 30 a 40 espécies que compõe a microbiota intestinal predominante (DRASAR; BARROW, 1985). Dentre essas, as espécies numericamente predominantes são bactérias anaeróbicas estritas ou facultativas.

Observou-se que a dieta GI foi a que apresentou valor significativo mais elevado no T_{28} em relação à contagem de bactérias anaeróbicas totais.

Não houve uma variação significativa na contagem de bactérias anaeróbicas totais entre as várias dietas analisadas durante os tempos T_0 , T_{14} e T_{28} (Tabela 4.16), como também não se observou variação estatística significativa entre os vários tratamentos.

Tabela 4.16. Contagem total de bactérias anaeróbicas log UFC/g (unidades formadoras de colônia/g) (média $\pm$ desvio-padrão) de conteúdo intestinal (ao natural) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Contagem total de bactérias anaeróbicas (log UFC/g)		
	T0	T14	T28
AIN-P	8,64 $\pm$ 0,92 ^{aA}	8,21 $\pm$ 0,60 ^{aA}	8,32 $\pm$ 0,46 ^{aB}
AIN-M	8,64 $\pm$ 0,92 ^{aA}	8,49 $\pm$ 0,46 ^{aA}	7,93 $\pm$ 0,54 ^{aB}
G+M	8,64 $\pm$ 0,92 ^{aA}	8,30 $\pm$ 0,42 ^{aA}	8,22 $\pm$ 0,35 ^{aB}
GI	8,64 $\pm$ 0,92 ^{aA}	9,37 $\pm$ 1,09 ^{aA}	9,55 $\pm$ 0,24 ^{aA}
M	8,64 $\pm$ 0,92 ^{aA}	9,23 $\pm$ 0,06 ^{aA}	8,53 $\pm$ 0,42 ^{aB}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: controle (**AIN-M**) $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T₀, T₁₄ e T₂₈ $\rightarrow$ duração do ensaio (dias): tempo inicial (T₀), 14 dias (T₁₄), e 28 dias (T₂₈).

Contagem de bifidobactérias. Bifidobactérias são bastonetes Gram positivos, não esporogênicos, anaeróbios estrictos, com morfologia extremamente variada. Os produtos finais predominantes de metabolismo são os ácidos acético e láctico, produzidos na proporção de 3:2. A glicose é degradada exclusiva e caracteristicamente pela via da frutose-6-fosfato. Em relação à contagem de bifidobactérias conclui-se que não houve variações estatísticas significativas entre as várias dietas analisadas durante o T₀, T₁₄ e T₂₈ (Tabela 4.17).

Segundo Gibson e Wang (1994), o efeito benéfico dessas bactérias sobre a saúde de adultos e crianças é expressivo, porque inibem a multiplicação de microrganismos patogênicos, reduzem a concentração de amônia no sangue, produzem vitaminas do complexo B e atuam como imunomoduladores. O mecanismo de inibição exercido pelas bifidobactérias sobre outras espécies da microbiota intestinal está relacionado à produção de ácidos (acético e láctico) durante o seu metabolismo fermentativo, e também à excreção de substâncias

anti-microbianas (bacteriocinas) com largo espectro de atividade. Espécies patogênicas pertencentes ao gênero *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* e *Shigella*, *Bacteroides* e *Vibrio Cholerae* são afetados pelo meio ácido, demonstrando que as bifidobactérias são capazes de exercer mais de um mecanismo de inibição e, conseqüentemente, atuar como fator de proteção da gastroenterites.

Hidaka et al. (1986) e Muramatsu et al. (1992 e 1993) destacam que as bifidobactérias exercem um importante papel no controle do pH intestinal, através da liberação dos ácidos láctico e acético. Estes ácidos são produzidos na proporção molar 3:2, respectivamente, e restringem o crescimento de bactérias patogênicas e putrefativas. Através do controle do pH intestinal é possível limitar a produção de substâncias nocivas, tais como fenóis, aminas vasoconstritoras (histamina, tiramina, cadaverina e agmatina), p-cresol, amônia, indol, escatol, metabólitos derivados de esteróides e toxinas bacterianas.

Tabela 4.17. Contagem de bifidobactérias log UFC/g (unidades formadoras de colônia/g) (média $\pm$ desvio-padrão) de conteúdo intestinal (ao natural) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Contagem de bifidobactérias (log UFC/g)		
	T0	T14	T28
AIN-P	7,29 $\pm$ 0,10 ^{aA}	6,97 $\pm$ 0,46 ^{aA}	6,37 $\pm$ 0,75 ^{aA}
AIN-M	7,29 $\pm$ 0,10 ^{aA}	6,61 $\pm$ 0,42 ^{aA}	6,37 $\pm$ 0,69 ^{aA}
G+M	7,29 $\pm$ 0,10 ^{aA}	6,85 $\pm$ 0,84 ^{aA}	6,49 $\pm$ 1,22 ^{aA}
GI	7,29 $\pm$ 0,10 ^{aA}	7,15 $\pm$ 0,86 ^{aA}	6,81 $\pm$ 0,54 ^{aA}
M	7,29 $\pm$ 0,10 ^{aA}	7,79 $\pm$ 0,79 ^{aA}	7,65 $\pm$ 0,95 ^{aA}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: controle (**AIN-M**) $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T₀, T₁₄ e T₂₈ $\rightarrow$ duração do ensaio (dias): tempo inicial (T₀), 14 dias (T₁₄), e 28 dias (T₂₈).

Contagem de clostrídios. Os clostrídios são bastonetes Gram positivos, esporogênicos, anaeróbicos estritos. São bactérias putrefativas e patogênicas que produzem componentes tóxicos no cólon, como: amônio, aminas, nitroaminas, fenóis, cresóis, indol, ácidos biliares secundários e agliconas. A concentração desses compostos é baixa no cólon; porém, seus efeitos tóxicos não podem ser ignorados por estarem presentes no intestino e em contato com a membrana da mucosa intestinal por longo período na vida humana (MIZOTA, 1996).

Foi observada uma diminuição em relação à contagem de clostrídios no tempo T_{28} para as dietas AIN-P, AIN-M, GI e M. Na dieta G+M não houve variações significativas mais elevadas no T_{14} e a dieta G+M foi a que apresentou valor significativo mais elevado no T_{28} (Tabela 4.18). Exceção feita à dieta G+M: observou-se uma diminuição de clostrídios no T_{28} em relação a T_0 após ter havido uma elevação no tempo T_{14} .

Tabela 4.18. Contagem de clostrídios log UFC/g (unidades formadoras de colônia/g) (média $\pm$ desvio-padrão) de conteúdo intestinal (ao natural) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Contagem de clostrídios (log UFC/g)		
	T0	T14	T28
AIN-P	6,88 $\pm$ 0,49 ^{aA}	7,42 $\pm$ 0,16 ^{aAB}	5,00 $\pm$ 0,00 ^{bB}
AIN-M	6,88 $\pm$ 0,49 ^{aA}	7,10 $\pm$ 0,13 ^{aB}	5,36 $\pm$ 0,72 ^{bAB}
G+M	6,88 $\pm$ 0,49 ^{abA}	7,15 $\pm$ 0,58 ^{aB}	6,32 $\pm$ 0,19 ^{aA}
GI	6,88 $\pm$ 0,49 ^{aA}	7,04 $\pm$ 0,08 ^{aB}	5,78 $\pm$ 0,87 ^{bAB}
M	6,88 $\pm$ 0,49 ^{bA}	7,83 $\pm$ 0,16 ^{aA}	5,00 $\pm$ 0,00 ^{cB}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: controle (**AIN-M**) $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T_0 , T_{14} e T_{28} $\rightarrow$ duração do ensaio (dias): tempo inicial (T_0), 14 dias (T_{14}), e 28 dias (T_{28}).

Contagem de enterobactérias. As enterobactérias são bastonetes Gram positivos, não esporogênicos, anaeróbios estritos. Os produtos finais de metabolismo incluem os ácidos acético, fórmico e butírico.

Em relação à contagem de enterobactérias foi constatado um aumento significativo em todas as dietas analisadas no T₁₄ e no T₂₈ em relação ao T₀. O maior aumento ocorreu com a dieta M no T₁₄, observou-se porém que no T₂₈ ocorreu uma diminuição desse valor permanecendo ainda significativamente superior ao T₀. O menor aumento foi verificado na dieta GI no T₁₄, valor que permaneceu no T₂₈ (Tabela 4.19).

A microbiota intestinal é relativamente estável em indivíduos saudáveis, podendo ser alterada por vários fatores endógenos, como a disponibilidade de nutrientes, tipo de dieta, pH do lúmen intestinal, diarreia e por fatores exógenos, como terapia com antibióticos, tensão emocional, desordem do sistema imunológico e doenças do fígado. Os distúrbios no ecossistema intestinal são geralmente caracterizados por aumentar a contagem de bactérias, principalmente enterobactérias no intestino delgado, reduzindo as bactérias benéficas como bifidobactérias (SUSKOVIC et al., 2001).

Tabela 4.19. Contagem de enterobactérias log UFC/g (unidades formadoras de colônia/g) (média ± desvio-padrão) de conteúdo intestinal (ao natural) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Contagem de enterobactérias (log UFC/g)		
	T0	T14	T28
AIN-P	4,36±0,40 ^{bA}	6,60±0,21 ^{aAB}	6,03±0,55 ^{aA}
AIN-M	4,36±0,40 ^{bA}	6,23±1,01 ^{aAB}	5,67±0,52 ^{abA}
G+M	4,36±0,40 ^{bA}	6,16±0,81 ^{aAB}	5,76±0,61 ^{aA}
GI	4,36±0,40 ^{bA}	5,47±0,25 ^{aB}	5,83±0,78 ^{aA}
M	4,36±0,40 ^{cA}	7,21±0,25 ^{aA}	6,03±0,53 ^{bA}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: controle (**AIN-M**) → 10% celulose comercial; **G+M** → 10% glicana + manana; **GI** → 10% glicana insolúvel; **M** → 10% manana.
- Os resultados (médias ± desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% (p > 0,05).

- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T_0 , T_{14} e T_{28} $\rightarrow$ duração do ensaio (dias): tempo inicial (T_0), 14 dias (T_{14}), e 28 dias (T_{28}).

Contagem de enterococos. Os enterococos são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, capazes de crescer em pH 9,6 e na presença de 6,5% de NaCl. Observou-se que as dietas M e AIN-P foram as que apresentaram valores significativos mais elevados no T_{14} . No T_{28} não foram observadas variações significativas na contagem de enterococos nas várias dietas analisadas, tendo seus valores voltados aos níveis iniciais (T_0).

Conclui-se que ao longo de T_0 - T_{14} e T_{14} - T_{28} não houve variações significativas na contagem de enterococos, nas várias dietas analisadas (Tabela 4.20). Em função do tempo, não se observou variação significativa de enterococos, em todos os tratamentos.

Tabela 4.20. Contagem de enterococos log UFC/g (unidades formadoras de colônia/g) (média $\pm$ desvio-padrão) de conteúdo intestinal (ao natural) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias

Tratamentos (fonte de fibras)	Contagem de enterococos (log UFC/g)		
	T0	T14	T28
AIN-P	5,93 $\pm$ 0,40 ^{aA}	7,09 $\pm$ 0,44 ^{aA}	5,88 $\pm$ 0,93 ^{aA}
AIN-M	5,93 $\pm$ 0,40 ^{aA}	6,68 $\pm$ 0,50 ^{aAB}	5,92 $\pm$ 0,77 ^{aA}
G+M	5,93 $\pm$ 0,40 ^{aA}	5,60 $\pm$ 1,14 ^{aB}	5,45 $\pm$ 0,81 ^{aA}
GI	5,93 $\pm$ 0,40 ^{aA}	6,88 $\pm$ 0,17 ^{aAB}	6,17 $\pm$ 0,52 ^{aA}
M	5,93 $\pm$ 0,40 ^{aA}	7,10 $\pm$ 0,48 ^{aA}	6,32 $\pm$ 0,17 ^{aA}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: controle (**AIN-M**) $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T_0 , T_{14} e T_{28} $\rightarrow$ duração do ensaio (dias): tempo inicial (T_0), 14 dias (T_{14}), e 28 dias (T_{28}).

Contagem de lactobacilos. Os lactobacilos são bastonetes Gram positivos, não esporogênicos, anaeróbicos facultativos. Crescem melhor sob condições anaeróbicas e o principal produto da fermentação da glicose por lactobacilos é o ácido láctico. Conclui-se que a dieta que apresentou melhor resultado na contagem de lactobacilos foi a GI no T₂₈. Em relação ao T₁₄ não foram constatadas variações significativas entre as várias dietas analisadas. Ao longo do T₁₄ e T₂₈ não foram constatadas variações significativas na contagem de lactobacilos, nas várias dietas analisadas (Tabela 4.21), comparados os valores entre si e com o T₀.

No organismo humano, os principais efeitos favoráveis da presença de lactobacilos, estimulados pelas fibras solúveis, é a capacidade de consumir colesterol, inibindo sua absorção pela parede intestinal, produzir ácidos orgânicos que reduzem o pH intestinal e inibem o crescimento de bactérias indesejáveis ou patogênicas, produzir ácidos graxos de cadeia curta; produzir bacteriocinas, que são compostos com efeito inibidor sobre o crescimento de outras bactérias, podendo oferecer proteção contra infecções (NAKAYA, 1984; OKAMURA et al., 1986; HIDAKA et al., 1986, GILLILARD; WALKER, 1990; SUZUKI et al., 1991; TOMATSU, 1994).

Tabela 4.21. Contagem de lactobacilos log UFC/g (unidades formadoras de colônia/g) (média $\pm$ desvio-padrão) de conteúdo intestinal (ao natural) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 17% de proteína, nos tempos 0, 14, e 28 dias.

Tratamentos (fonte de fibras)	Contagem de lactobacilos (log UFC/g)		
	T0	T14	T28
AIN-P	8,64 $\pm$ 0,40 ^{aA}	8,13 $\pm$ 1,12 ^{aA}	7,83 $\pm$ 0,29 ^{aB}
AIN-M	8,64 $\pm$ 0,40 ^{aA}	7,84 $\pm$ 0,11 ^{aA}	7,94 $\pm$ 0,53 ^{aB}
G+M	8,64 $\pm$ 0,40 ^{aA}	8,11 $\pm$ 0,79 ^{aA}	8,34 $\pm$ 0,38 ^{aAB}
GI	8,64 $\pm$ 0,40 ^{aA}	8,40 $\pm$ 0,49 ^{aA}	9,02 $\pm$ 0,40 ^{aA}
M	8,64 $\pm$ 0,40 ^{aA}	9,14 $\pm$ 0,08 ^{aA}	8,43 $\pm$ 0,51 ^{aAB}

- Dieta padrão AIN-93G (**AIN-P**); dietas modificadas: controle (**AIN-M**) $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.
- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).

- Os resultados (médias $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T_0 , T_{14} e T_{28} $\rightarrow$ duração do ensaio (dias): tempo inicial (T_0), 14 dias (T_{14}), e 28 dias (T_{28}).

Não foram observadas variações nos níveis de colonização nos ratos das várias dietas, em relação aos níveis iniciais (T_0).

- **Extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta no conteúdo intestinal**

Os maiores produtos do metabolismo dos prebióticos são os AGCC, principalmente acetato, propionato e butirato e os gases, dióxido de carbono, metano e hidrogênio (CUMMINGS et al., 2001; O'SULLIVAN, 1996). Os ácidos graxos de cadeia curta são produtos intermediários e finais da degradação microbiana endógena e exógena, sendo componentes derivados do trato gastrointestinal de todas as espécies de mamíferos, embora a relativa importância de sua produção varie de espécie para espécie. Os AGCC são produzidos através da ação de várias espécies bacterianas e através de diferentes vias metabólicas (MIDTVEDT, 1999). Acredita-se que os AGCC sejam eficientemente absorvidos e utilizados pelas células epiteliais humanas, estimulando a absorção de sais e água, o crescimento de células epiteliais e a motilidade intestinal (SAKO et al., 1999). A quantidade e tipo de AGCC produzido no cólon depende do tipo do carboidrato e da composição da biota intestinal. (RYCROFT et al., 2001; SAKO et al., 1999).

Os ácidos graxos de cadeias curtas (acetato, propionato e butirato) são produzidos pela degradação da fibra solúvel no intestino e podem, ou ser utilizado como substrato energético pelas células intestinais, ou ser absorvidos pela mucosa intestinal, passando para a corrente sangüínea (HUGHES, 1991).

O ácido acético é o único dos ácidos que alcança a circulação sistêmica podendo ser utilizado como fonte de energia na lipogênese; o ácido propiônico se metaboliza no fígado e é o único dos AGV com ação gliconeogênica, podendo influenciar em algumas fases do metabolismo hepático, como na síntese de

colesterol; enquanto que o ácido butírico alcança muito pouco o fígado, e é o menos utilizado como fonte de energia para o enterócito colônico (MACFARLANE; CUMMINGS, 1991; BASSON; SGAMBATI, 1998).

Juntos, os AGCC apresentam implicações positivas na prevenção do câncer de cólon (RYCROFT et al., 2001). Especialmente o butirato vem sendo estudado quanto ao seu efeito no processo biológico, envolvendo a carcinogênese (OSTE et al., 2001). O butirato é a maior fonte de energia para as células epiteliais do cólon e a baixa concentração deste composto causa diferenciação celular, bem como carcinoma celular no cólon (O'SULLIVAN, 1996; SUSKOVIC et al., 2001).

Comparando as dietas pode-se observar que a dieta AIN-M foi a que apresentou maior quantidade de ácido acético (2,95 mg/g de conteúdo intestinal) no T₁₄; a dieta M foi a que apresentou maior quantidade de ácido propiônico (1,56 mg/g de conteúdo intestinal) e de ácido butírico (0,53 mg/g de conteúdo intestinal) no T₁₄. No T₂₈, a dieta AIN-M foi a que apresentou maior quantidade de ácido acético (2,26 mg/g de conteúdo intestinal); a dieta M foi a que apresentou maior quantidade de ácido propiônico (1,60 mg/g de conteúdo intestinal) e as dietas G+M, GI e M as que apresentam maiores quantidades de ácido butírico (0,58 mg/g; 0,57 mg/g; 0,58 mg/g de conteúdo intestinal) respectivamente (Tabela 4.22).

Em relação aos tempos T₀ e T₂₈, constatou-se que houve um aumento significativo de ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeia curta em todas as dietas estudadas. O ácido acético foi o predominante, seguido do propiônico e do butírico (Figura 4.8).

Extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta (T0 e T28)

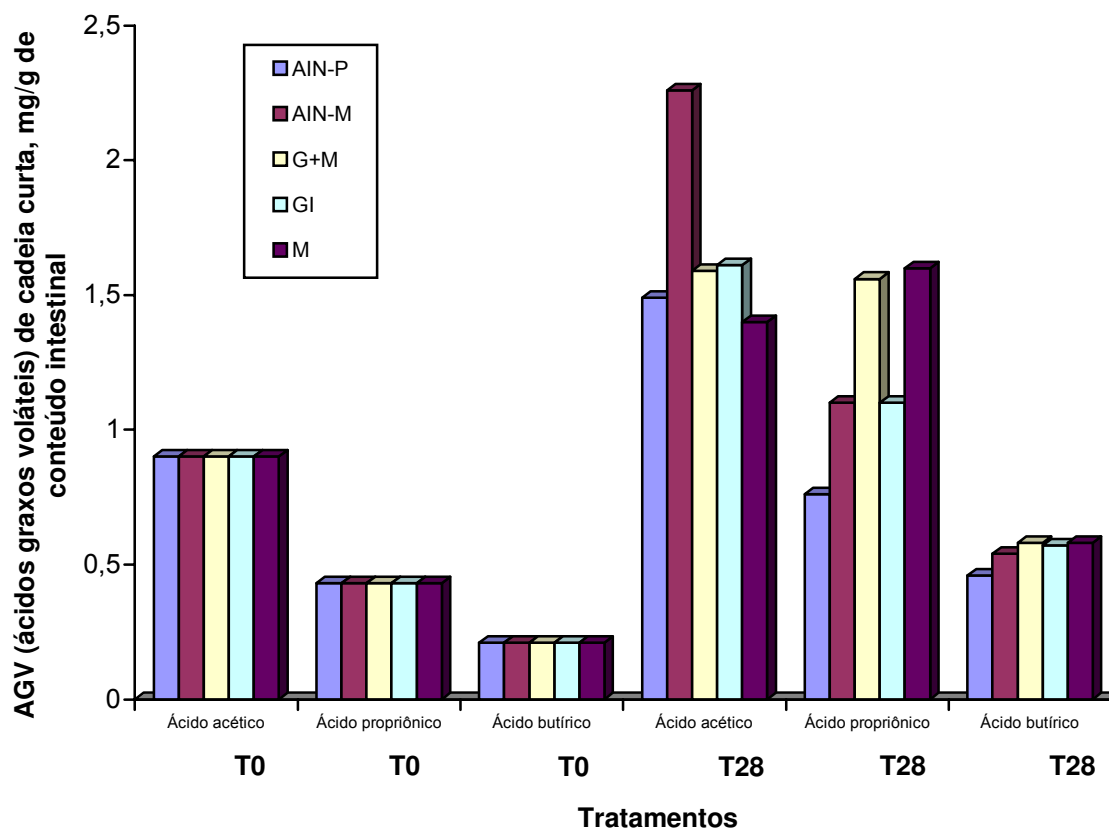


Figura 4.8. Valores médios de extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta no conteúdo intestinal (mg/g) (média $\pm$ desvio-padrão de 3 ratos por dieta), para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 17% de proteína (caseína): dieta padrão AIN-93G (AIN-P); dietas modificadas: controle (**AIN-M**) $\rightarrow$ 10% celulose comercial; **G+M** $\rightarrow$ 10% glicana + manana; **GI** $\rightarrow$ 10% glicana insolúvel; **M** $\rightarrow$ 10% manana.

Tabela 4.22. Extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta no conteúdo intestinal (mg/g de conteúdo intestinal).

Trata- mentos	T0			T14			T28		
(Fonte de fibra)	ácido acético	ácido propiónico	ácido butírico	ácido acético	ácido propiónico	ácido butírico	ácido acético	ácido propiónico	ácido butírico
AIN-P	0,90±0,02 ^{cA}	0,43±0,46 ^{fA}	0,21±0,02 ^{hA}	1,24±0,03 ^{bC}	0,76±0,01 ^{dE}	0,38±0,02 ^{gC}	1,49±0,01 ^{aC}	0,76±0,04 ^{dD}	0,46±0,04 ^{eC}
AIN-M	0,90±0,02 ^{eA}	0,43±0,46 ^{gA}	0,21±0,02 ^{iA}	2,95±0,05 ^{aA}	1,02±0,04 ^{dD}	0,35±0,36 ^{hC}	2,26±0,02 ^{bA}	1,10±0,04 ^{cC}	0,54±0,04 ^{fB}
G+M	0,90±0,02 ^{eA}	0,43±0,46 ^{hA}	0,21±0,02 ^{iA}	1,92±0,06 ^{aB}	1,35±0,04 ^{dB}	0,47±0,03 ^{gB}	1,59±0,04 ^{bC}	1,56±0,04 ^{bC}	0,58±0,03 ^{fA}
GI	0,90±0,02 ^{eA}	0,43±0,46 ^{gA}	0,21±0,02 ^{iA}	1,90±0,05 ^{aB}	1,28±0,04 ^{cC}	0,39±0,05 ^{hC}	1,61±0,03 ^{bB}	1,10±0,05 ^{dC}	0,57±0,05 ^{fA}
M	0,90±0,02 ^{dA}	0,43±0,46 ^{gA}	0,21±0,02 ^{hA}	0,89±0,04 ^{dD}	1,56±0,03 ^{bA}	0,53±0,02 ^{fA}	1,40±0,06 ^{cD}	1,60±0,03 ^{aA}	0,58±0,03 ^{eA}

- Dieta padrão AIN-93G (AIN-P); dietas modificadas: controle (**AIN-M**) → 10% celulose comercial; **G+M** → 10% glicana + manana; **GI** → 10% glicana insolúvel; **M** → 10% manana.
- Os resultados (médias ± desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras minúsculas (linhas) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- Os resultados (médias ± desvio-padrão de 3 ratos por dieta) seguidos de mesmas letras maiúsculas (coluna) não diferem ao nível de 5% ($p > 0,05$).
- T0, T14 e T28 → duração do ensaio (dias): tempo inicial (T0), 14 dias (T14), e 28 dias (T28).

Os cromatogramas referentes a extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta no conteúdo intestinal se encontram no Anexo 4 (Figuras 1 a 12).

4.4. CONCLUSÕES

- Com exceção da dieta G + M, observou-se efeito hipocolesterolêmico em todas as dietas, considerando os níveis no tempo T₀ (referência). Este fato

deve ser atribuído à ação hipolipidêmica das fibras da dieta, uma vez que a fração lipídica das dietas utilizadas era de natureza hiperlipidêmica.

- Observou-se um efeito hiperglicêmico em todas as dietas com relação ao valor de referência (T_0).
- De um modo geral não houve modificações significativas na microflora intestinal dos animais em nenhuma das dietas.
- As quantidades de lipídios totais e colesterol excretados nas fezes variaram bastante entre as dietas, sendo que a dieta M apresentou maior especificidade para excreção do colesterol.
- Dentre os AGV de cadeia curta, o ácido acético foi o predominante, seguido do propiônico e do butírico, em todas as dietas estudadas. O ácido acético aumentou de concentração em função do tempo, em todas as dietas. O ácido propiônico aumentou consideravelmente em todas as dietas no intervalo T_0 a T_{14} com tendência de estabilização a partir de T_{14} até T_{28} . O ácido butírico mostrou uma tendência contínua de aumento, em todas as dietas, tendo atingido um máximo na faixa de 0,54 a 0,58 mg/g de conteúdo intestinal nas dietas AIN-M, G+M, GI e M e de 0,46 mg/g de conteúdo intestinal na dieta AIN-P. As concentrações de ácido butírico nas dietas contendo manana (M), glicana + manana (G+M) e glicana insolúvel (GI) foram significativamente superiores aos das dietas padrão (AIN-P e AIN-M).

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. **Association of Official Agricultural Chemists**, official methods of analysis, 16th ed., 1998, Washington D.C.

ABREU, J.; MILLÁN, N. Effect of addition of brewer's yeast to soy protein and casein on plasma cholesterol levels of rabbits. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.44, n.1, p.18-22, 1994.

ANDERSON, J.W.; DEAKINS, D.A.; BRIDGES, S.R. Soluble fiber: hypocholesterolemic effect and proposed mechanisms. In: **Dietary Fiber:**

chemistry, physiology and health effects. (KRITCHEVSKY, D.; BONFIELD, C.; ANDERSON, J.W. eds.) New York: Plenum Press, 1990, p. 339-363.

ANDERSON, J.W.; STORY, L.; SIELING, B.; CHEN, W.J.L.; PEDRO, M.S.; STORY, J. Hypercholesterolemic effect of oat bran or bean intake for hypercholesterolemic men. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.40, n.6, p.1146-1149, 1984.

AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Fibras alimentares. **International Life Sciences - Seção Regional Brasil**, São Paulo, v.IV, n.3, p.1-2, 1995.

ARVILL, A.; BODIN, L. Effect of short-term ingestion of Konjac glucomannan on serum cholesterol in healthy men. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.61, n.3, p.585-589, 1995.

ASSIS, E. M. **Polissacarídeos da parede celular de levedura de cervejaria (*Saccharomyces cerevisiae*), obtida por rompimento mecânico da célula e de processo industrial de autólise.** Campinas, 1996, 115p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

BASSON, M. D.; SGAMBATI, S. A. Effects of short-chain fatty acids on human rectosigmoid mucosal colonocyte brush-border enzymes. **Metabolism**, Amsterdam, v.47, n.2, p.133-134, 1998.

BELL, P. L.; HECTORNE, K.; REYNOLDS, H.; BALM, L. T.; HUNNINGHAKE, B. D. Cholesterol-lowering effects of psyllium hydrophilic mucilloid. Adjunct therapy to a prudent diet for patients with mild to moderate hypercholesterolemia. **Journal of the American Medical Association**, Minneapolis, v.261, n.23, p.3419-3423, 1989.

BENASSI, V. T.; CAMARGO, C. R. O.; CIACCO, C. F. Caracterização química e redução do conteúdo de ácidos nucléicos das células de levedura (*Saccharomyces spp.*) provenientes da produção de álcool de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.10, n.2, p. 249-260, 1990.

BENGTSSON, S.; ÄMAN, P.; GRAHAM, H.; NEWMAN, C.W.; NEWMAN, R.K. Chemical studies on mixed-linked β -glucan in hull-less barley cultivars given different hypocholesterolemic responses in chickens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Cambridge, v.52, n.4, p.435-445, 1990.

BRENELLI, S.L.; CAMPOS, S.D.S; SAAD, M.J.A. Viscosity of gums and their ability to reduce postprandial hyperglycemia in normal subjects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.30, n.12, p.1437-1440, 1997.

BUCOLO, G.; DAVID, E. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 19, n. 5, p.476-482, 1973.

CAVALCANTI, M.L.F. Fibras Alimentares. **Revista de Nutrição**, Puccamp, Campinas, v.2, n.1, p.88-97, 1989.

CHEN, H.L.; HAACK, V.S.; JANECKY, C.W.; WOLLENDORF, N.W.; MARLETT, J.A. Mechanisms by wheat bran and oat bran increase stool weight in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.68, n.3, p.711-719, 1998.

CHERBUT, C.; BRULEY DES VARANNES, S.; SHNEE, M.; RIVAL, M.; GALMICHE, J.P.; DELORT-GAVAL, J. Involvement of small intestinal mobility in blood glucose response to dietary fiber in man. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.71, n.5, p. 675-685, 1994.

COCHRANE, G.C. A review of the analysis of free fatty acids. **Journal of Chromatographic Science**, Niles, v. 13, n. 9, p. 440-447, 1975.

CUMMINGS, J.; MACFARLANE, G.; ENGLYST, H. Prebiotic digestion and fermentation. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.73, p. 4155-4205m 2001.

DAVIDSON, M.H.; DUGAN, L.D.; BURNS, J.H.; BOVA, J.; STORY, K.; DRENNAN, K.B. The hypocholesterolemic effects of β -glucan in oatmeal and oatbran. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.265, n.14, p.1833-1839, 1991.

DERIVI, S.C.N.; POURCHET-CAMPOS, M.A. Ação da pectina da fração fibra de leguminosa sobre as taxas de colesterol sérico em coelhos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.4, p. 130-138, 1984.

DIEZ, M.; HORNICK, J.L.; BALDWIN, P.; VAN EENAEME, C.; ISTASSE, L. The influence of sugar-beet fiber, guar gum and insulin on nutrient digestibility, water consumption and plasma metabolites in healthy Beagle dogs. **Research in Veterinary Science**, Cambridge, v.64, n.2, p.91-96, 1998.

DRASAR, B. S.; BARROW, P. A. **Intestinal Microbiology**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1985.

EASTWOOD, M.A.; KAY, M.R. Hypothesis for action of dietary fiber along the gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.32, n.2, p.364-367, 1979.

ELLIS, P.R.; ROBERTS, F.G.; LOW, A.G.; MORGAN, L.M. The effect of high-molecular-weight guar gum on net apparent glucose absorption and net apparent insulin and gastric inhibitory polypeptide production in the growing pig: Relationship to rheological changes in jejunal digestion. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.74, p.539-556, 1995.

FELDMAN, E.B. Fruits and vegetables and the risk of stroke. **Nutrition Review**, New York, v.59, n.1, p.24-27, 2001.

FILHO, D. L.; GHIRALDINI, J. A.; ROSSELL, C. E. V. Estudos de otimização da recuperação de biomassa de levedura em destilarias. In: **"Workshop" Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 1996.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9ª ed. São Paulo, Atheneu, 1992, p.177-183.

FRIAS, A. C. D. **Efeito da goma guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) sobre a ingestão de alimentos, lipidemia e glicemia em ratos normais e diabéticos**. Campinas, 1996. 117 p. (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

FRINGS, C. S.; DUNN, R. T. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 53, n. 1, p. 89-91, 1970.

GALLAHER, D.D.; HASSEL, C.A. The role of viscosity in the cholesterol-lowering effect of dietary fiber. In: **Dietary Fiber in Health & Disease** (KRITCHEVSKY, D; BONFIELD, C. eds.) St. Paul: Eagan Press, 1995, p. 106-114.

GATTI, E.; CATENAZZO, G.; CAMISASCA, E.; TORRI, A.; DENEGRÍ, E.; SIRTORI, C.R. Effects of guar enriched pasta in the treatment of diabetes and hiperlipidemia. **Annals of Nutrition and Metabolism**, Switzerland, v.28, n.1, p. 1-10, 1984.

GIBSON, G. R.; WANG, X. Regulation effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, Cambridge, v. 77, n. 4, p. 412-420, 1994.

GILLILAND, S. E.; WALKER, D. K. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce hypocholesterolemic effect in humans. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 4, p. 905-911, 1990.

GROOP, P.H.; ARO, A.; STENMAN, S.; GROOP, L. Long-term effects of guar gum in subjects with non-insulindependent *diabetes mellitus*. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.58, n.4, p.513-518, 1993.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production.** Budapest, Hungary: CRC press, Boca Raton, 1991, 312 p.

HIDAKA, H.; EIDA, T.; TAKIZAWA, T. et al. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria Microflora**, Tokyo, v.5, p.37-50, 1986.

HORTON, J.D.; CUTHBERT, J.A.; SPADY, D.K. Regulation of hepatic 7 alpha hydroxylase expression by dietary psillium in the hamster. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.93, n.5, p.2084-2092, 1994.

HUANG, T. C.; CHEN, C. P.; WEFLR, V.; RATTERY, A. A. A stable reagent for the Lilberman-Buchard reaction. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 33, n. 10, p.1405-1407, 1961.

HUGES, J.S. Potential contribution of dry bean dietary fiber to health. **Food Technology**, Chicago, v.45, n.9, p.122-126, 1991.

HUGHES, J. S. Potential contribution of dry bean dietary fiber to health. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 9, p. 122-126, 1991.

HYUN, I.O.; SUN, Y.L. A study on nutrition characteristics of common Korean dietary fiber rich foods. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, Pusan, v.27, n.2, p. 296-304.

INSTITUTO ADOLPHO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** Vol. 1. Métodos químicos e físicos para análises de alimentos. São Paulo, 3ª ed., 1985, p.38-39.

JENKINS, D.J.A.; JENKINS, M.J.A.; WOLEVER, T.M.S.; TAYLOR, R.H.; GHAFARI, H. Slow release carbohydrate: mechanism of action of viscous fibers. **Journal of Clinical Nutrition Gastroenterology**, New York, v.1, p.237-241, 1986.

JENKINS, D.J.A.; KENDALL, C.W.C.; RANSOM, T.P.P. Dietary fiber, the evolution of the human diet and coronary heart disease. **Nutrition Research**, Larrytown, v.18, n.4, p.633-652, 1998.

JIANG. Z.; FENTON, M.; SIM, J.S. Comparison of four different methods for egg cholesterol determination. **Poultry Science**, Champaign, v. 70, n. 4, p. 1015-1019, 1991.

KIRBY, R.W.; ANDERSON, J.W.; SIELING, B.; REES, E.D.; CHEN, W.J., MILLER, R.; KAY, R.M. Oat-bran intake selectively lowers serum low-density lipoprotein cholesterol concentration of hypercholesterolemic men. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.34, n.5, p.824-829, 1981.

KIRIYAMA, S.; OKAZAKI, Y.; YOSHIDA, A. Hypocholesterolemic effect of polysaccharides and polysaccharide-rich foodstuffs in cholesterol-fed rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.97, n.3, p.382-388, 1979.

KOLLAR, R.; STURKIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v. 6, n. 3, p. 225-237, 1992.

KRITCHEVSKY, D. Cereal fiber and lipidemia. **Cereal Foods World**, Philadelphia, v.42, n.2, p.81-85, 1997.

LEADBETTER, J.; BALL, M.J.; MANN, J.I. Effects of increasing quantities of oat bran in hypocholesterolemic people. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 54, n. 5, p. 841-845, 1991.

LECLERE, C.J.; CHAMP, M.; BOILLOT, J.; GUILLET, G.; LECANNU, G.; MOLIS, C.; BORNET, F.; KREMPF, M. DELORT-LAVART, J.; GALMICHE, J.P. Role of viscous guar gum in lowering the glycemic response after a solid a meal. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.59, n.4, p.914-921, 1994.

LHOSTE, E. F.; NUGON-BAUDON, L.; LORY, S.; MESLIN, J.; ANDRIEUX, C. The fermentation of lactose in rats inoculated with *Clostridium paraputrificum* influences

the activities of liver and intestinal xenobiotic-metabolising enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.81, n.14, p. 367-1404, 2001.

LOTT, J. A.; TURNER, K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. **Clinical Chemistry**, Easton, v. 21, n. 12, p.1754-1760, 1975.

MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In: PHILLIPS, S.F.; PEMBERTON, J.H.; SHORTER, R.G. (eds.) **The large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease**. New York: Raven Press, 1991.

MATHESON, H.B.; COLÓN, I.S.; STORY, J.A.; Cholesterol 7 α -hydroxylase activity is increased by dietary modification with psyllium hydrocolloid, pectin, cholesterol and cholestyramine in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.125, n.3, p. 454-458, 1995.

MIDTVEDT, T. Microbial Functional Activities. In: HANSON, A.; YOLKEN, R. **Probiotics other nutrition factors, and intestinal microflora**. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999, v.42, p.79-96.

MILLÁN, N.; ABREU, J. Effect of the type of dietary fat on cholesterolemia in rabbits fed brewer's yeast. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 46, n. 1, p. 1-17, 1996.

MIZOTA, T. Functional and nutritional foods containing bifidogenic factors. **Bulletin of the International Dairy Federations**, Brussels, v.313, p. 31-35, 1996.

MONGEAU, R.; SIDDIQUI, I.R.; EMERY, J.; BRASSARD, R. Effect of dietary fiber concentrated from celery, parsnip, and rutabaga on intestinal function, serum cholesterol, and blood glucose response in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Ontario, v.38, n.1, p.195-200, 1990.

MORGAN, B.; HEALD, M.; ATKIN, S.D.; GREEN, J.; CHAIN, E.B. Dietary fibre and cholesterol metabolism in rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.32, n.2, p.447-455, 1972.

MUNOA, F. J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p.1715-1718, 1988.

MURAMATSU, K.; ONODERA, S.; KIKUCHI, M.; SHIOMI, N. Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis*. G1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 57, n. 10, p. 1681-1685, 1993.

MURAMATSU, K.; ONODERA, S.; KIKUCHI, M.; SHIOMI, N. The production of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium* spp. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 56, n. 9, p.1451-1454, 1992.

NAKAYA, R. Role of bifidobacterium in enteric infection. **Bifidobacteria Microflora**, Tokyo, v.3, p.3-9, 1984.

OKAMURA, N.; NAKAYA, R.; YOKOTA, H. et al. Interaction of *Shigella* and bifidobacteria. **Bifidobacteria Microflora**, Tokyo, v.5, p.51-55, 1986.

O'SULLIVAN, M. G. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora. **Bulletin of the international Dairy Federation**, Brussels, v.313, p.23-30, 1996.

PALMER, G.H.; DIXON, D.G. Effect of pectin dose on serum cholesterol levels. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.18, n.6, p.437-442, 1966.

PÉREZ-OLLEROS, L.; GARCÍA-CUEVAS, M.; RUIZ-ROSO, B.; REQUEJO, A. Comparative study of natural carob fibre and psyllium hunk in rats. Influence on some aspects of nutritional utilisation and lipidaemia. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Cambridge, v.79, n.2, p.173-178, 1999.

PERIAGO, M.J.; ROS, G.; LÓPEZ, G.; MARTINEZ, M.C.; RINCÓN, F. Componentes de la fibra dietética y sus efectos fisiológicos. **Revistas Española de Ciência y Tecnologia de Alimentos**, Valência, v.33, n.3, p.229-247, 1993.

RANHOTRA, G.S. Effect of cellulose and wheat mill-fractions on plasma and liver cholesterol levels in cholesterol-fed rats. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.50, n.3, p.358-363, 1973.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, J. G. C. AIN-93G purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

ROBBINS, E. A; SEELEY, R. D. Cholesterol lowering effect of dietary yeast and yeast fractions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, n. 3, p. 694-698, 1977.

ROBBINS, E.A.; SEELEY, R.D. Cholesterol lowering effect of dietary yeast and yeast fractions. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, n.3, p.694-698, 1977.

ROSE, A. H. Composition of the envelope layer of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. **Journal of Applied Bacteriology**. Symposium Supplement, Oxford, v. 74, supp. 22, p. 1105-1185, 1993.

RYCROFT, C. E.; JONES, M. R.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.91, p. 878-887, 2001.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R.; Recent progress on research and application of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, Barking, v.9, n.1, p. 69-80, 1999.

SALGADO, J. M.; SARRUGE, J. R. Efeito da lavagem sobre a qualidade do concentrado protéico obtido em destilaria de álcool. **Revista Brasileira de Tecnologia**, São Paulo, v.7, p. 339-344, 1976.

SLAVIN, J.L. Dietary fiber: classification, chemical analyses, and food sources. **Journal of the American Dietetic Association**. Chicago, v.87, n.9, p.1164-1171, 1987.

SPILLER, G. A.; CHERNOFF, M. C.; HILL, R. A.; GATES, J. E.; NASSAR, J. J.; SHIPLEY, E. Effect of purified cellulose, pectin, and bow-residue diet on fecal volatile fatty acids, transit time, and fecal weight in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 33, n. 4, p. 754-759, 1980.

STORY, A.; THOMAS, N. Modification of bile spectrum by dietary fiber. In: **Dietary Fiber in Health and Disease**. (VAHOUNY, G. V.; KRITCHEVSKY, D. eds.) New York: Plenum Press, 1982, p. 193-201.

STORY, J. Bile acids. In: **Dietary Fiber in Health and Disease**. (KRITCHEVSKY, D.; BONFIELD, C. eds.) St. Paul: Eagan Press, 1995, p. 450-486.

SUNDARAVALLI, O.E.; SHURPALEKAR, K.S.; RAO, M.N. Effect of dietary cellulose supplements on the body composition and cholesterol metabolism of albino rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.19, n.1, p.116-181, 1971.

SUPERKO, H.R.; HASKELL, W.L.; SAWERY-KUBICEK, L.; FARQUHAR, J.W. Effect of solid and liquid guar gum on plasma cholesterol and triglycerides concentrations in moderate hypercholesterolemia. **American Journal of Cardiology**, New York, v.62, p. 51-55.

SUSKOVIC, J.; KOS, B.; GORETA, J.; MATOSIC, S. Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. **Food Tecnology and Biotechnology**, Ljubljana, v.39, n.3, p. 227-235, 2001.

SUZUKI, Y.; HAIZU, H.; YAMAGUCHI, Y. Effect of cultured milk on serum cholesterol concentrations in rats fed high-cholesterol diets. **Animal Science Technology**, Tokyo, v. 62, p. 565-571, 1991.

TANAKA, R.; MUTAI, M. Improved medium for selective isolation and enumeration of *Bifidobacterium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 40, n. 5, p. 866-869, 1980.

TANNOCK, G. W. **Normal Microflora**. London: Chapman & Hall, 1995.

THIFFAULT, C.; BELANGER, M.; POULET, M. Traitement de l'hyperlipoproteinémie essentielle de type II par un nouvel agent thérapeutique, la celluline. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v.103, p.165-166, 1970.

THOMAS, J.N.; KELLEY, M.; STORY, J.A.; Alteration of regression of cholesterol accumulation in rats by dietary pectin. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.51, n.3, p.339-345, 1984.

TOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 61-65, 1994.

TOPPING, D.L. Soluble fiber polysaccharides effects on plasma cholesterol and colonic fermentation. **Nutrition Review**, New York, v.49, n.7, p.195-203, 1991.

UBEROI, S.K.; VADHERA, S.; SONI, G.L. Role of dietary fiber from pulses and cereals as hypocholesterolemic and hypolipidemic agent. **Journal of Food Science and Technology**, London, v.29, n.5, p.281-283, 1992.

VAHOUNY, G.V. Dietary fiber, lipid metabolism and arteriosclerosis. Federation Proceedings. **Federation Proceedings, Federation of American Societies for Experimental Biology**, New York, v.11, n.41, p.2801-2806, 1982.

WANG, L.W.; NEWMAN, R.K.; NEWMAN, C.W.; HOFER, P.J. Barley β -glucans alter intestinal viscosity and reduce plasma cholesterol concentration in chicks. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.122, n.11, p.2292-2297, 1992.

WILLIAMS, D. L.; MCNAMEE, R. B.; JONES, E. L.; PRETUS, H. A.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, W. I.; LUZIO, N. R. D. A method for the solubilization of α (1 $\rightarrow$ 3)-

β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 219, p. 203-213, 1991.

WILLIAMS, P.C. The use of titanium dioxide as a catalyst for large scale Kjeldahl determination of the nitrogen content of cereal grains. **Journal of the science of Food and Agriculture**, London, v.24, n.3, p.343-348, 1973.

WOOD, P.J. Physiochemical characteristics and physiological properties of oat (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan. In: **Oat bran**. (WOOD, P.I. eds.) Minnesota: A.A.C.C., 1993, p. 163.

WOOD, P.J.; BRAATEN, J.T.; SCOTT, F.W.; RIEDEL, K.D.; WOLYNETZ, M.; COLLINS, M. Effect of dose and modification on viscous properties of oat gum on plasma glucose and insulin following and oral glucose load. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.72, n.5, p.731-743, 1994.

YOSHIOKA, H.; ISEKI, K.; FUJITA, K. Development and difference of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v.72, n. 3, p.317-321, 1983.

ZHANG, J.X.; LUNDUN, E.; REUTERVING, C.O.; HALLMANS, G.; STENLING, R.; WESTERLUND, E.; ÄMAN, P. Effects of rye bran, oat bran, and soybean fibre on bile composition, gallstone formation, gallbladder morphology and serum cholesterol in Syrian golden hamster (*Mesocritus auratus*). **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.71, p. 861-870, 1994.

CONCLUSÃO GERAL

Mostrou-se viável o fracionamento e a caracterização química da parede celular (PC). Dentre esses componentes, os mais representativos foram: fibra solúvel na fração glicana solúvel; fibra insolúvel na fração glicana insolúvel e a proteína na fração glicoproteína.

Alguns componentes apresentaram boas propriedades funcionais, como: a glicana solúvel apresentou maior estabilidade da emulsão, maior capacidade de retenção de água e o maior índice de viscosidade ao redor de 50°C; a fração glicoproteína apresentou o maior índice de solubilidade em água e alta capacidade de emulsificação e a fração glicana insolúvel apresentou os melhores resultados de textura dos géis.

Do ponto de vista das propriedades funcionais fisiológicas, não foram observadas modificações significativas na microflora intestinal dos animais em nenhuma das dietas analisadas. Foi observado um efeito hiperglicêmico e hipocolesterolêmico nas dietas com relação ao valor de referência (T_0). Dentre os AGV (ácidos graxos voláteis) de cadeia curta, o acético foi o predominante, seguido do propiônico e do butírico nas dietas estudadas.

ANEXOS

ANEXO 1

FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PAREDE CELULAR (PC) DE LEVEDURA

Resumo apresentado no:

**XVII Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, no período
de 8 a 19 de agosto de 2000. Fortaleza – Ceará.**

FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURA

Saula Goulart CHAUD e Valdemiro Carlos SGARBIERI*

* ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos, Avenida Brasil, nº2880, CP139, CEP 13073-001, Campinas, SP, BR.

No Brasil, a parede celular de levedura não tem sido aproveitada, apesar de sua riqueza em constituintes nutritivos, seu baixo custo e de suas possíveis aplicações. Desta forma, surgiu o interesse no estudo da parede residual do processo de autólise industrial da levedura e de seus componentes. O presente trabalho teve por objetivo a caracterização química da parede celular de levedura proveniente da fermentação alcoólica obtida pelo método de rompimento das células por autólise e fracionamento sequencial para obtenção de seus principais componentes. Utilizou-se a seguinte metodologia analítica: umidade, cinza e proteína bruta, A.O.A.C. (1998), lipídios totais, método de Bligh e Dyer (1959); fibra alimentar solúvel e insolúvel, método de ASP et al. (1993); RNA, pelo método de Hebert et al. (1971) e carboidratos totais pelo método de Dubois et al. (1956). A composição em aminoácidos foi determinada em aparelho HPLC com separação dos aminoácidos em coluna de troca catiônica e reação pós-coluna com ninidrina. A composição mineral foi determinada na cinza, após incineração da amostra e redissolução em solução de ácido nítrico a 5%. Os ácidos graxos foram determinados de acordo com Firestone (1998). O processo de extração da fração lipídica da parede celular foi realizada conforme Kollar et al. (1992), com algumas modificações. A extração da fração glicoproteína foi realizada de acordo com Lloyd (1970). As frações glicanas e mananas foram extraídas conforme a metodologia de Barreto-Bergter et al. (1981). A fração parede celular bruta, obtida pela centrifugação do autolisado, representa 36% dos sólidos totais da biomassa e contém, em base seca, 27% de proteína. Antes do sub-fracionamento, a fração parede celular foi submetida a um processo de lavagens sucessivas, com água destilada, para eliminar os sólidos solúveis. Após lavagem, apresentou de 18 a 20% de proteína em base seca. O componente mais importante na parede celular semi-purificada (PC) é a fibra (77,8%), com predominância (74%) de fibra solúvel. Os aminoácidos mais abundantes na proteína da Pc são: ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, alanina, serina e treonina. Os aminoácidos sulfurados (metionina + cistina) e por vezes a leucina, encontram-se limitantes. Em relação aos ácidos graxos, verifica-se predominância dos saturados (palmitico e esteárico), seguido dos monoinsaturados (oléico e palmitoléico) e, por último, dos poliinsaturados (linoléico e α -linolênico). Os elementos minerais presentes em maior concentração são: cálcio, fósforo, potássio e ferro. As frações obtidas pelo fracionamento da Pc em maior quantidade foram as mananas (25,13%) e as glicanas (42,92%). Em relação à composição centesimal média das frações extraídas, o componente mais importante é a fibra, com predominância de fibra solúvel (70,34%) para as mananas e fibra insolúvel (75,20) para as glicanas insolúveis. A concentração de proteína foi 35,21 na fração glicoproteína. Do exposto, conclui-se que na fração glicana predominam fibras insolúveis, na fração manana predominam fibras solúveis e na fração glicoproteína predominam as proteínas e contaminantes, possivelmente minerais e manana.

Palavras-Chave: Levedura, Glicana, Manana, Glicoproteína, Fracionamento

Órgãos Financiadores: FAPESP, COOPERSUCAR

*e-mail: sgab@fea.unicamp.br

ANEXO 2

Propriedades Funcionais Tecnológicas da Parede Celular (PC) de Levedura da Fermentação Alcóolica e de suas respectivas frações

Resumo apresentado no:

**4º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos – Alimentos para o
século 21 – Desafios e Tendência para a América Latina, realizado de 12 a 15
de novembro de 2001. Campinas – São Paulo.**

Propriedades Funcionais Tecnológicas da Parede Celular (PC) de Levedura da Fermentação Alcolólica e de suas respectivas frações

CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C.; BRAGAGNOLO, N.

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas – Caixa Postal 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Leveduras apresentam elevada capacidade de se reproduzirem em substratos baratos e produzem altos teores de proteínas, vitaminas e outros constituintes celulares de interesse industrial. Um dos principais derivados de levedura é uma fração rica em carboidratos, como mananas e beta-glicanas com propriedades fisiológicas e funcionais. Este trabalho teve por objetivo determinar as propriedades funcionais tecnológicas da parede celular semi-purificada de levedura da fermentação alcoólica obtida pelo processo de autólise industrial e de suas respectivas frações (glicana solúvel e insolúvel, mananas, glicoproteínas e glicanas + mananas). Foram utilizadas as seguintes metodologias: solubilidade (nitrogênio e sólidos solúveis), segundo Morr et al. (1985), capacidade de retenção de água e índice de solubilidade em água, de acordo com Anderson et al. (1969); geleificação, conforme Sathe e Salunke (1981); capacidade emulsificante, segundo De Kanterewicz et al. (1987); estabilidade da emulsão, descrita por Acton e Saffle (1970); capacidade de absorção espontânea de água, segundo Torgensen e Toledo (1977); capacidade de absorção de óleo, de acordo com De Kanterewicz et al. (1987); e viscosidade, utilizando o analisador rápido de viscosidade. A solubilidade não foi influenciada pelo pH. À medida que acrescentamos ovoalbumina (0,2, 0,4 e 0,6%) à suspensão da parede celular e suas respectivas frações, houve um aumento na capacidade de emulsificação. Em relação à estabilidade da emulsão, a fração glicana solúvel mostrou maior habilidade em permanecer inalterada enquanto a fração glicana insolúvel mostrou menor habilidade. A fração glicana solúvel seguida da fração glicana insolúvel apresentaram maiores valores de absorção de água e as frações glicoproteína e glicana insolúvel apresentaram maiores valores de absorção de óleo. A fração glicana solúvel mostrou maior capacidade de retenção de água (14,36g de água retida / g de amostra), porém menor índice de solubilidade em água (0,06%). A fração glicoproteína apresentou capacidade de retenção de água relativamente baixa (5,33g de água retida / g de amostra), porém o maior índice de solubilidade em água (83,83%). Para fração glicana insolúvel foi necessário a concentração de 6% e para fração glicana solúvel a concentração de 3,5% foi suficiente para formar gel. A viscosidade a 95°C e a viscosidade final (50°C) obedeceram à seguinte ordem: glicana solúvel > glicana insolúvel > glicana + manana > manana, glicoproteína e parede celular. Os métodos utilizados para extração e fracionamento e as características das amostras podem ter influenciado nos resultados. Constatamos que a parede celular e suas respectivas frações apresentam uma riqueza em constituintes nutritivos e funcionais de relevante interesse industrial.

Órgãos Financiadores: FAPESP, COOPERSUCAR

ANEXO 3

**Cromatogramas referentes a extração e quantificação dos monossacarídeos
da parede celular (PC) e em suas respectivas frações**

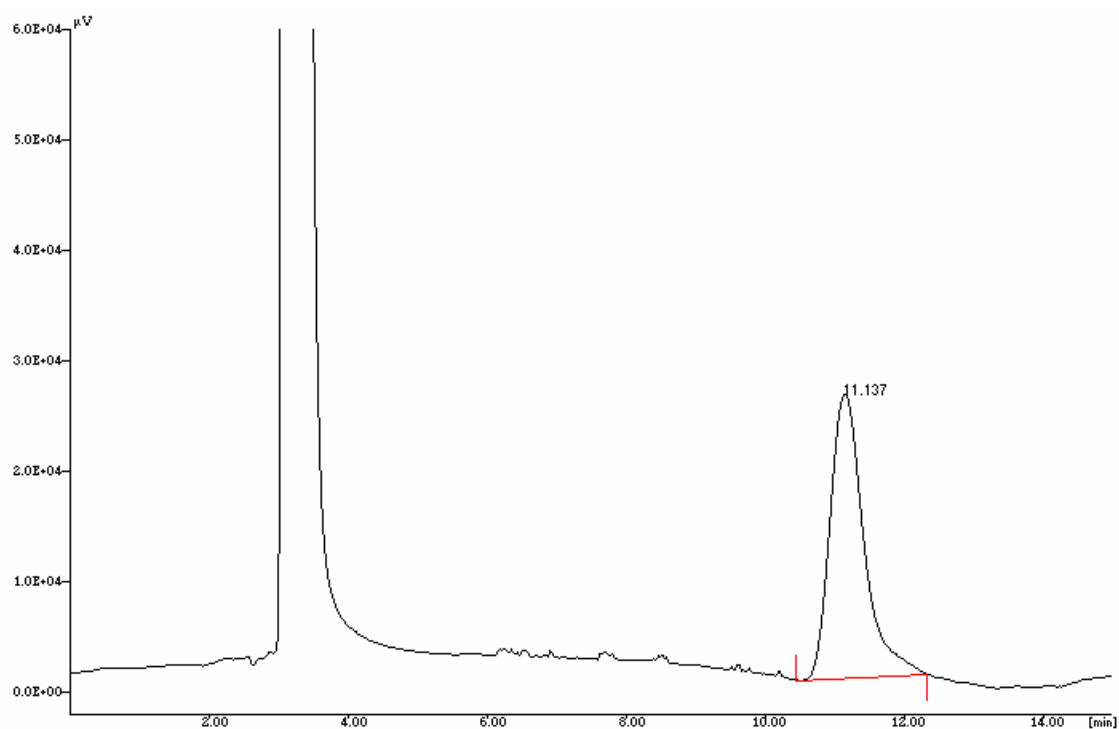


Figura 1. Cromatograma do padrão de manose 1%.

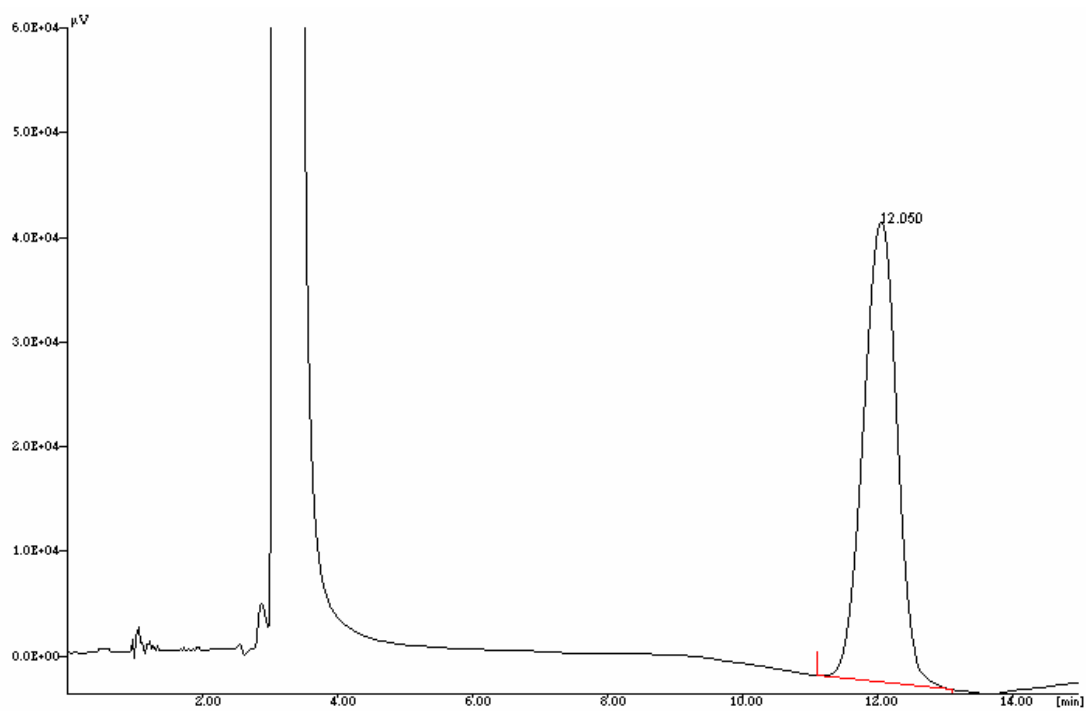


Figura 2. Cromatograma do padrão de glicose 1%.

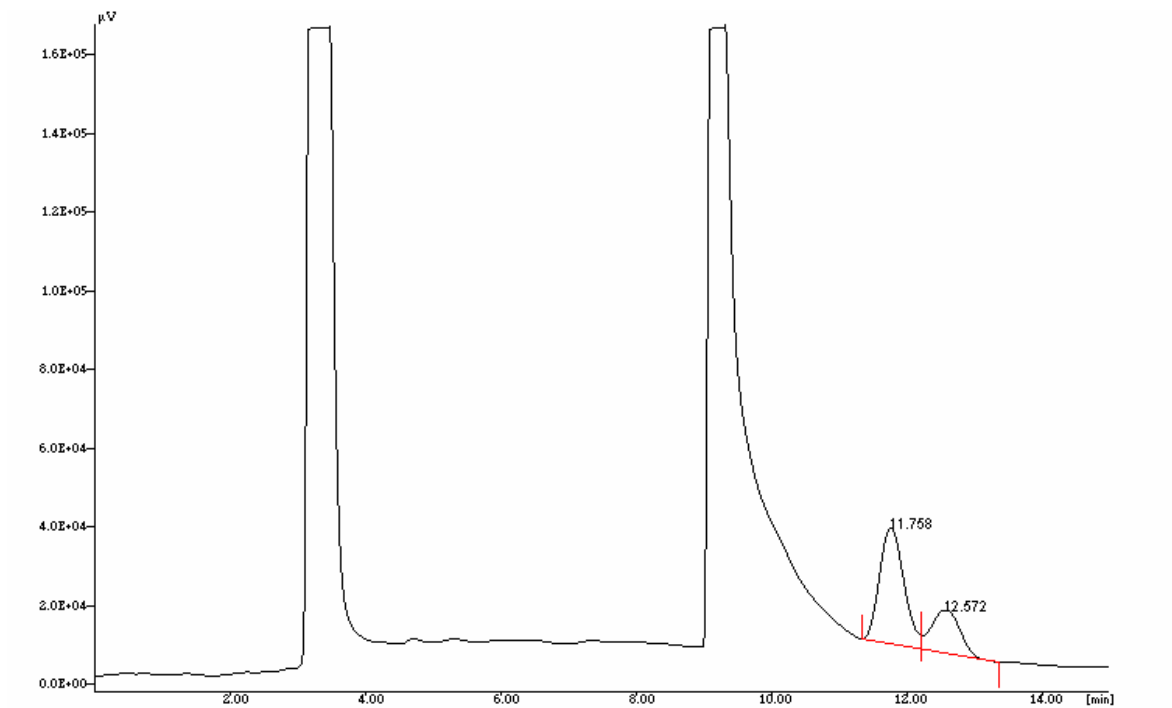


Figura 3. Cromatograma da fração manana: manose 11,758 min.;
glicose 12,572 min.

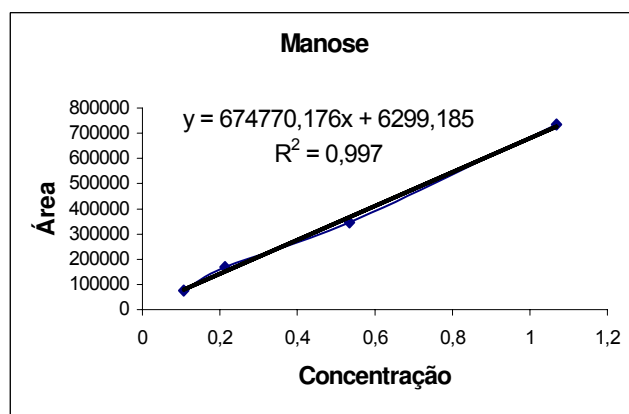
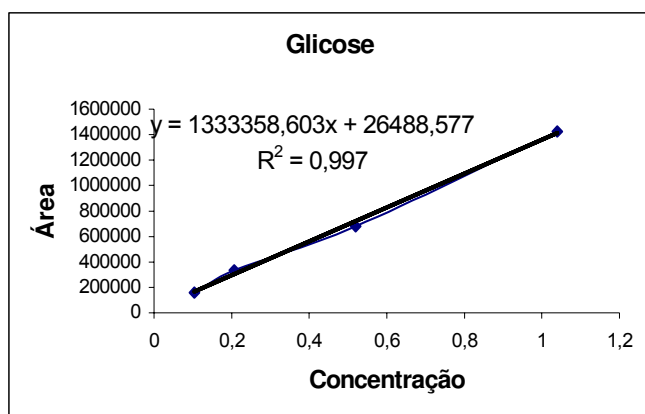


Figura 4. Equações das retas (glicose e manose) da fração manana.

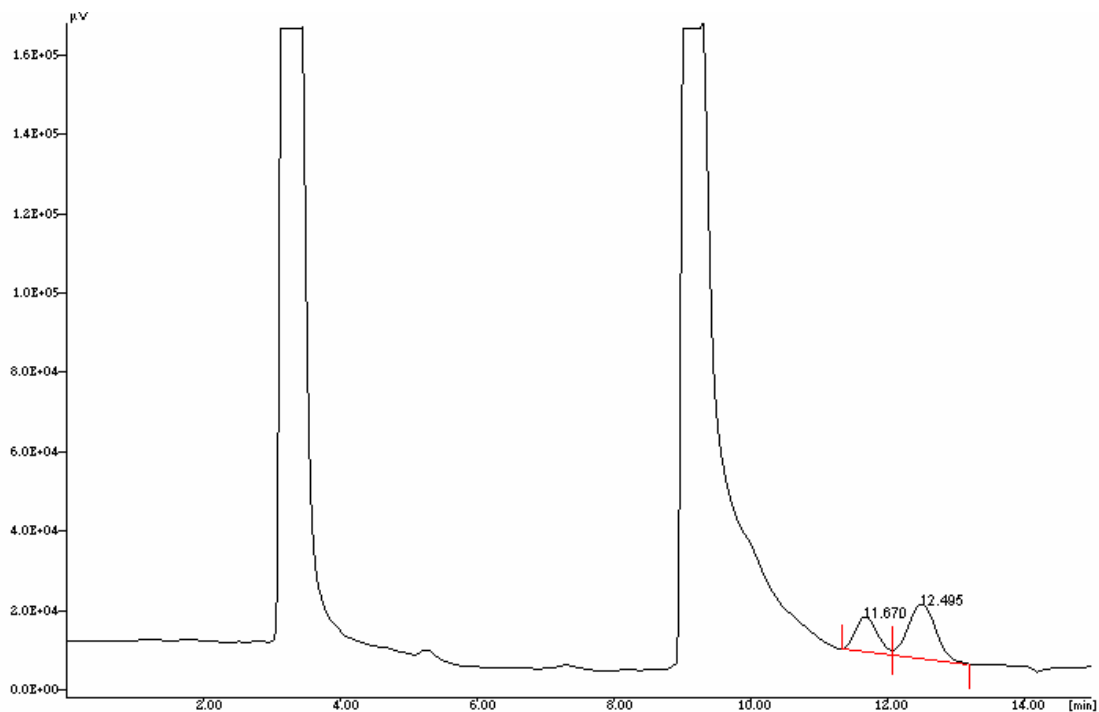


Figura 5. Cromatograma da parede celular (PC): manose 11,670 min.;
glicose 12,495 min.

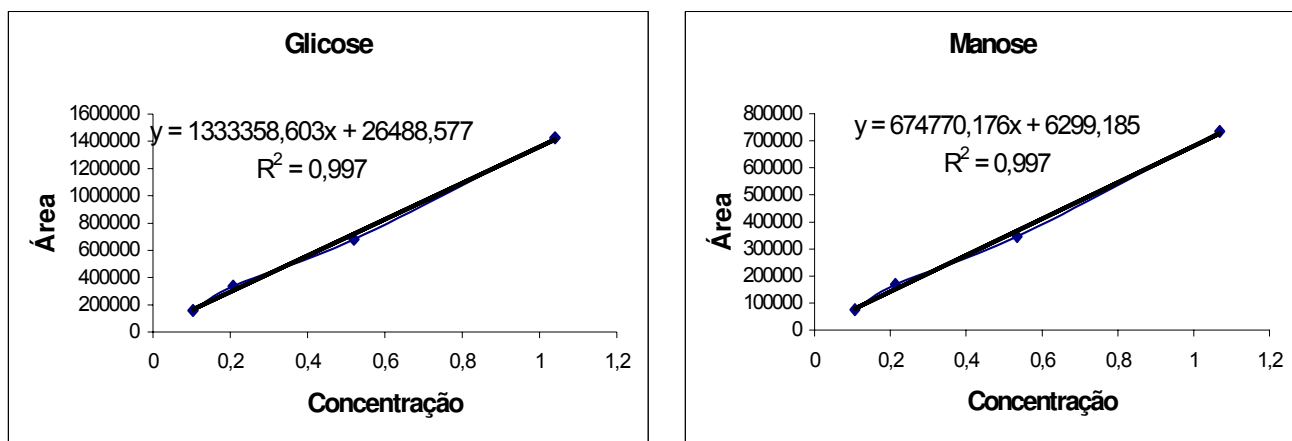


Figura 6. Equações das retas (glicose e manose) da parede celular(PC).

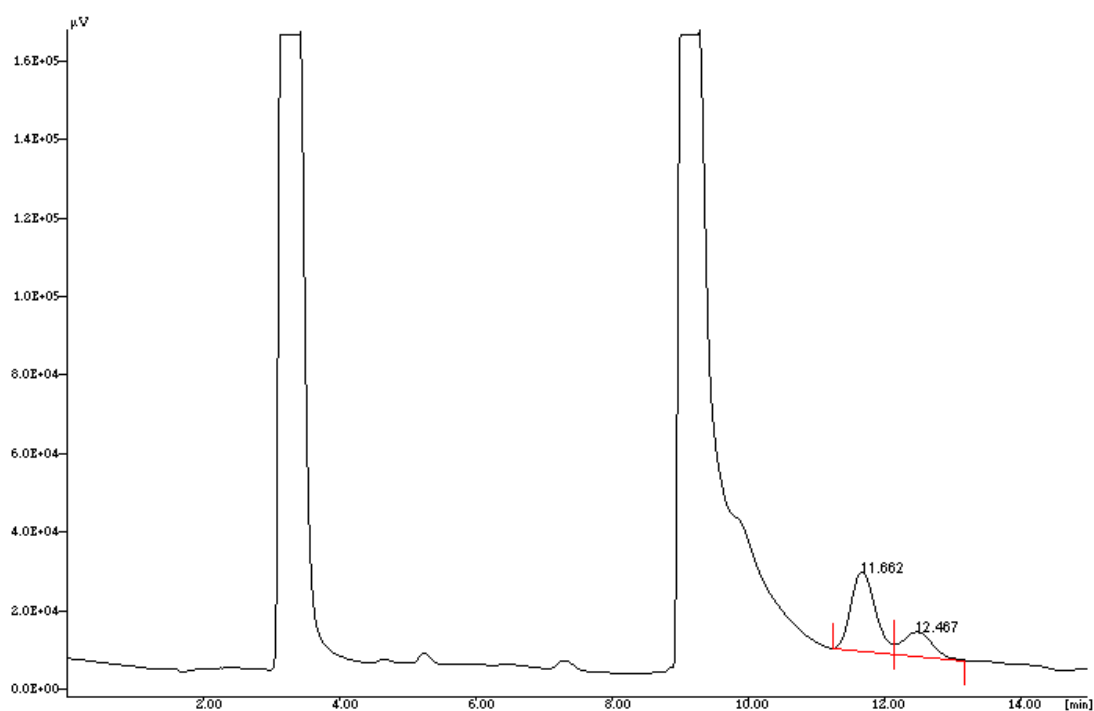


Figura 7. Cromatograma da fração glicoproteína: manose 11,662 min.;
glicose 12,467 min.

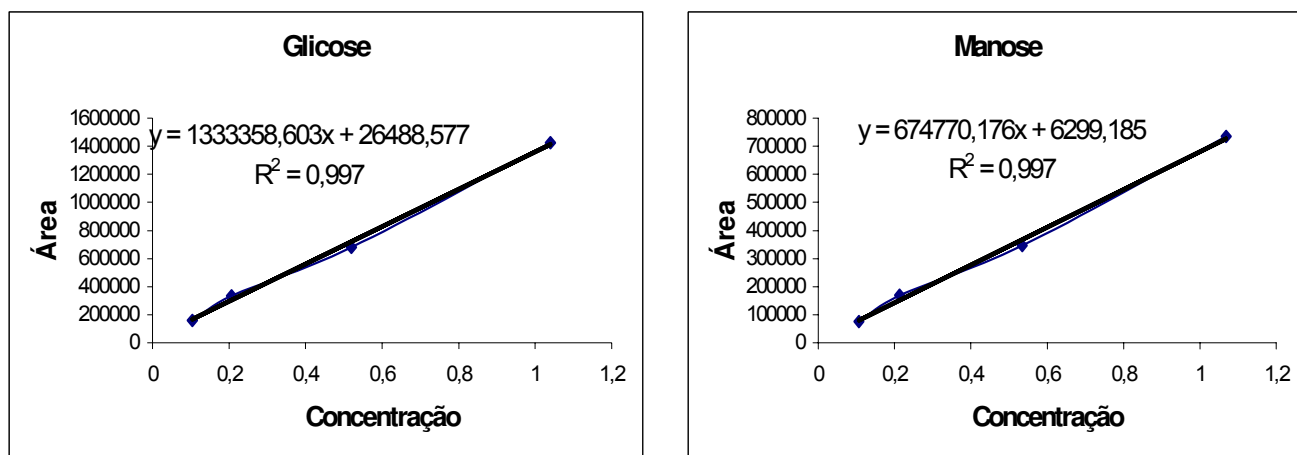


Figura 8. Equações das retas (glicose e manose) da fração glicoproteína.

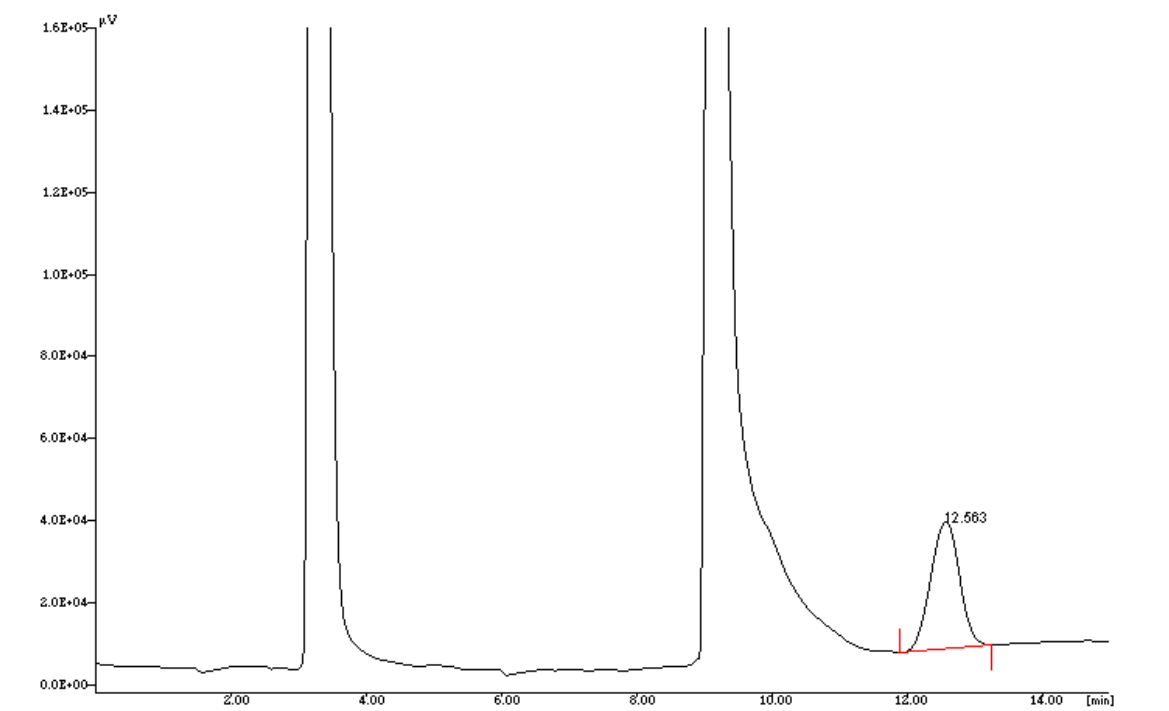


Figura 9. Cromatograma da fração glicana: glicose 12,563 min.

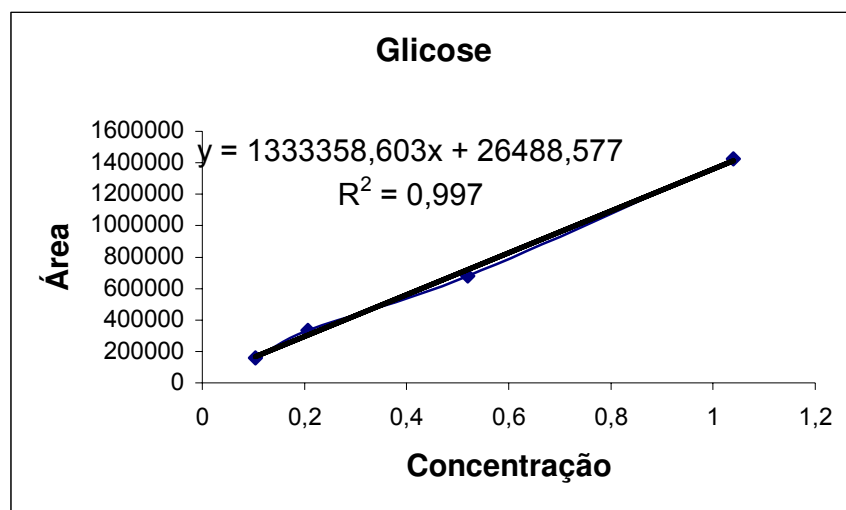


Figura 10. Equação da reta (glicose) da fração glicana.

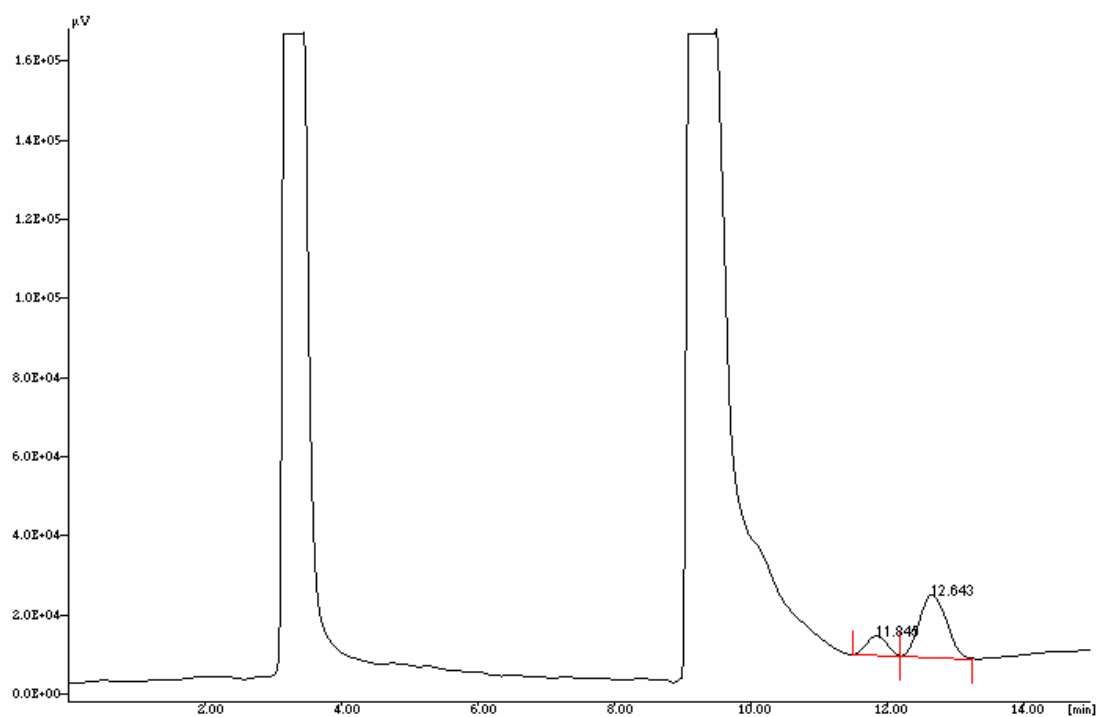


Figura 11. Cromatograma da fração glicana + manana: manose 11,845 min.; glicose 12,643 min.

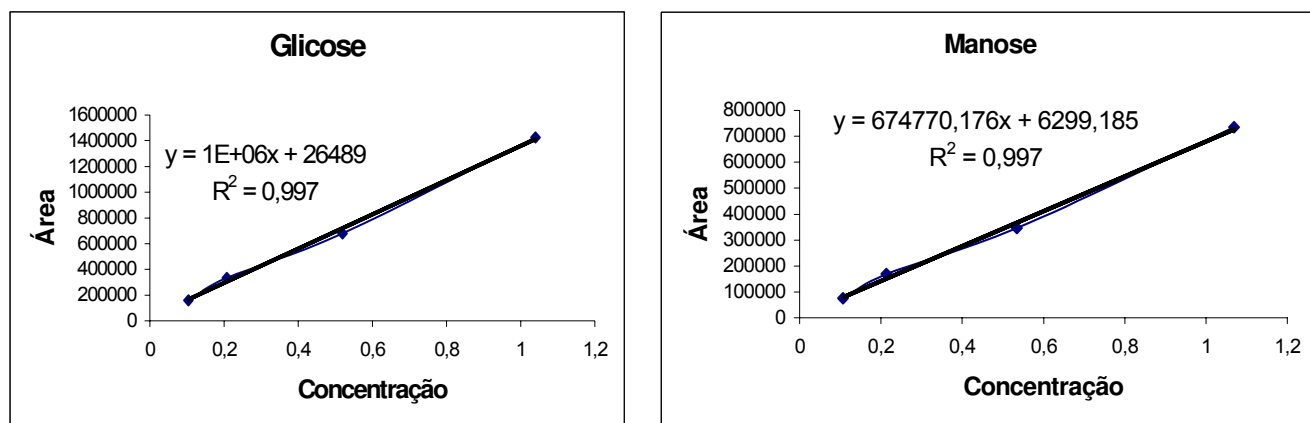


Figura 12. Equações das retas (glicose e manose) da fração glicana + manana.

ANEXO 4

Cromatogramas referentes a extração e quantificação dos ácidos graxos voláteis (AGV) da cadeia curta no conteúdo intestinal

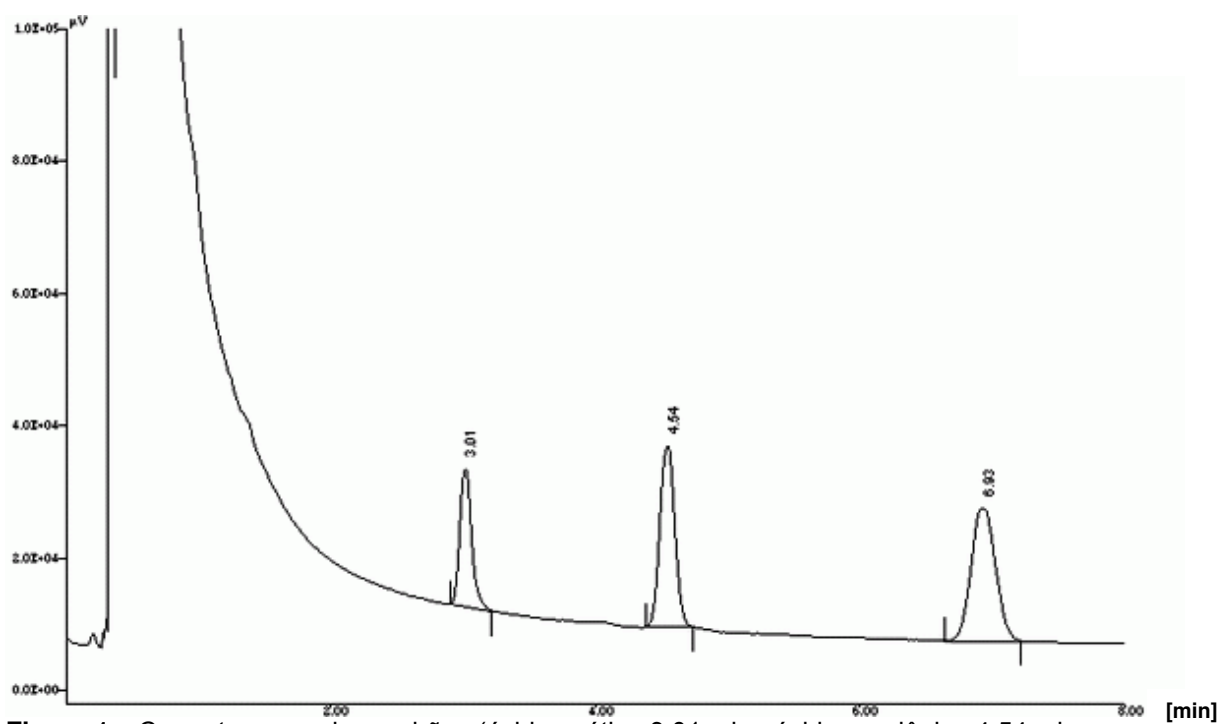


Figura 1: Cromatograma dos padrões (ácido acético 3,01 min.; ácido propiônico 4,54 min.; ácido butírico 6,93 min.)

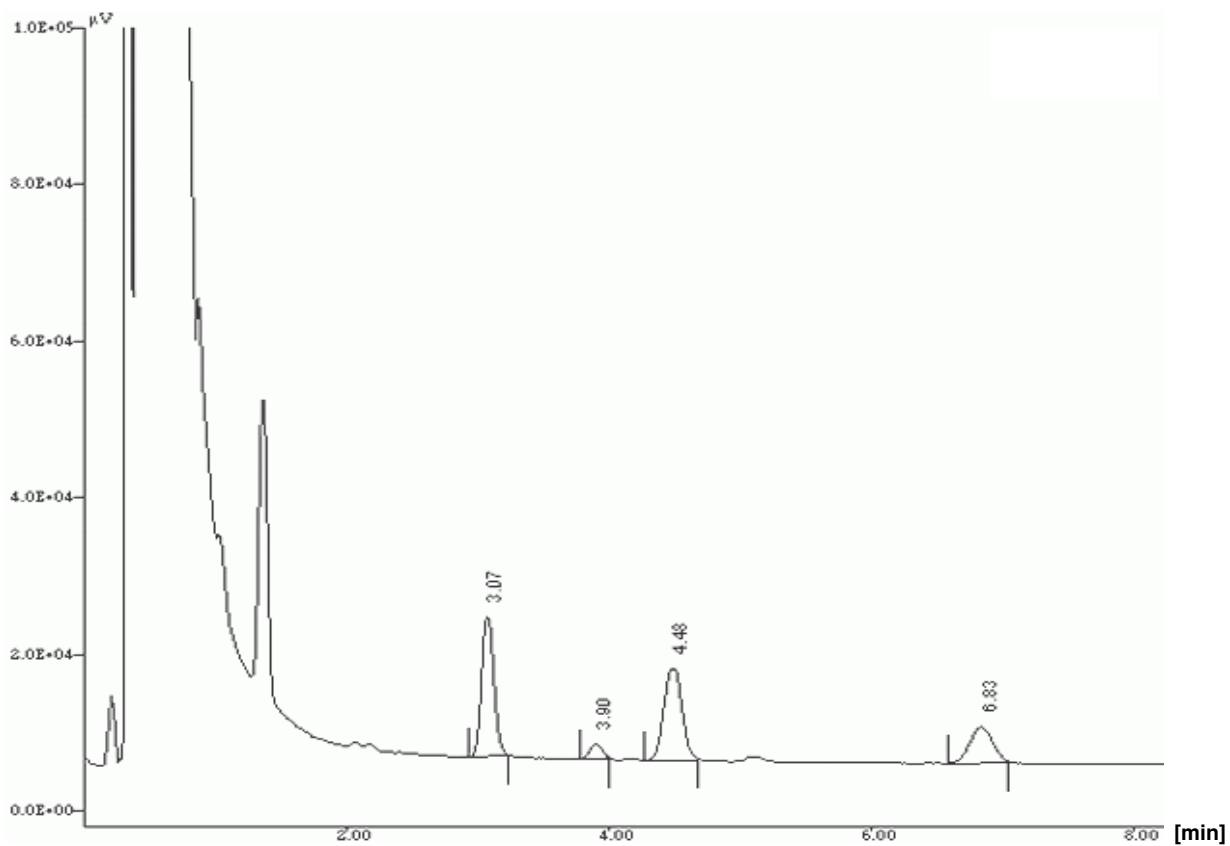


Figura 2: Cromatograma T_0 (ácido acético 3,07 min.; ácido propiônico 4,48 min.; ácido butírico 6,83 min.)

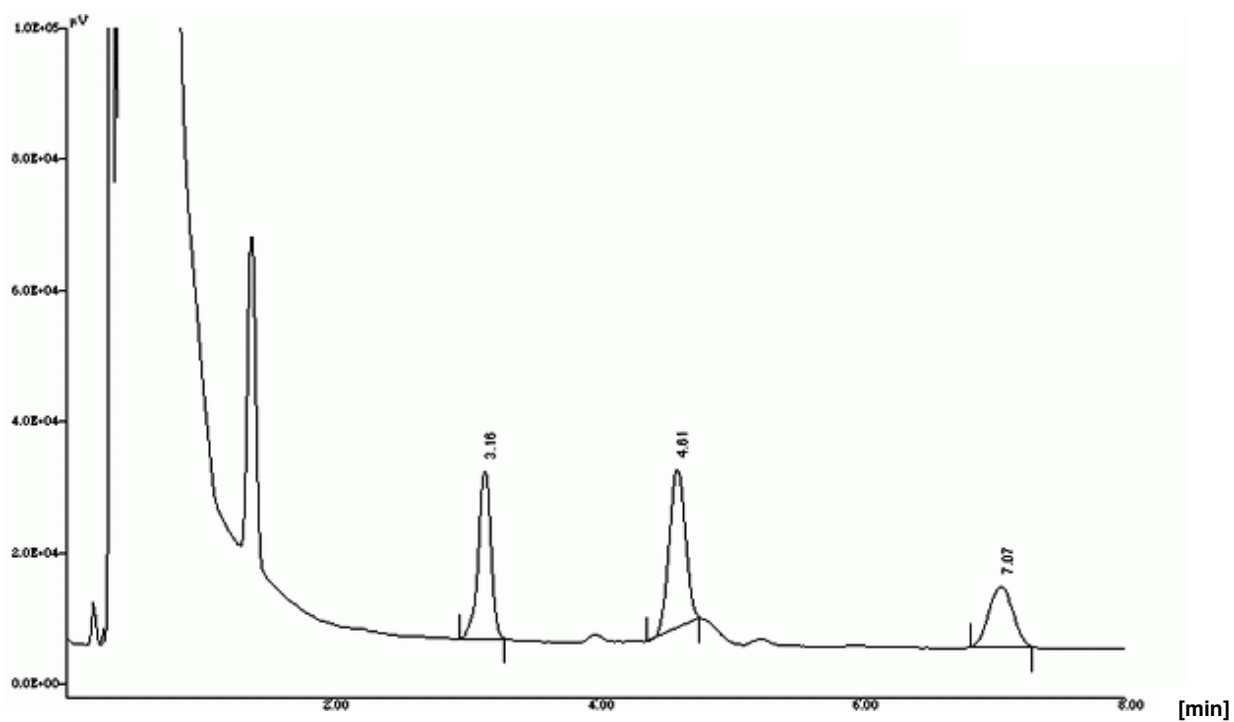


Figura 3: Cromatograma da dieta **AIN-P T₁₄** (ácido acético 3,16 min.; ácido propiônico 4,61 min.; ácido butírico 7,07 min.)

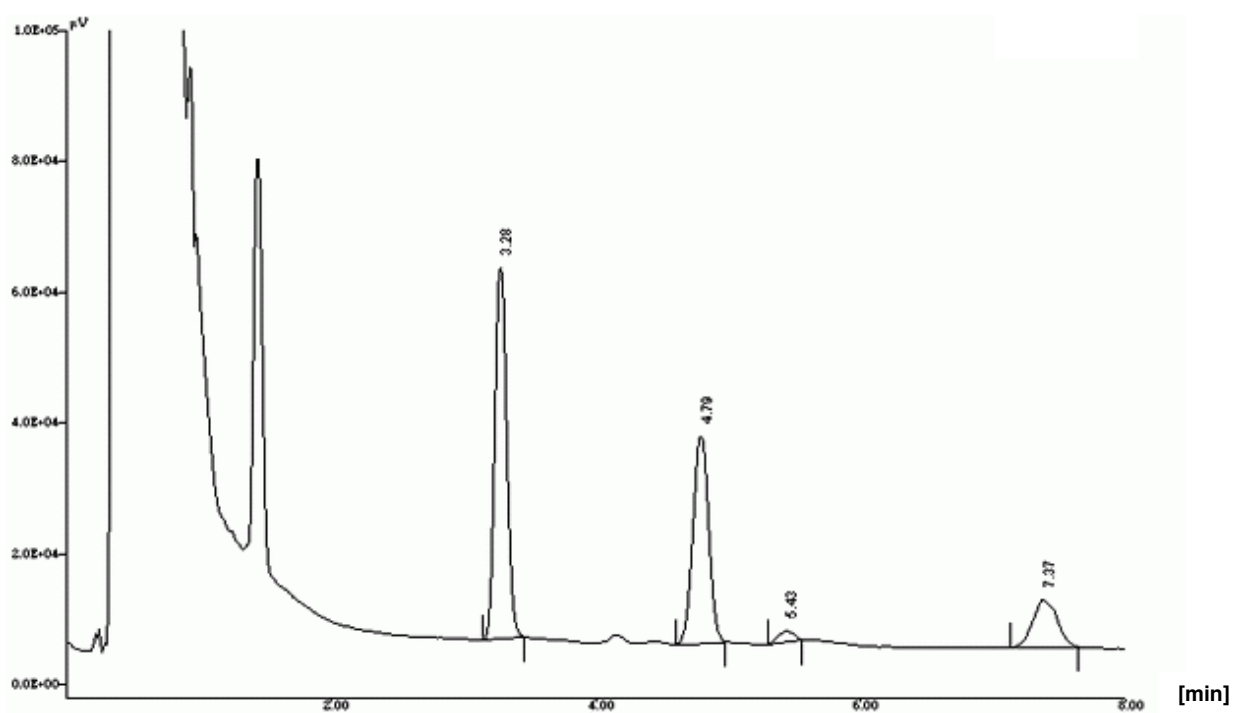


Figura 4: Cromatograma da dieta **AIN-P T₂₈** (ácido acético 3,28 min.; ácido propiônico 4,79 min.; ácido butírico 7,37 min.)

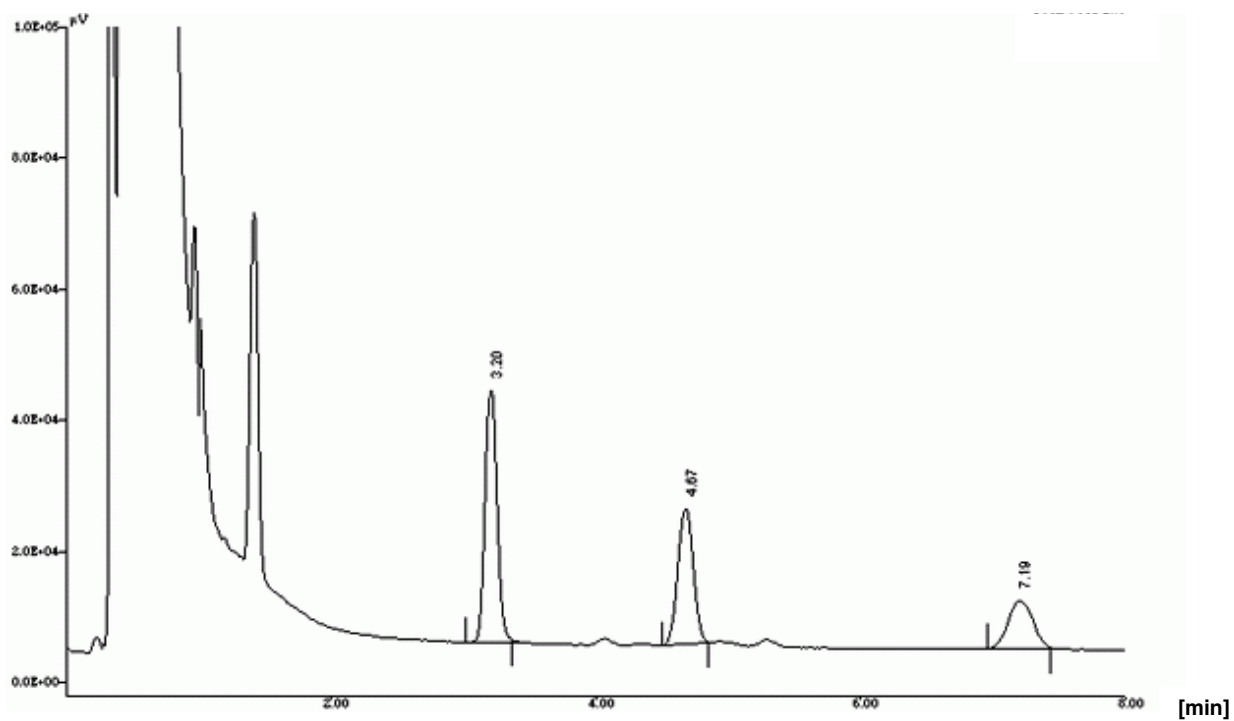


Figura 5: Cromatograma da dieta **AIN-M T₁₄** (ácido acético 3,20 min.; ácido propiônico 4,67 min.; ácido butírico 7,19 min.)

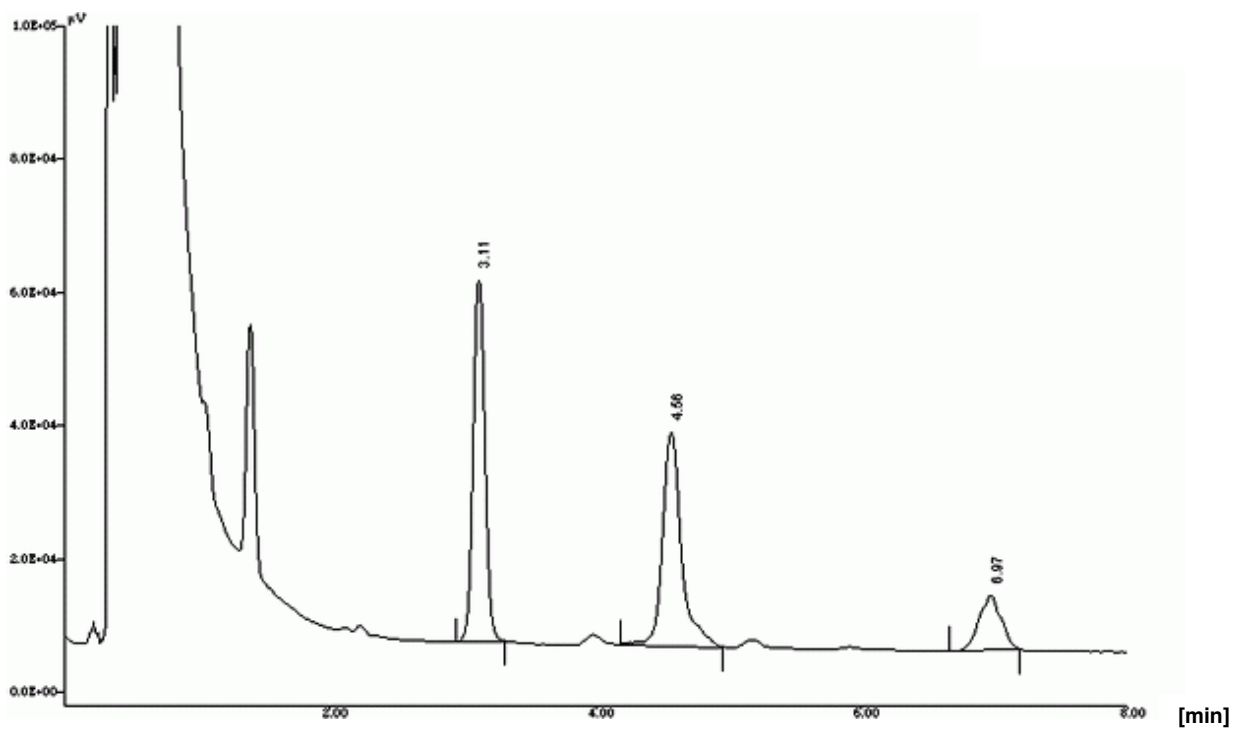


Figura 6: Cromatograma da dieta **AIN-M T₂₈** (ácido acético 3,11 min.; ácido propiônico 4,66 min.; ácido butírico 6,97 min.)

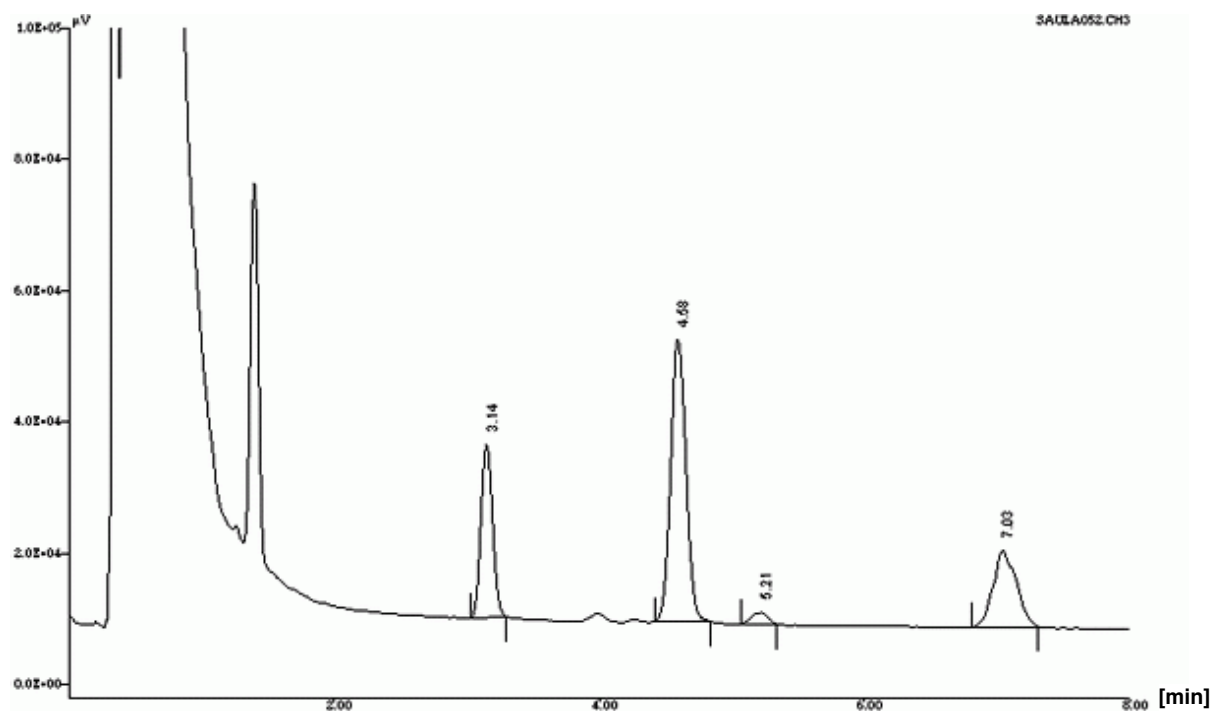


Figura 7: Cromatograma da dieta **G+M T₁₄** (ácido acético 3,17 min.; ácido propiônico 4,68 min.; ácido butírico 7,03 min.)

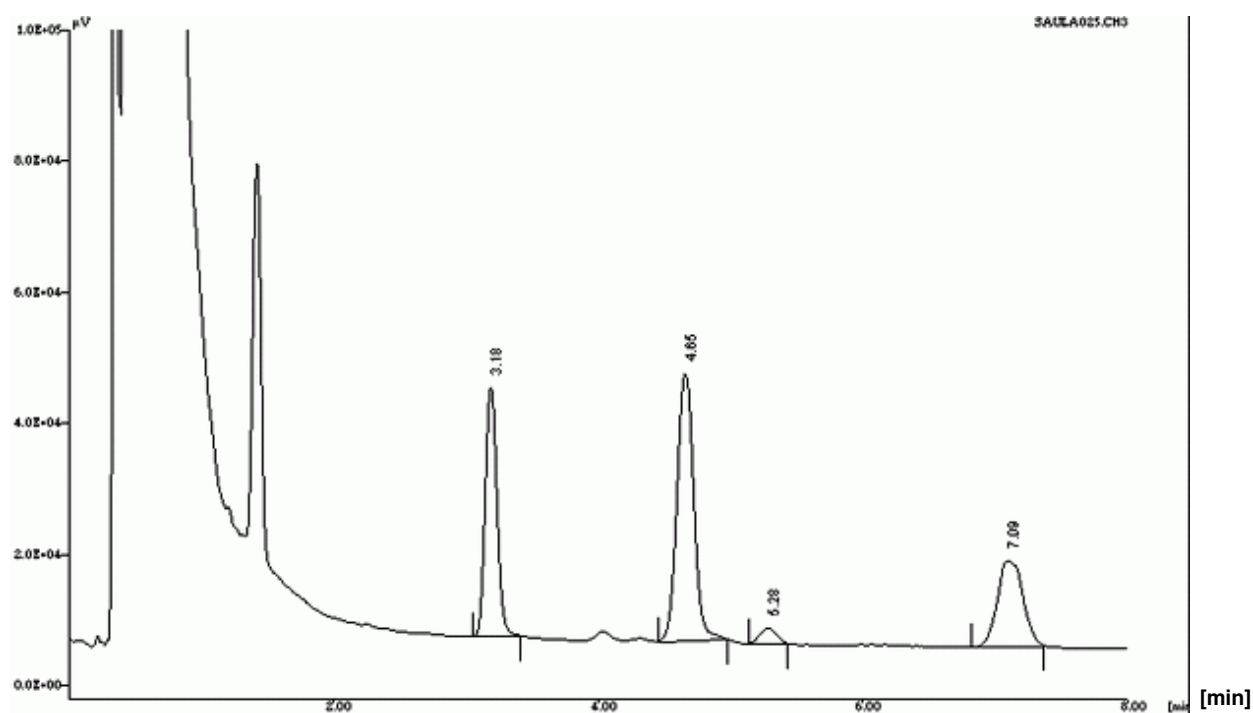


Figura 8: Cromatograma da dieta **G+M T₂₈** (ácido acético 3,18 min.; ácido propiônico 4,65 min.; ácido butírico 7,09 min.)

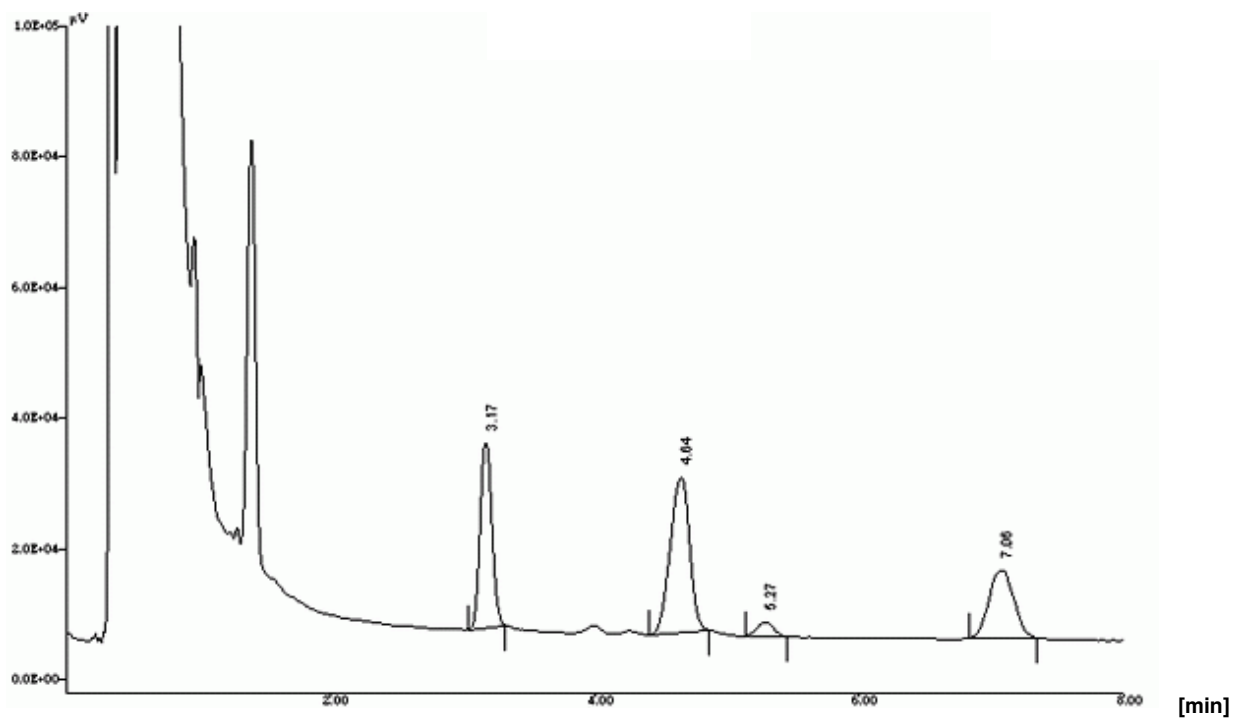


Figura 9: Cromatograma da dieta **GI T₁₄** (ácido acético 3,17 min.; ácido propiônico 4,64 min.; ácido butírico 7,06 min.)

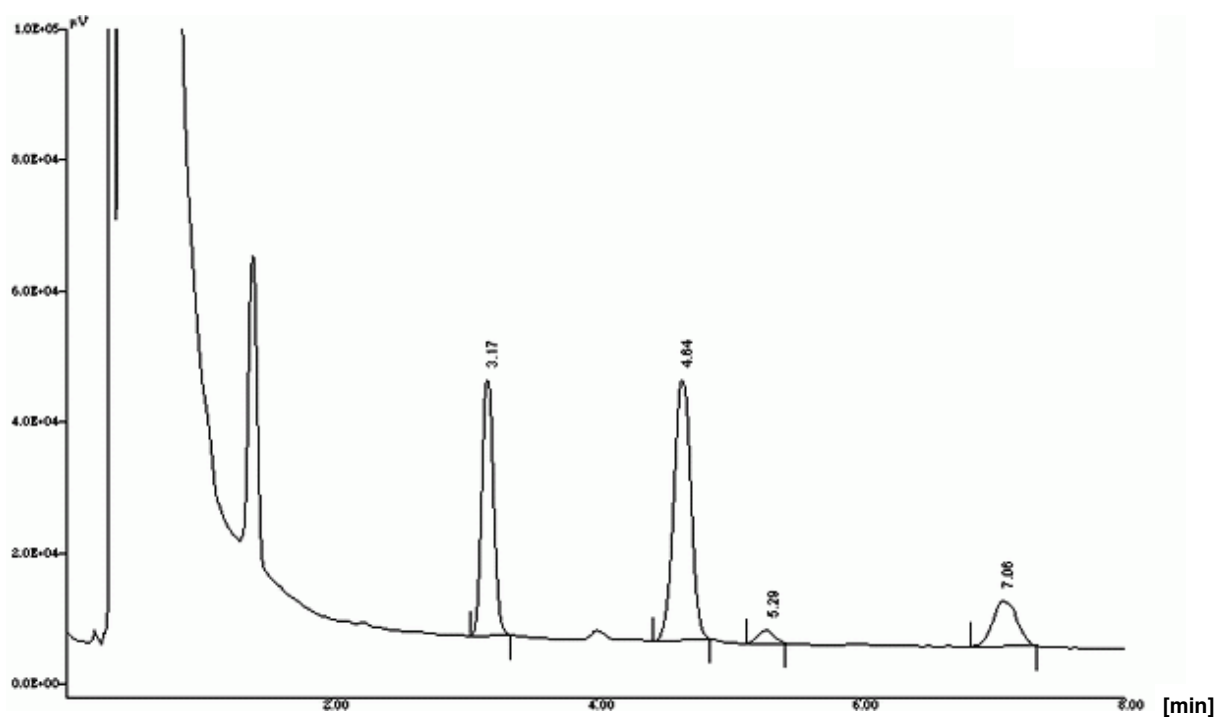


Figura 10: Cromatograma da dieta **GI T₂₈** (ácido acético 3,1 propiônico 4,64 min.; ácido butírico 7,06 min.)

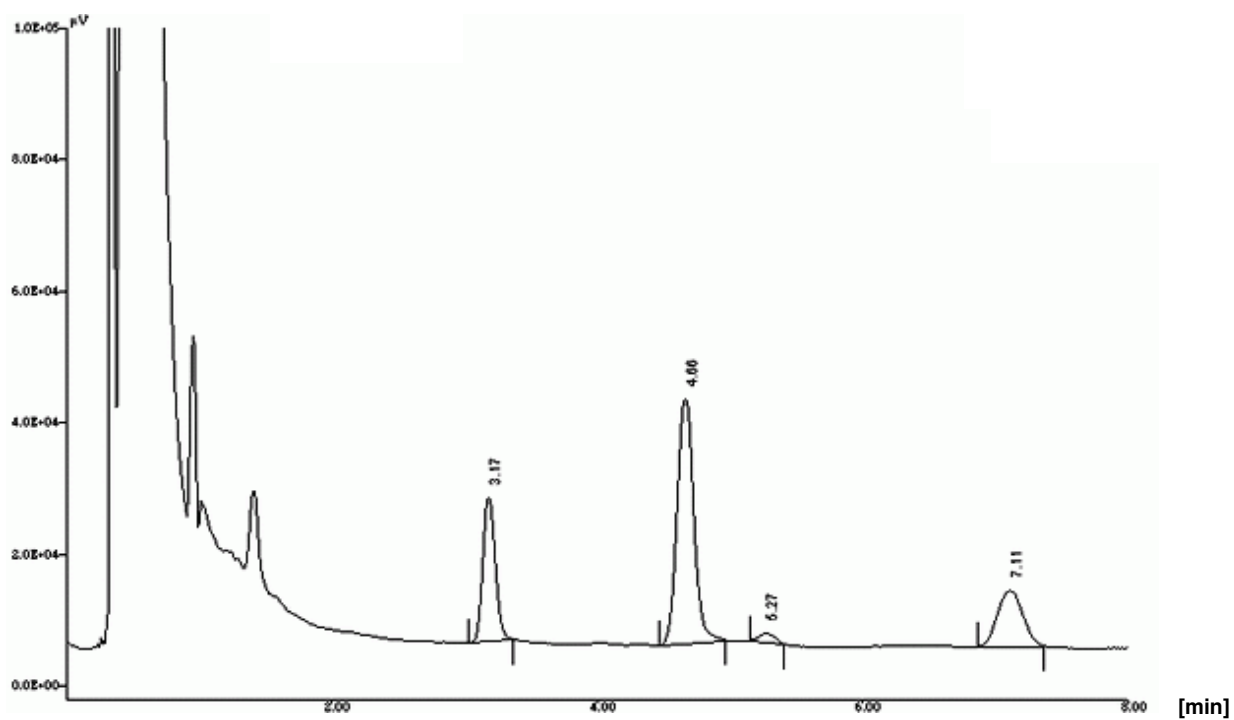


Figura 11: Cromatograma da dieta **MAN T₁₄** (ácido acético 3,17 min.; ácido propiônico 4,66 min.; ácido butírico 7,11 min.)

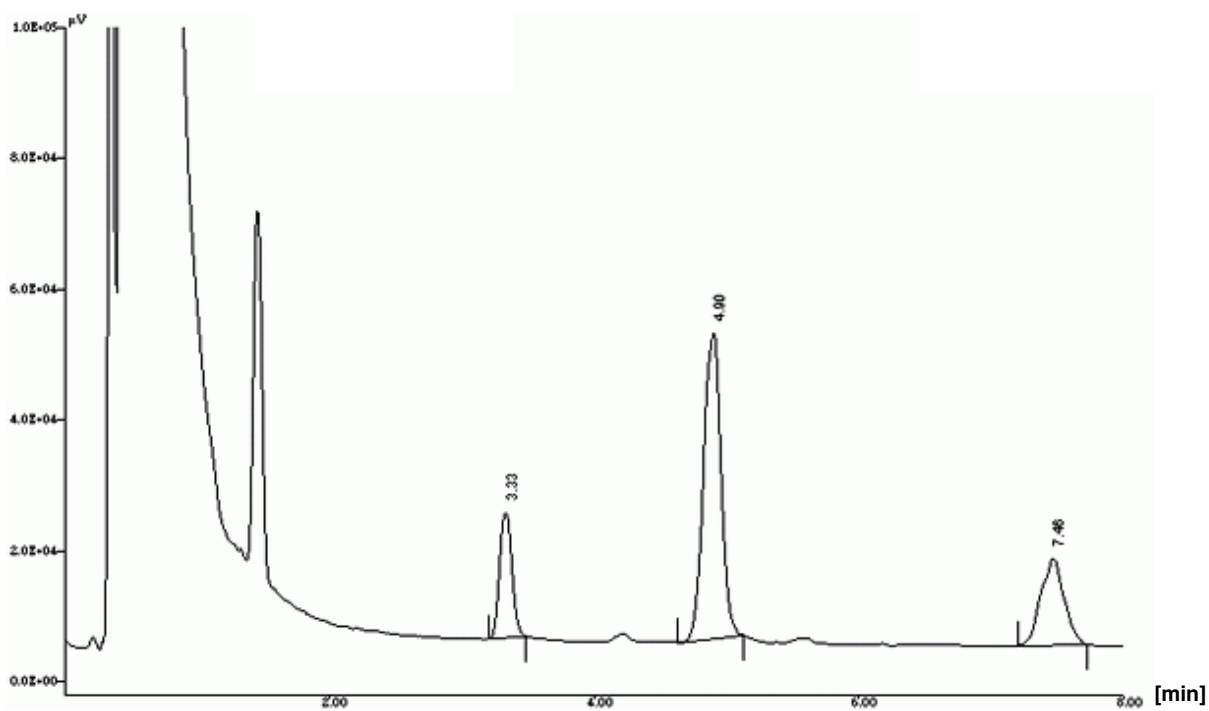


Figura 12: Cromatograma da dieta **MAN T₂₈** (ácido acético 3,33 min.; ácido propiônico 4,90 min.; ácido butírico 7,46 min.)

