Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

# Avaliação de efeitos fisiológicos da fração fibra alimentar dos grãos de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.) e linhaça (*Linum usitatissimum* L.).

**Andrea Carvalheiro Guerra Matias**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para a obtenção do título de Doutor em Saúde Pública.**

**Área de concentração: Nutrição**

**Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas**

**Co-orientador: Prof[a]. Dr[a]. Nágila Raquel Teixeira Damasceno**

**São Paulo**
**2007**

# Avaliação de efeitos fisiológicos da fração fibra alimentar dos grãos de amaranto e (*Amaranthus cruentus* L.) e linhaça (*Linum usitatissimum* L.).

**Andrea Carvalheiro Guerra Matias**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para a obtenção do título de Doutor em Saúde Pública.**

**Área de concentração: Nutrição**

**Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas**

**Co-orientador: Prof[a]. Dr[a]. Nágila Raquel Teixeira Damasceno**

**São Paulo**
**2007**

Dedico esta conquista aos grandes amores da minha vida.

Meu pai, José Luiz; minha mãe, Édina; e meu marido, Alexander**.**

"A ignorância afirma ou nega veementemente; a ciência duvida."

*Voltaire*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Alexander, pelo incentivo, paciência e dedicação hoje e sempre.

Aos meus pais, pelo esforço de formarem seus filhos apesar das dificuldades.

Ao Prof. José Alfredo, pela oportunidade e apoio constantes ao longo de toda minha formação acadêmica.

À Professora Nágila Damasceno pela co-orientação, correção e sugestões para melhoria do trabalho.

À Professora Elizabeth Torres pelo apoio, e disponibilidade da estrutura do Laboratório de Bromatologia, em especial para as análises de ácidos graxos.

Aos membros da banca examinadora, pela atenta e proveitosa contribuição na correção deste trabalho.

Ao Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, pela permissão do uso da Sala de experimentação animal. Agradeço a todos os funcionários, em especial ao Bioterista Robson Cruz pela orientação no manejo e acondicionamento dos animais ao longo de todo o ensaio biológico.

Aos colegas do Laboratório de Propriedades Funcionais dos Alimentos, Ana Carolina, Simone, Vanessa, Karina, Áurea, Lílian, Karoline, Bruna, Thaís, Suzana, Renné, Aline, Catarina, Karen e Alice.

À amiga Simone, pelo suporte técnico, sugestões e amizade em todos os momentos!

À amiga e Técnica de Laboratório Rosana, pela ajuda de TODAS as horas. Muito obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição da FSP.

A todos os funcionários do Departamento de Nutrição da FSP.

Aos funcionários da Comissão de Pós-graduação da FSP.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento deste projeto.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

## Resumo

Os grãos de linhaça e amaranto recebem grande atenção da população em decorrência de suas alegações nutricionais e funcionais à saúde. Uma vez que estes grãos apresentam significativos teores de fibras alimentares (28 e 10%, respectivamente), os efeitos fisiológicos benéficos associados a estas frações foram investigados por meio de parâmetros do metabolismo colônico (fermentativos) e lipídico em ensaio biológico com ratos (*Wistar*), divididos em quatro grupos (n=12) durante 28 dias. As dietas dos grupos Referência e Controle apresentaram 7% (p/p) de celulose, e as dietas dos grupos experimentais foram formuladas com: farinha desengordurada de linhaça; amaranto extrusado, de modo que apresentassem 7% de fibra alimentar (FA). Com exceção da dieta do grupo Referência, as demais apresentaram 0,5% de colesterol (p/p). Foram observados para os grupos Linhaça e Amaranto: aumento do peso do ceco e conteúdo; aumento da massa fecal úmida; aumento dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e diminuição do pH no conteúdo do ceco, indicando fermentação colônica. Os animais do grupo Linhaça apresentaram menor peso e colesterol hepático, porém, nenhuma alteração no colesterol plasmático e na excreção de colesterol e ácidos biliares nas fezes. Já os animais do grupo Amaranto apresentaram menor peso hepático, porém, nenhuma alteração do colesterol total do órgão. Neste grupo também não foi observada redução do colesterol plasmático, acompanhada do aumento da excreção do colesterol e redução dos ácidos biliares nas fezes. Sugere-se que o trofismo da parede do ceco está relacionado à produção de ácido butírico, principal substrato energético dos colonócitos, que contribui para uma mucosa mais resistente a patógenos e

carcinógenos. O mecanismo envolvido no efeito hepatoprotetor observado no grupo Linhaça pode estar relacionado à produção de ácido propiônico no cólon, uma vez que a literatura sugere que o mesmo pode estar envolvido na inibição da HMG-CoA redutase. Desconhecem-se, até o momento, os mecanismos que promoveram a menor excreção de ácidos biliares nas fezes no grupo Amaranto. De qualquer modo, as FAs do grão de linhaça e amaranto não foram capazes de promover efeito hipercolesterolemiante nas condições em que foi realizado este estudo. Conclui-se que as frações indigeríveis da linhaça e amaranto são benéficas para a saúde da mucosa intestinal.

Descritores: fermentação, mucosa intestinal, ácidos graxos de cadeia curta, metabolismo lipídico.

## Abstract

The flaxseed and amaranth grains are recognized by their nutritional and functional health attributes. These grains have significant contents of dietary fiber (28 and 10%, respectively), and the physiological effects related to these fractions were investigated by colonic fermentative and lipid metabolism parameters with rats (*Wistar*) distributed in five groups (n=12) during twenty-eight days. The diets of the Reference and Control groups contained 7% (w/w) of cellulose and the diets of the experimental groups were formulated with: defatted flaxseed flour and defatted extruded amaranth, in order to provide 7% dietary fiber (DF). With the exception of the Reference, the other diets received 0,5% cholesterol. The Flaxseed and Amaranth groups compared to the Control showed: greater weight of caecum and its contents; greater weight of feces (wet mass); increase of short chain fatty acids (SCFA) concentration and decrease of pH of cecal content, indicating colonic fermentation. The Flaxseed group showed lower liver hepatic weight and cholesterol, but no changes in plasmatic cholesterol, cholesterol fecal excretion, or bile acids fecal excretion. The Amaranth group exhibited lesser hepatic weight, along with no changes on hepatic cholesterol. Also, no plasma cholesterol reduction was observed, with the increase of fecal cholesterol excretion and decrease in fecal bile acid excretion. It is suggest that the caecum wall trophism was related to butiric acid production, main energy colonic cell substrate that fosters a more resistant mucosa to pathogens and carcinogens. The mechanism involved in liver protecting effect, observed in the Flaxseed group, could be related to propionic acid production, since that it is suggest in the literature that this fatty acid could be envolved in the HMG-

CoA reductase inhibition. Until this moment, the mechanisms that promoted the lesser bile acid excretion by the Amaranth group were not kwon. The DFs of flaxseed and amaranth grains were unable to promote hypocholestelolemic effects under the present assay conditions. It could be concluded that DFs of flaxseed and amaranth grains are beneficial to the health of the intestinal mucosa.

Keywords: fermentation, intestinal mucosa, short chain fatty acids, lipidic metabolism

# ÍNDICE

**1 INTRODUÇÃO** *1*
1.1 FIBRA ALIMENTAR *2*
1.1.1 Breve histórico e definição *2*
1.1.2 Considerações sobre os efeitos fisiológicos das fibras alimentares *6*
1.2 MECANISMOS DE AÇÃO PROPOSTOS PARA AS FIBRAS ALIMENTARES *9*
1.2.1 Fermentação colônica *9*
1.2.2 Excreção fecal de ácidos biliares e colesterol *10*
1.2.3 Capacidade de retenção de água e aumento do bolo fecal *11*
1.3 AMARANTO E LINHAÇA *12*
1.3.1 O amaranto *13*
1.3.2 A linhaça *14*
1.4 JUSTIFICATIVA *16*
**2 OBJETIVOS** *17*
2.1 OBJETIVO GERAL *18*
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS *18*
**3 MATERIAL E MÉTODOS** *19*
3.1 MATÉRIAS-PRIMAS *20*
3.1.1 Obtenção e pré-tratamento *20*
3.2 ENSAIO BIOLÓGICO *22*
3.3 DIETAS *26*
3.3.1 Composição centesimal das matérias primas *26*
3.3.2 Formulação das dietas *27*
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS *29*
3.4.1 Composição centesimal das matérias-primas, dietas e fezes *29*
3.4.2 Peso das fezes *30*
3.4.3 Determinação dos lipídeos plasmáticos *30*
3.4.4 Determinação de lipídeos totais e colesterol hepático. *31*
3.4.5 Determinação de colesterol nas dietas e fezes dos animais *33*
3.4.6 Determinação dos ácidos biliares nas fezes *33*
3.4.7 Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta *34*

3.4.8 Grau de fermentação ____ *35*
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA ____ *36*
**4 RESULTADOS** ____ *37*
4.1 Monitoramento do ganho de peso e consumo de dieta pelos animais ____ *38*
4.4 Parâmetros fermentativos ____ *39*
4.5 Lipídeos plasmáticos ____ *44*
4.6 Excreção fecal de colesterol e ácidos biliares ____ *48*
4.7 CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS DE ESTUDO ____ *49*
**5 DISCUSSÃO** ____ *50*
5.1 CONSUMO ____ *51*
5.2 PARÂMETROS FERMENTATIVOS ____ *52*
5.3 METABOLISMO LIPÍDICO ____ *56*
**6 CONCLUSÕES** ____ *68*
**7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ____ *71*

**ANEXOS**

**ANEXO I** - Aprovação do Comitê e Ética.

**ANEXO II** - Adaptação das gaiolas para coleta das fezes.

**ANEXO III –** Extrusora de Laboratório RXPQ-Labor24.

**ANEXO IV** - Verificação da normalidade das variáveis pelo de teste de Komogorov Smirnov.

**ANEXO V** - Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos dos animais do grupo Referência.

**ANEXO VI** - Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos dos animais do grupo Controle.

**ANEXO VII**- Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos dos animais do grupo Linhaça.

**ANEXO VIII**- Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos dos animais do grupo Amaranto.

**ANEXO IX** - Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos e metabolismo lipídico dos animais do grupo Referência.

**ANEXO X** - Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos e metabolismo lipídico dos animais do grupo Controle.

**ANEXO XI** - Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos e metabolismo lipídico dos animais do grupo Linhaça.

**ANEXO XII**- Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos e metabolismo lipídico dos animais do grupo Amaranto.

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1** Efeitos fisiológicos associados ao consumo de fibras alimentares_____7

**Quadro 2** Produção e distribuição de ácidos graxos de cadeia curta em algumas frações de fibras alimentares_____8

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Composição centesimal das farinhas do grão de amaranto integral (*Amaranthus cruentus L.*) desengordurada e extrusada, e farinha do grão de linhaça semi-desengordurada (*Linum inusitassimum*) e desengordurada_____26

**Tabela 2** - Formulações estimadas das dietas Referência, Controle colesterol, Linhaça, Amaranto(g/100g)_____28

**Tabela 3** – Composição das dietas dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto, em base seca (g/100g)_____29

**Tabela 4** – Ganho de peso, consumo total e médio, e Cociente de Eficiência Alimentar (CEA) dos animais dos Grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto, após 28 dias de administração das dietas_____38

**Tabela 5** - Consumo da fração FA, fração FA nas fezes e porcentagem de fermentação da FA para os animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto_____44

**Tabela 6** – Concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), triglicérides (TG) e frações colesterol (HDL-c, não HDL-c) dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto_____45

**Tabela 7** - Colesterol e Lipídeos hepáticos dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto_____47

**Tabela 8** – Colesterol e ácidos biliares excretados nas fezes dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto_____49

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Declínio do consumo de fibras alimentares pelos humanos (Adaptado de de KLIRKS, 1978)_____2

**Figura 2 -** Fluxograma do delineamento do ensaio biológico_____25

**Figura 3** - Peso ajustado (g/100g peso corporal) para o ceco cheio, ceco vazio, e conteúdo do ceco para os grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto_____39

**Figura 4** – pH do conteúdo do ceco dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto_____40

**Figura 5** – Peso das fezes úmidas e dessecadas, correspondente a 4 dias de coleta, dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto_____ 41

**Figura 6** – Concentração de AGCC (ácido acético, propiônico e butírico) no conteúdo do ceco, dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto_____42

**Figura 7** – Cromatograma obtido por Cromatografia Gasosa para identificação e quantificação dos ácidos acético, propiônico e butírico. _____ 43

**Figura 8** – Peso do fígado dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto_____46

**Figura 9** – Cromatograma obtido por Cromatografia de alta eficiência para a identificação e quantificação do colesterol hepático e fecal_____48

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AGCC -** ácidos graxos de cadeia curta

**CEA –** Cociente de eficácia alimentar

**CLAE -** Cromatografia liquida de alta eficiência

**CT -** colesterol total

**FA -** Fibra alimentar

**HDL-c** –colesterol associado à Lipoproteína de alta densidade

**HMG-CoA** – Hidroximetil Glutaril Coenzima A

**LDL –c –** colesterol associado **à** Lipoproteína de baixa densidade

**MO -** Matéria orgânica

**Não HDL-c** - fração do colesterol não representada pelo colesterol associado à Lipoproteína de alta densidade (não HDL- c= VLDL-c + LDL-c)

**p/p** – peso por peso

**TG -** triglicérides

**VLDL - c –** colesterol associado à Lipoproteína de muito baixa densidade

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FIBRA ALIMENTAR

### 1.1.1 Breve histórico e definição

Presume-se que o consumo de fibras alimentares (FAs) no período paleolítico apresentava-se em torno de 46 g ao dia (EATON e KONMER, 1985). A Figura 1 mostra a evolução do consumo de FAs ao longo dos últimos 100.000 anos.

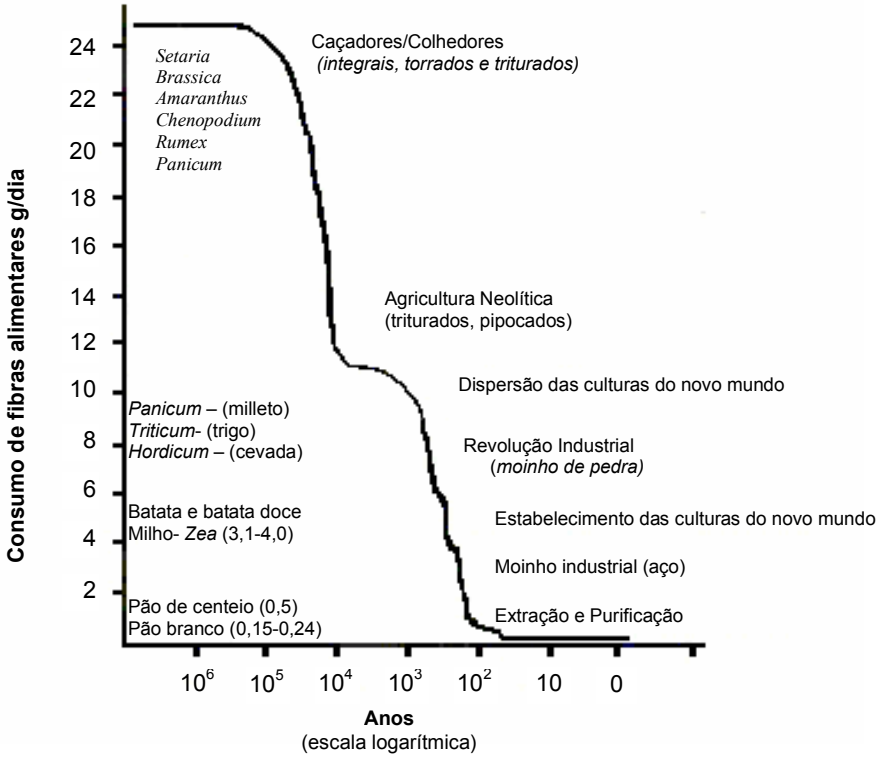


**Figura 1** – Declínio do consumo de fibras alimentares pelos humanos (Adaptado de KLIKS, 1978)

No século V a.C, Hipócrates já recomendava alimentos ricos em Fibras Alimentares (FA) para combater a constipação. No século IX, o médico persa Hakin fazia a mesma recomendação. Shakespeare, em sua peça teatral Corialanus de 1610, também fez referência à ação dos farelos de cereais. Todavia, até a primeira metade do século XX pouco, ou ocasional interesse foi direcionado às fibras alimentares, destacando-se neste período as descobertas das vitaminas, minerais e outros nutrientes. O interesse científico associado à FA tornou-se efetivo somente em meados dos anos 60 por meio de estudos epidemiológicos (BURKITT e SPILLER, 1993). A partir de então diversos trabalhos relacionaram o consumo de FA à menor incidência de doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, apendicite, constipação, diverticulite, cálculo vesicular e hemorróidas (ROBERFROID, 1999). Desse modo, o papel das FAs em saúde e nutrição tem estimulado muitos estudos e ganhado ao longo dos anos grande atenção pública.

Originariamente, a fibra era descrita como um componente da parede celular das plantas, que simplesmente passava inalterado pelo intestino delgado e promovia o aumento do bolo fecal. Atualmente, são reconhecidos diversos efeitos fisiológicos atribuídos às fibras.

Historicamente a definição para FA vem sendo estabelecida como o resultado do balanço entre seus efeitos fisiológicos e a capacidade dos métodos analíticos. Várias definições são propostas, todavia não há um consenso entre as várias organizações internacionais (DE VRIES e RADER, 2005). Dentro deste contexto, apesar da definição ser continuamente modificada ao longo dos anos é relevante

destacar que o termo FA é um conceito nutricional e não uma descrição exata de um componente da dieta (FAO/OMS, 1998).

O termo FA foi primeiramente proposto por HIPSLEY em 1953, se referindo a carboidratos e componentes associados à dieta resistentes à digestão, em substituição ao termo "fibra bruta" comumente utilizado para a alimentação animal. TROWELL (1972) definiu FA como "os componentes da parede celular dos vegetais que resistem à digestão pelas enzimas e secreções digestivas humanas, incluindo a celulose, hemicelulose, pectina e lignina". Esta definição foi modificada em 1976, quando foram incluídos os componentes não digeríveis que não fazem parte da parede celular, tais como as gomas e as mucilagens (TROWELL e col. 1976). Esta definição foi bem aceita pela comunidade científica, se adequando às pesquisas em saúde e comunidade regulatória por mais de três décadas (SOUTHGATE, 1992; AACC, 2001; DE VRIES e RADER, 2005; JONES e col., 2006).

O método de quantificação das FAs enzímico-gravimétrico destacou-se pela acurácia em simular o comportamento digestivo humano, e podendo ser aplicado a todos os alimentos. Após estudos inter-laboratoriais de validação, em 1985 foi adotado como método oficial pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (DE VRIES e RADER, 2005).

A *American Association of Cereal Chemists* (AACC) estabeleceu um comitê em 1988, com o intuito de discutir a definição de FA, que foi sugerida em 2000: "FA é a parte comestível de plantas ou carboidratos análogos que são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado com fermentação completa ou parcial no intestino grosso, e inclui polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina, e substâncias

vegetais associadas. A FA promove efeitos fisiológicos benéficos incluindo laxativo e/ou atenuação da hipercolesterolemia e/ou atenuação da hiperglicemia" (AACC, 2001).

Paralelamente em 2000, a Divisão de Alimentos e Nutrição do Instituto de Medicina (*Intitute of Medicine*-IOM) da Academia Nacional norte americana formou um grupo de discussão, que em 2002, propôs duas definições: "fibra funcional" e "fibra alimentar", sendo que "fibra alimentar consiste de carboidratos não digeríveis e lignina que são intrínsecos e intactos nos vegetais" e "fibra funcional consiste de carboidratos não digeríveis isolados adicionados aos alimentos que exercem efeitos fisiológicos benéficos em humanos" e "fibra total é a soma de fibra alimentar e funcional" (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2005)

O Comitê de Nutrição e alimentos para fins especiais do *Codex Alimentarius*, em 2004, divulgou uma discussão com propostas para a definição de FA e avaliação dos métodos analíticos. A seguir a proposta é transcrita, sendo que os conteúdos em colchetes ainda estão em discussão (FAO/WHO, 2004):

"A FA constitui-se de polímeros de carboidratos com grau de polimerização maior que 3 [ou10], os quais não são digeridos e absorvidos no intestino delgado. A FA consiste de um ou mais polímeros de carboidratos comestíveis ocorrendo naturalmente no alimento tal como é consumido, ou polímeros de carboidratos obtido do material sem processamento por meios físicos, enzimáticos ou químicos, ou de polímeros de carboidratos sintéticos. A FA geralmente tem propriedades tais como: diminuição da velocidade do trânsito intestinal e aumento do volume fecal, estimulação da fermentação colônica, redução do colesterol total e frações LDL ou

redução das taxas de insulina. O material considerado como FA deve ter pelo menos uma dessas propriedades" (DE VRIES e RADER, 2005).

Todas estas definições têm gerado discussão, apresentando vantagens e limitações. Dentre os pontos que levantam as maiores discussões destaca-se a questão dos efeitos fisiológicos das FA, uma vez que não há consenso sobre os efeitos fisiológicos específicos, ou qual conjunto de efeitos devem ser observados em uma fração para que está seja considerada FA, ou no caso da definição da IOM, Fibra funcional (DE VRIES e RADER, 2005).

### 1.1.2 Considerações sobre os efeitos fisiológicos das fibras alimentares

Embora as fibras alimentares sejam geralmente consideradas como um grupo (fibras solúveis e insolúveis), elas exercem efeitos fisiológicos distintos, em qualidade e intensidade (WONG e col. 2006; HILLMAN, 1985; REDDY e col., 1980, SOUTHGATE, 1976). Dentre as características que distinguem as frações da FA entre si destacam-se: a diferença na composição e ordem dos monossacarídeos, o número de ligações glicosídicas, o grau de polimerização (e conseqüente grau de viscosidade) e as configurações de cadeia (MONRO, 2000).

No Quadro 1 são apresentados, resumidamente, alguns efeitos fisiológicos atribuídos às fibras alimentares.

**Quadro 1** - Efeitos fisiológicos associados ao consumo de fibras alimentares.

| | |
|---|---|
| Fermentação colônica | - produção de ácidos graxos de cadeia curta<br>- redução do pH<br>- aumento da massa bacteriana<br>- crescimento seletivo de bactérias |
| Efeitos no trânsito intestinal | Aumento da velocidade do trânsito intestinal<br>- aumento do volume fecal<br>- tempo de residência de produtos tóxicos |
| Metabolismo lipídico | Efeito hipercolesterolemiante<br>- redução de colesterol no plasma e no fígado<br>- estímulo da excreção de ácidos biliares e colesterol. |
| Metabolismo glicêmico | Melhora nos níveis séricos de glicose<br>- retardo do esvaziamento gástrico<br>- dificuldade no acesso das enzimas digestivas ao carboidrato glicêmico, e da glicose à mucosa do intestino delgado. |
| Fome e saciedade | - Retardo do esvaziamento gástrico, pelo aumento da hidratação da fibra |
| Biodisponibilidade de minerais | - Intestino delgado**:** diminuição da absorção de minerais pelo efeito físico e sequestrante.<br>- Intestino grosso**:** aumento da biodisponibilidade pela acidificação do meio. |
| Compostos bioativos | - Capacidade antioxidante. |

Fonte: GOÑI e MARTÍN-CARRÓN (2001) e FAO/OMS (1998).

O grau de polimerização de uma fração, por exemplo, está relacionado com a sua capacidade viscosa (capacidade de formar gel), a qual irá influenciar diretamente

seu efeito fisiológico (EVANS e col., 1992). Outro exemplo das diferentes frações de FA quanto à promoção de efeitos fisiológicos, é o perfil de ácidos graxos de cadeia curta, gerados como produto da sua fermentação colônica. Este perfil difere significativamente entre as diferentes frações de FA. O Quadro 2 apresenta a produção e distribuição de ácidos graxos de cadeia curta para as frações goma xantana, goma arábica, amido resistente e β-glucanas.

**Quadro 2** - Produção e distribuição de ácidos graxos de cadeia curta em algumas frações de fibras alimentares.

| **Fonte** | **AGCC totais** (mmol/g substrato) | **%** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **Ácido Acético** | **Ácido Propiônico** | **Ácido Butírico** |
| Goma xantana[1] | 3,91 | 78 | 15 | 7 |
| Goma arábica[1] | 9,64 | 66 | 21 | 13 |
| Amido resistente[2] | 2,82 | 41 | 26 | 33 |
| β-glucanas[2] | 5,54 | 44 | 31 | 26 |

[1]BOURQUIM e col. 1996; [2]CASTERLINE e col. 1997

## 1.2 MECANISMOS DE AÇÃO PROPOSTOS PARA AS FIBRAS ALIMENTARES

### 1.2.1 Fermentação colônica

Os componentes da dieta não digeridos no trato superior do aparelho digestório, ao atingirem o colón, podem ser utilizados como substrato para a fermentação pela microflora bacteriana. Este fenômeno é denominado fermentação colônica, e caracteriza-se pela utilização anaeróbia destes substratos, com a conseqüente formação de diversos produtos, que promoverão diferentes efeitos fisiológicos locais e sistêmicos.

As mudanças promovidas a partir da fermentação destes substratos variam de acordo com a fração de carboidrato, sendo que as diferentes frações de FA são utilizadas seletivamente pelas bactérias da flora colônica, produzindo diferentes enzimas e, conseqüentemente, produtos e subprodutos de fermentação. Os eventos desencadeados pela fermentação bacteriana são complexos e relacionados entre si, destacando-se como principais produtos do processo fermentativo os gases (dióxido de carbono, hidrogênio e metano), a água, os ácidos graxos de cadeia curta (sendo os principais o ácido acético, o propiônico e o butírico) e o aumento do volume da massa bacteriana (GÕNI-CAMBRODÓN e MARTÍN-CARRÓN, 2001).

As células do epitélio colônico utilizam o ácido butírico como principal fonte de energia. Esta propriedade do ácido butírico de promover o crescimento e multiplicação dos colonócitos protege a mucosa contra inflamações (PACHECO e SGARBIERI, 2001), inibindo o crescimento de células neoplásicas (GÕNI-CAMBRODÓN e MARTÍN CARRÓN, 2001). A "hipótese do butirato" sugere que ele estimula o crescimento de células normais, enquanto inibe o crescimento das células malignas (FERGUSON, 2001; VELASQUES e col., 1997).

O ácido acético, produzido na fermentação colônica, após ser absorvido, é transportado pela veia porta até o fígado, sendo utilizado perifericamente como fonte de energia e como estrutura para síntese de ácidos graxos de cadeia média e longa. Na ausência de carboidratos pode ser utilizado como substrato para a gliconeogênese (GÕNI-CAMBRODÓN e MARTÍN-CARRÓN, 2001).

Quanto ao ácido propiônico, uma das suas principais ações é como substrato para a gliconeogênese. Também é atribuída ao ácido propiônico a participação na inibição da síntese de colesterol pelos hepatócitos, por meio da inibição da hidroxi-metil-glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) (DERIVE e MENDEZ, 2001; FAO/WHO, 1998; TODESCO e col., 1991).

### 1.2.2 Excreção fecal de ácidos biliares e colesterol

A elevação do colesterol plasmático é reconhecida como fator de risco primário para doenças coronarianas (ANDERSON e col., 1990). Dentre os

mecanismos pelos quais a FA alimentar pode contribuir para a redução dos níveis de colesterol plasmático, é amplamente aceito na literatura que a propriedade viscosa da fração solúvel, possui capacidade de inibir a absorção intestinal de colesterol e ácidos biliares pelo retardo da difusão, dos mesmos, no lúmen intestinal, para acessar as células da mucosa (sítios de absorção), ou pela interferência no processo de formação das micelas e absorção lipídica. Uma vez que o colesterol é precursor na síntese de ácidos biliares, quando estes retornam em menor quantidade para o fígado há mobilização do colesterol endógeno para esta síntese (BARTINISKOWSKA, 1999; GALLAHER e col., 1993).

### 1.2.3 Capacidade de retenção de água e aumento do bolo fecal

A FA possui um papel fundamental na regulação da dinâmica do trânsito gastrointestinal e na formação e eliminação das fezes. De modo geral existe uma relação direta entre o conteúdo de FA na dieta e a velocidade pela qual os nutrientes transitam ao longo do trato gastrointestinal. E existe uma relação inversa entre o volume de matéria fecal e o tempo que esta fica retida no intestino grosso (RUIZ-ROSO e col., 2001).

O efeito atribuído à fibra insolúvel se relaciona com a capacidade de retenção de água, que contribui para o aumento do volume fecal e, conseqüentemente, diminuição do tempo de trânsito das fezes no trato intestinal (McPHERSON, 1993).

Esse efeito laxativo é atribuído à distensão das paredes do cólon, pelo aumento da massa fecal, que estimula os mecanoreceptores colônicos e os movimentos peristálticos do intestino (PACHECO e SGARBIERI, 2001). Tal capacidade de captar água da fibra está relacionada com a sua estrutura tridimensional, assim como com o pH e eletrólitos presentes no meio (RUIZ-ROSO, 2001).

A fermentação no cólon está inversamente relacionada com a capacidade de retenção de água nas fezes. Todavia os polissacarídeos solúveis também promovem aumento da massa fecal, devido ao aumento da população bacteriana, porém em menor proporção (PACHECO e SGARBIERI, 2001).

## 1.3 AMARANTO E LINHAÇA

Os grãos de amaranto e linhaça são culturas que são objeto de grande interesse por parte da população em geral e da comunidade científica em particular, em função das suas características nutricionais e fisiológicas relevantes à saúde, muitas delas atribuídas à ação das fibras alimentares.

### 1.3.1 O amaranto

O amaranto é um pseudocereal da classe das dicotiledôneas e família das amarantáceas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989), com mais de 60 espécies espalhadas por todos os continentes. Este pseudocereal representou nas Américas a base da alimentação de diversas culturas pré-colombianas. As várias espécies de amaranto são morfologicamente semelhantes, com grãos pequenos e em forma lenticular, de 1 a 1,5 mm de diâmetro, e pesando em torno de 0,6 a 1,0 mg. A coloração dos mesmos varia do branco para o bege, bege claro, vermelho, marrom e preto (SAUNDERS e BECKER, 1984).

O amaranto é uma das poucas culturas onde as folhas são consumidas como verdura e os grãos como cereal (OKE, 1983). Os grãos inteiros ou moídos (farinha) são utilizados em diversas preparações tais como: pudins, bolos, pastas, tortas, mingaus, confeitos, saladas entre outros.

O amaranto apresenta excepcional valor nutritivo. Na sua composição média, o grão contém de 15-16% de proteína, 7-8% de gordura, 50-60% de amido (PEDERSEN e col., 1987) e 14,2 % de FA (TOSI, 2001). A fração protéica apresenta perfil de aminoácidos balanceado, destacando-se a presença de lisina e aminoácidos sulfurados em altas quantidades (MATUZ e col., 2000), e na fração lipídica observa-se alto grau de insaturação (75%).

Diversos autores observaram efeito hipocolesterolemiante com a administração de grão de amaranto (PLATE e ARÊAS, 2002; GRAJETA, 1999; QURESHI e col., 1996). Segundo QURESHI e col. (1996), a FA do grão de

amaranto representa um dos prováveis agentes responsáveis por estas propriedades hipocolesterolêmicas. PLATE e ARÊAS (2002) administraram amaranto da espécie *Amaranthus caudatus* L. na forma de grão extrusado e óleo, em dietas distintas, a coelhos hipercolesterolemizados, sendo observada a redução na concentração de colesterol total e LDL-colesterol, após 21 dias, apenas para o amaranto extrusado. Como neste estudo não foi observado efeito hipercolesterolemiante pela administração de óleo de amaranto, outros componentes do grão foram sugeridos como prováveis agentes deste efeito, como as fibras alimentares.

### 1.3.2 A linhaça

A linhaça é uma oleaginosa com mais de 200 espécies reconhecidas. Seu nome botânico, *Linum usitatissimum* L, significa "a maior parte utilizável". Seu grão pequeno e pontiagudo, fino e ovalado apresenta em média 5 mm de comprimento, 2,5 mm de largura e 1,5 mm de espessura. A cor do grão varia do amarelo claro para o marrom (CUI e col., 1998).

Existem relatos do consumo de linhaça na Europa e Ásia desde 5000 e 8000 anos a.C. (OOMAH, 2001). Este consumo caiu com o tempo, mas nos últimos anos, a linhaça vem se tornando popular, devido ao seu papel funcional na saúde (CUI e col., 1998), o que tem estimulado a produção nacional desta matéria-prima.

A linhaça é a semente do linho, cujas fibras são tradicionalmente utilizadas para a confecção de tecidos. Atualmente grande parte da demanda mundial de linhaça está voltada para o aproveitamento industrial do óleo, que é amplamente utilizado como agente de secagem em tintas e vernizes (OOMAH, 2001; CUI e col., 1998). Com a extração do óleo, há um excedente de "torta" que é direcionada para a alimentação animal.

A linhaça é comumente encontrada como grão integral, moído, ou na forma de óleo. Atribuí-se a linhaça o sabor e aroma de nozes, podendo ser facilmente incorporada a diversos produtos, tanto integralmente, como moída. Alguns exemplos de produtos são pães, biscoitos, bolos tipo *muffins*, biscoitos tipo *cookies* e bolos (MORRIS, 2001).

Quanto à composição de nutrientes a linhaça apresenta 28% de FA, 41% de lipídeos e 21% de proteína. Sua composição lipídica apresenta baixa concentração de ácidos graxos saturados (9%), moderada quantidade de monoinsaturados (18%) e grande teor de ácidos graxos polinsaturados (73%), com destaque para o ácido α-linolênico. Isto faz da linhaça a principal fonte deste ácido graxo, cinco vezes mais abundante que em nozes ou óleo de canola. O perfil de aminoácidos de sua fração protéica se assemelha ao da soja (MORRIS, 2001).

As lignanas são fitoestrógenos com atividade estrogênica, e a linhaça é a maior fonte do principal precursor de lignanas mamárias: seicosolariciresinol diglucosidase (SDG) (HUTCHINS e col., 2001), apresentando de 0,2 a 3,7mg/g de SDG, de 12 a 15000 vezes mais que em outros vegetais (MEAGHER e col., 2000).

Diversos trabalhos atribuem ação hipocolesterolêmica ao grão de linhaça (BHATHENA e col., 2003; LUCAS, 2002; PRASAD, 2000; ARJMANDI e col.,

1998; PRASAD, 1997), sendo este efeito, atribuído em geral à presença de ácido α-linolênico e lignanas.

## 1.4 JUSTIFICATIVA

Este trabalho se propôs a investigar alguns mecanismos fisiológicos particularmente relacionados com a FA dos grãos de amaranto e linhaça. Apesar do significativo conteúdo de fibras alimentares observados nestes produtos, pouca investigação tem sido documentada na literatura cientifica a respeito do comportamento destas frações frente aos parâmetros fermentativos e ao metabolismo lipídico.

Diferentes efeitos benéficos à saúde são atribuídos à fração FA, que são dependentes da quantidade e qualidade desta fração nos alimentos, ressaltando-se que os alimentos são sistemas biológicos muito complexos, especialmente quanto à sua metabolização no organismo. Dentro deste contexto, ao se considerar as particularidades nutricionais e funcionais dos grãos de amaranto e linhaça, o crescimento do consumo destes produtos pela população, e a significativa presença de FAs nestes produtos, é fundamental a investigação da influência desta fração nos diferentes efeitos fisiológicos de ação das fibras alimentares classicamente documentados na literatura científica.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação fisiológica da fração FA dos grãos de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.) e linhaça (*Linum usitatissimum* L.) nos parâmetros fermentativos e no metabolismo lipídico, em ratos.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I- Investigação de parâmetros fermentativos pela:

- verificação do peso do ceco e conteúdo cecal;
- determinação do pH do conteúdo do ceco;
- quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (acetato, butirato e proprionato) no conteúdo cecal;
- verificação do peso das fezes úmidas e dessecadas;
- determinação das frações fibra solúvel e insolúvel nas dietas e fezes.

II- Investigação do metabolismo lipídico pela

- quantificação dos ácidos biliares e colesterol totais excretados nas fezes;
- quantificação do colesterol total, triglicérides e frações HDL-colesterol e não HDL-colesterol no plasma;
- quantificação dos lipídeos e colesterol totais hepáticos.

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 MATÉRIAS-PRIMAS

### 3.1.1 Obtenção e pré-tratamento

O grão de amaranto espécie *Amaranthus cruentus* L, variedade BRS-Alegria, foi fornecido pela Embrapa Cerrados (Planaltina, Distrito Federal, Brasil). O grão de amaranto foi moído em moinho de facas (Tecnal Piracicaba-SP).

O grão de linhaça, espécie *Linum usitatissimum* L., foi adquirido moído e parcialmente desengordurado (teor de lipídeos de 17%) pela Indústria de Óleos Vegetais Pazze Ltda (Panambi, RS, Brasil), o que possibilitou a redução de custos e produção de descarte (solventes).

Ambas as matérias-primas foram desengorduradas com hexano grau PA na proporção de 1:5 (m/v). O material com solvente foi agitado (15min) e mantido em repouso por 48 horas, antes de ser filtrado em manta de algodão para retirada do solvente. Para evaporação do excesso de solvente o material foi mantido em capela sob exaustão durante uma noite e, posteriormente acondicionado em estufa ventilada a 60°C (Quimis São Paulo, SP), até total evaporação do solvente por até 36 horas. As farinhas secas e desengorduradas foram acondicionadas em sacos de plásticos e mantidas sob refrigeração (8 a 10°C) até a produção das dietas.

A etapa de desengorduramento foi realizada com o propósito de limitar a influência da fração lipídica insaturada dos grãos e lignanas da linhaça na avaliação dos efeitos sob o metabolismo lipídico.

Em ensaio biológico prévio, os animais alimentados com dieta a base de grão de amaranto com processamento térmico sob baixa temperatura, recusaram-se a consumir a dieta e perderem peso. Os grãos foram então processados por extrusão termoplástica, com o objetivo de inativar possíveis fatores antinutricionais e tornar a dieta mais palatável.

O processo de extrusão termoplástica baseia-se na combinação de altas temperaturas sob alto cisalhamento, em curto intervalo de tempo, provocando a gelatinização do amido e desnaturação de proteínas de farinhas de cereais e leguminosas, seguida da reestruturação dos polímeros (ARÊAS, 1983; BARROS e col., 1987). O aparelho extrusor consiste de um parafuso de Arquimedes, desenhado de modo a proporcionar um aumento de pressão durante o trajeto da matéria-prima. Este gira ajustado dentro de um canhão que empurra o material a ser texturizado. O alimento é conduzido sob alta pressão e temperatura (MITCHELL e ARÊAS, 1992). Como a pressão interna da máquina é maior que a pressão atmosférica externa, o material ao sair expande à medida que há rápida evaporação da água, super aquecida nele contida (Anexo III).

A umidade da farinha de amaranto desengordurada foi ajustada para 15% em base seca. Foi utilizada extrusora de laboratório RXPQ-Labor24 (Imbramaq, Ind. de máquinas LTDA - Ribeirão Preto - BR). As condições foram padronizadas com base em estudos preliminares, utilizando-se as condições de maior expansão do extrusado:

velocidade de rotação - 210 RPM; taxa de compressão - 4:1; temperaturas - 30, 80 e 140°C para as zonas 1,2 e 3 respectivamente (COELHO, 2006).

## 3.2 ENSAIO BIOLÓGICO

Os experimentos biológicos foram conduzidos nas instalações do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, sob aprovação do Comitê de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq nº 068/06) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da USP (Anexo I).

Foram utilizados quarenta e oito ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegiccus*, variedade *albinus, rodentia, mammalia*), com trinta dias de idade e peso médio de 168,4 ± 17,8g, divididos ponderalmente em quatro grupos de doze animais. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com maravalha, alimentação *ad libitum*, em área climatizada com temperatura entre 22 a 26 ºC, umidade relativa do ar entre 60 e 70%, e período escuro de 10 horas, durante os 28 dias de experimento. A pesagem dos animais e dietas, bem como limpeza das gaiolas foi realizada duas vezes por semana.

Durante o período de adaptação (cinco dias) foi oferecida aos animais ração comercial NUVILAB CR1 (Nuvital Nutrientes S/A, Colombo-PR).

As dietas experimentais foram formuladas segundo recomendações da AIN-93 (REEVES e col., 1993), e produzidas pela empresa RHOSTER (Indústria e

Comércio Ltda.,Vargem Grande Paulista-SP). Tanto as dietas comerciais como as experimentais foram oferecidas aos animais como pellets.

O consumo da dieta foi obtido pela diferença entre o alimento oferecido e o residual. O Cociente de Eficácia Alimentar (CEA) foi obtido pelo cociente do ganho de peso total e o consumo da dieta durante os 28 dias de experimento.

Nos quatro últimos dias de experimento, foi realizada a coleta das fezes bem como verificação diária do consumo das dietas. Para a coleta das fezes as gaiolas foram adaptadas com dois pisos a fim de separar as fezes da urina (Anexo II). As fezes foram pesadas em balança analítica, e dessecadas em estufa ventilada por 48-72 horas, a 60°C, e armazenadas a – 18$^{o}$C até a realização das análises.

A coleta de sangue foi efetuada ao final do experimento por punção cardíaca sob anestesia. Como anestésicos foram utilizados Ketalar® (cloridrato de cetamina), e Rompum® (xilazina), 1mg/kg e 10mg/kg de peso, respectivamente (KIM e SHIN, 1998). Como agente anticoagulante foi utilizado EDTA a 7,5%. Antes da coleta, as seringas (5mL - Laboratórios Rymco, Barranquilha, CO) e agulhas (0,60x25mm - Becton, Dickinson and Company, USA) foram lavadas, e aos tubos de coleta de sangue (2mL - Eppendorf®), adicionados 10 ul de solução de EDTA a 7,5%. As amostras coletadas foram centrifugadas a 1500g, a temperatura ambiente, por 15 minutos (Centrífuga mod. 5415C, Eppendorf®), sendo o plasma separado e armazenado a -18°C, até análise das frações lipídicas (DONGOWSKI e col., 2002).

Ao término do período experimental os animais foram eutanasiados, sendo os órgãos: fígado, coração, cérebro e rim direito, lavados com soro fisiológico e secos com gaze. Os órgãos foram identificados e congelados por imersão em nitrogênio líquido, e reservados para possíveis análises. O fígado foi separado em duas partes

congeladas separadamente, sendo uma delas reservada para a quantificação dos lipídeos hepáticos. Os órgãos foram mantidos a -80°C (Ultralow freezer-Nuire Inc, MN, USA).

Os cecos completos (com conteúdo) foram delimitados e pesados. Na seqüência, o pH do conteúdo do ceco foi aferido através de uma pequena incisão na parede do órgão, onde foi introduzido eletrodo portátil de calibre de 5 mm de diâmetro (Denver Instrument Company© n. 3007361 -USA). O conteúdo do ceco foi então coletado em tubos tipo Eppendorf® e imediatamente congelados a -80°C para posterior quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta. Os cecos foram então lavados com soro fisiológico, secos cuidadosamente com gaze e pesados. Em seguida foram identificados e congelados por imersão em nitrogênio liquido, e mantidos congelados a -80°C (DONGOWSKI e col., 2002; KIM e SHIN, 1998; ADAM e col., 2001).

Todo o material biológico não utilizado nos experimentos foi descartado segundo as Normas de Segurança Laboratorial.

Na Figura 2 é apresentado o fluxograma do ensaio biológico.

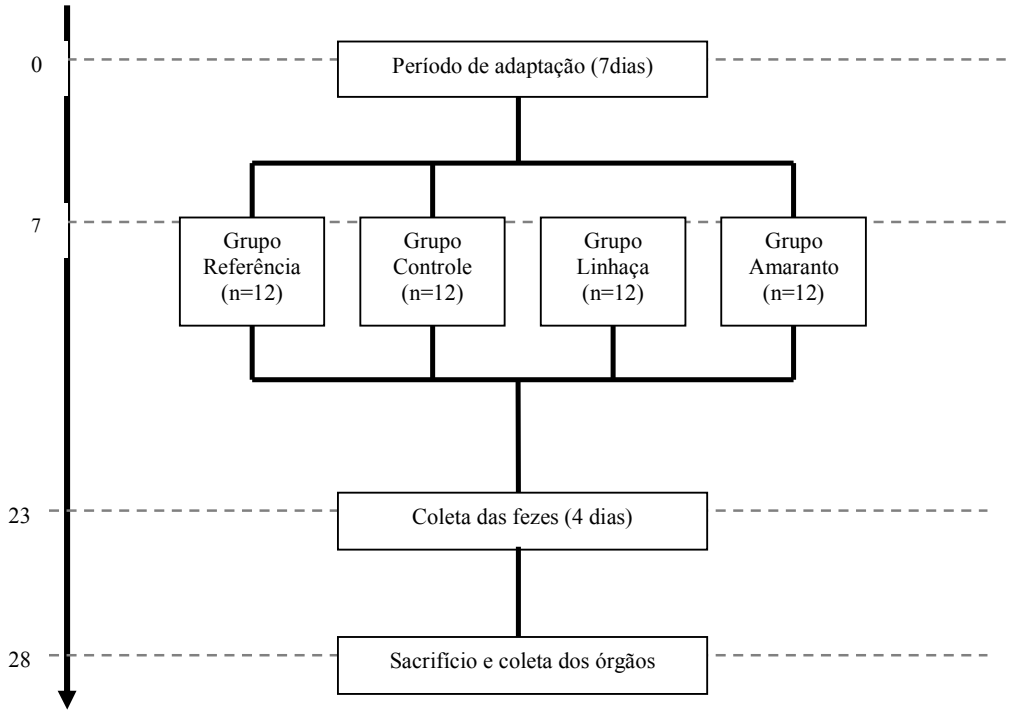


**Figura 2 -** Fluxograma do delineamento do ensaio biológico.

## 3.3 DIETAS

### 3.3.1 Composição centesimal das matérias primas

Na Tabela 1 são apresentados os dados da composição centesimal das matérias-primas utilizadas para a preparação das dietas.

**Tabela 1** – Composição centesimal (g/100g) das farinhas do grão de amaranto integral (*Amaranthus cruentus L.*) desengordurada e extrusada, e farinha do grão de linhaça semi-desengordurada (*Linum inusitassimum*) e desengordurada.

| | Farinha de Amaranto | | | Farinha de Linhaça | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Integral | Desengord. | Extrusada | Semi-desengord. | Desengord. |
| Proteína* | 14,4 (0,40) | 15,8 (0,08) | 16,9 (0,30) | 26,4 (0,86) | 31,9 (1,04) |
| Extrato etéreo | 7,10 (0,12) | 0,80 (0,03) | 0,50 (0,05) | 17,0 (0,08) | 0,38 (0,01) |
| Cinzas | 2,07 (0,04) | 2,28 (0,05) | 2,32 (0,03) | 5,01 (0,05) | 6,07 (0,06) |
| Amido total | 60,2 (0,10) | 67,4 (4,31) | 67,5 (1,40) | 0,38 (0,06) | 0,46 (0,05) |
| Fibra total | 8,96 | 10,1 | 10,22 | 50,6 | 61,25 |
| Fração solúvel | 0,89 (0,10) | 0,98 (0,11) | 1,00 (0,10) | 16,8 (1,85) | 20,3 (2,24) |
| Fração insolúvel | 8,07 (0,77) | 8,90(0,85) | 9,15 (0,04) | 33,8 (1,77) | 40,9 (2,14) |

Resultados expressos em média (desvio padrão) resultantes de análises em triplicata; *fator 5,85

### 3.3.2 Formulação das dietas

A partir da composição centesimal das farinhas desengorduradas da linhaça e do amaranto cru e extrusado, foram formuladas as dietas apresentadas na Tabela 2. As dietas Linhaça e Amaranto foram formuladas com as farinhas previamente desengorduradas, de modo que 7% da dieta estivesse representada pela fração FA das mesmas. As frações proteína e amido foram ajustadas de modo que todas as dietas fossem semelhantes quanto à distribuição das demais frações de nutrientes.

Em outros estudos que se propuseram a investigar o efeito hipocolesterolemiante das fibras alimentares em ratos (DONGOWSKI e col., 2002; YOUNES e col., 1995; MOUNDRAS e col., 1995), os autores não adicionaram colesterol às dietas. Outros autores adicionaram de 0,2 a 2,5% de colesterol (KIM e SHIN, 1988; ADAM e col., 2001; FUKUSHIMA e col. 2001). Para observar a ação das fibras alimentares sob o colesterol dietético optou-se por adicionar 0,5% de colesterol às dietas, com o intuito de não promover elevada hipercolesterolemia nos animais.

A formulação das mesmas seguiu as recomendações da AIN-G-93 (REEVES e col., 1993).

Optou-se pela não realização de coletas de sangue no início do ensaio e desse modo, adicionou-se ao estudo um grupo isento de suplementação de colesterol que foi denominado Grupo Referência.

As dietas foram formuladas a partir dos dados de composição centesimal das farinhas desengorduradas de linhaça e amaranto desergorduradas.

**Tabela 2** - Formulações estimadas das dietas Referência, Controle, Linhaça e Amaranto (g/100g).

| | Dieta | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Referência** | **Controle** | **Linhaça** | **Amaranto** |
| Amaranto | - | - | - | 74,00 |
| Linhaça | - | - | 12,90 | - |
| Amido de milho | 39,75 | 39,75 | 36,00 | 1,00 |
| Caseina | 18,00 | 18,00 | 14,25 | 5,88 |
| Amido de milho dextrinizado | 13,20 | 13,20 | 12,50 | 2,20 |
| Sacarose | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 5,00 |
| Óleo de soja | 7,00 | 6,50 | 6,45 | 6,45 |
| Celulose[1] | 7,00 | 7,00 | | - |
| Mistura de minerais[2] | 3,50 | 3,50 | 3,50 | 3,50 |
| Mistura de vitaminas[3] | 1,00 | 1,00 | 3,50 | 1,00 |
| L-cistina | 0,30 | 0,30 | 0,30 | 0,30 |
| Bitartarato de colina | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Tert-butilhidroquinona | $0,14 \times 10^{-2}$ | $0,14 \times 10^{-2}$ | $0,14 \times 10^{-2}$ | $0,14 \times 10^{-2}$ |
| Colesterol[4] | - | 0,50 | 0,50 | 0,50 |

[1] Solka Flok, 200FCC, FS & D, St Louis, MO; [2]AIN-93G-VX; [3]AIN-93G-MX; [4a] fração colesterol foi subtraída da fração óleo de soja. Referência = dieta Controle AIN-93G; Controle = Dieta Controle AIN-93G + 0,5% de colesterol; Linhaça = FA da farinha de linhaça desengordurada + 0,5% de colesterol; Amaranto = farinha de amaranto desengordurada e extrusada + 0,5% de colesterol.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, verifica-se que a composição da dieta esteve dentro dos parâmetros previamente estabelecidos, sendo admitida variação de até 5% em relação à formulação estimada.

**Tabela 3** – Composição das dietas dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto, em base seca (g/100g).

| | Dieta | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Referência** | **Controle** | **Linhaça** | **Amaranto** |
| Proteína* | 16,8 (0,18) | 17,0 (0,31) | 16,9 (0,18) | 16,3 (0,40) |
| Extrato etéreo | 6,90 (0,25) | 7,32 (0,23) | 7,24 (0,12) | 7,40 (0,54) |
| Resíduo mineral fixo | 2,93 (0,13) | 2,76 (0,12) | 3,20 (0,09) | 3,10 (0,15) |
| Amido total | 63,9 (0,65) | 63,2 (0,45) | 62,2 (0,81) | 63,6 (0,91) |
| Fibras alimentares | 7,20 | 7,16 | 6,82 | 6,71 |
| Fração solúvel | 0 | 0 | 2,62 (0,34) | 0,77 (0,12) |
| Fração insolúvel | 7,20 (0,68) | 7,16 (0,46) | 4,56 (0,23) | 5,94 (0,31) |
| Colesterol | - | 0,6 (0,04) | 0,4 (0,08) | 0,5 (0,07) |
| Energia (kcal) | 385,8 | 391,2 | 386,1 | 389,5 |

Resultados expressos em média (desvio padrão) resultantes de análises em triplicata; *fator 5,85; Referência = dieta Controle AIN-93G; Controle = Dieta Controle AIN-93G + 0,5% de colesterol; Linhaça = FA da farinha de linhaça desengordurada + 0,5% de colesterol; Amaranto = farinha de amaranto desengordurada e extrusada + 0,5% de colesterol.

## 3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 3.4.1 Composição centesimal das matérias-primas, dietas e fezes

A determinação do teor de umidade, extrato etéreo e cinzas foram realizadas segundo as normas estabelecidas pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985). Para as

análises de proteína e fibras alimentares (solúvel e insolúvel) seguiu-se a metodologia recomendada pela AOAC (1995). O amido total foi determinado segundo GOÑI e col. (1997).

As determinações foram realizadas em triplicata.

### 3.4.2 Peso das fezes

As fezes foram pesadas, e a umidade obtida através de secagem em estufa ventilada por 48-72 horas, a temperatura de 60$^{o}$C (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, São Paulo, BR).

### 3.4.3 Determinação dos lipídeos plasmáticos

As frações plasmáticas de Colesterol total, Triglicérides e HDL-colesterol, foram determinadas utilizando *kits* enzimáticos comerciais (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil).

O colesterol total foi quantificado baseado em método enzimático, colorimétrico, (CHOD/PAP), com colesterol esterase, colesterol oxidase e 4-aminoantipirina.

A fração colesterol associado a HDL foi quantificada após precipitação das lipoproteínas LDL e VLDL, com ácido fosfotúngstico/cloreto de magnésio (PTA/$MgCl_2$), e mensuração do colesterol no sobrenadante (ABELL e col., 1952).

Os valores da fração não HDL-colesterol foram obtidos através da diferença entre os valores de Colesterol total e HDL-colesterol.

As determinações foram realizadas em duplicata a partir das extrações.

### 3.4.4 Determinação de lipídeos totais e colesterol hepático.

Os lipídeos do fígado foram extraídos em coluna de fase seca segundo MARMER e MAXWELL (1981). Em coluna de vidro (35mm x 30 comprimento), adicionou-se algodão, seguido de 10g de fosfato dicálcio hidratado e celite (1:9), 10g de amostra, e 20g de $Na_2SO_4$ misturados com 15g de celite. Após empacotar a coluna adicionou-se 200 mL de diclorometano e metanol (9:1). O extrato foi coletado e o volume mensurado. A porcentagem de lipídeos na amostra foi obtida após dessecação de 10mL de extrato em estufa ventilada (Quimis Aparelhos Científicos, Ltda - São Paulo - BR) até peso constante.

O extrato lipídico obtido foi então saponificado para identificação e quantificação do colesterol total por Cromatografia Liquida de Alta Eficiência (CLAE), segundo BOHAC e col. (1988), com algumas adaptações sugeridas pelo Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública.

Para a saponificação, 3mL de extrato lipídico foram adicionados em tubos de vidro com tampa rosqueada com vedação de Teflon, secos sob nitrogênio, e adicionados 10mL de solução alcoólica (90%) de KOH 12%. Os tubos foram aquecidos em banho-maria sob agitação, a 70°C, por 15 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, foram adicionados 5mL de solução saturada de NaCl, para melhor separação das fases, e o colesterol extraído 3 vezes com 10mL de hexano (grau CLAE).

Os extratos foram secos em estufa ventilada (60°C) (Quimis Aparelhos Científicos, Ltda - São Paulo-BR), até total evaporação da amostra, sendo ressuspendidas com 1mL de fase móvel no momento da injeção. A identificação foi realizada em equipamento de CLAE, da marca Shimadzu SCL -10 AT – VP (Shimadzu Scientific Instruments-Inc-Japan), com detector UV/Visível FL detector, L-7480 (Merck, Hitachi - Darmstadt, Germany), a 206 nm. Foi utilizada coluna analítica Luna CN, Phenomenex (25cm x 4,5 mm de diâmetro). O volume de injeção foi de 20µL, e a fase móvel preparada com n-hexano/isopropanol (97:3), com fluxo isocrático de 1mL/min (CHEN e CHEN, 1994). A quantificação foi realizada através de curva padrão, com concentrações de 32 a 378 ug/ml, utilizando-se como padrão colesterol (Steraloids Inc-USA).

Os solventes utilizados na fase móvel foram filtrados antes do uso em membranas Durapore® HV-PVDF (47 nm de diâmetro e 0,45µ de poro) fabricadas pela Millipore do Brasil.

As extrações foram realizadas em triplicata.

### 3.4.5 Determinação de colesterol nas dietas e fezes dos animais

O colesterol nas fezes foi extraído após saponificação segundo TERPSTRA e col. (1998), com algumas modificações, e quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), segundo CHEN e CHEN (1994).

Para a saponificação, 50mg das dietas ou fezes dessecadas foram adicionados em tubos de teflon com 1400 μL de metanol e 440μL de solução de NaOH 5M. Os tubos foram rapidamente agitados em vortex (baixa velocidade) e colocados em banho-maria com agitação horizontal, por 60 minutos a 80°C. Em seguida foi adicionado aos tubos solução saturada de NaCl, para melhor separação das fases, e o colesterol extraído 3 vezes com 3 mL de éter de petróleo. Entre cada extração os tubos foram novamente agitados em vortex.

Deste ponto em diante, seguem-se os mesmos procedimentos apresentados no 4° parágrafo da secção 3.3.4.

As extrações foram realizadas em triplicata.

### 3.4.6 Determinação dos ácidos biliares nas fezes

Os ácidos biliares foram extraídos segundo Van der MEER e col. (1985). As fezes dessecadas foram extraídas com tert-butanol a 50% por 15minutos a 37°C,

seguida de centrifugação a 10.000g por 2 minutos (Modelo 3-18k-Sigma Laborzentrifugen-Germany).

A quantificação foi realizada através de *kit* enzimático colorimétrico DZ042A (Diazyme – DZ042A-San Diego, EUA). Na presença de Tio-NAD, a enzima 3-α hidroxiesteróide desidrogenase (3-α HSD) converte os ácidos biliares a 3-ceto-esteróides e Tio-NADH. A taxa de formação de Tio-NADH é determinada pela mudança de absorbância a 405nm, mensurada aos entre 60 e 120 segundos de reação. A leitura foi realizada em Espectrofotômetro UV-Visível (UV-1650PC Shimadzu-Scientific Instruments-Inc-Japan).

As determinações foram realizadas em duplicata.

### 3.4.7 Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta

A extração dos AGCC no conteúdo do ceco foi realizada segundo ZHAO e col. (2005), com algumas modificações. Meio grama de conteúdo do ceco foi suspenso em 5mL de água e homogeneizado por 3 minutos. O pH da suspensão cecal foi ajustado entre 2 e 3 pela adição de solução de HCl 5M. Esta suspensão foi então transferida para tubos de polipropileno e centrifugada por 20 minutos a 5000 rpm (Modelo 3- 18k, Sigma Laborzentrifugen, Germany), obtendo-se um sobrenadante limpo que foi injetado em cromatógrafo gasoso para quantificação dos AGCC.

Foi utilizado cromatógrafo gasoso modelo GC-2010 (Shimadzu Scientific Instruments Inc, Japan) e coluna capilar de sílica Nukol, com dimensões de 30m,

0,25mm de diâmetro interno e 0,25μm de espessura de filme (Supelco, USA). Como gás de arraste foi utilizado hidrogênio ao fluxo de 1,8 mL/min. A temperatura inicial do forno foi de 100°C mantida por 0,5 minutos, seguida com taxa de aumento de 8°C/min até 180°C, mantida por 1,0 minutos, seguiu-se taxa de aumento de 20°C/min até 200°C, sendo mantido nesta temperatura por 5 minutos. A temperatura do detector de chama (FID) e injetor foram de 240°C e 200°C respectivamente, e o volume de injeção de 1μL, com split de 1:2.

Para identificação utilizou-se comparação do tempo de retenção utilizando como padrão externo mistura de ácidos graxos de cadeia curta livres (Volatile free acid mix, Cód. 46975, Sigma Aldrich, USA). A quantificação foi realizada através da curva padrão nas concentrações de 2 a 10mM.

As determinações foram realizadas em duplicata.

### 3.4.8 – Grau de fermentação

O grau de fermentação corresponde a diferença em porcentagem da quantidade de fibra mensurada nas fezes e fibra consumida pelos animais. Este cálculo estima a quantidade de fibra alimentar fermentada no colón.

Grau de fermentação = 100 –[(Fibras nas fezes/Fibras consumidas)*100]

## 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente foi verificado se as variáveis satisfaziam a distribuição normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov ($p>0,05$) para que então fossem utilizados testes paramétricos (SIEGEL, 1988) (Anexo IV).

Para comparação das médias de amostras independentes para variáveis com distribuição normal, foi empregado o teste paramétrico de Analise de Variância, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. As médias foram consideradas diferentes ao nível de 5% de significância.

Correlações entre as variáveis foram estabelecidas através do Coeficiente de correlação de Pearson.

As análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico SPSS versão 13 (SPSS inc, USA) e para elaboração dos gráficos foi utilizado o programa Microsoft Office Excel 2003.

# 4 RESULTADOS

## 4.1 Monitoramento do ganho de peso e consumo de dieta pelos animais

Os animais de todos os grupos aceitaram bem a dieta e apresentaram-se saudáveis, não sendo observadas mudanças de comportamento e aparência ao longo do experimento.

Na Tabela 4 observa-se que o consumo total e médio (g/dia) das dietas foi significativamente maior para os grupos Linhaça e Amaranto, e que o CEA foi significativamente menor para estes grupos. No entanto, não houve prejuízo nutricional, uma vez que não foi observada diferença significativa no ganho de peso entre os grupos.

**Tabela 4** – Ganho de peso, consumo total e médio, e Cociente de Eficiência Alimentar (CEA) dos animais dos Grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto, após 28 dias de administração das dietas.

| Grupo | Ganho de peso (g) | Consumo total (g) | Consumo médio diário (g) | CEA (%) |
|---|---|---|---|---|
| Referência | 190,0 (3,30)[a] | 522,2 (5,65)[a] | 21,7 (1,15)[a] | 36,4 (1,40)[a] |
| Controle | 180,9 (3,71)[a] | 544,1 (6,99)[a] | 21,7 (1,39)[a] | 33,3 (1,52)[a] |
| Linhaça | 187,1 (3,72)[a] | 647,1 (6,71)[b] | 25,8 (1,34)[b] | 28,9 (0,93)[b] |
| Amaranto | 171,1 (4,67)[a] | 601,7 (7,69)[b] | 24,07 (1,53)[b] | 28,4 (1,51)[b] |

Os dados estão expressos como média (erro padrão) n=12; Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si. ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$); Referência = dieta Controle AIN-93G; Controle = Dieta Controle AIN-93G + 0,5% de colesterol; Linhaça = FA da farinha de linhaça desengordurada + 0,5% de colesterol; Amaranto = farinha de amaranto desengordurada e extrusada + 0,5% de colesterol.

## 4.4 Parâmetros fermentativos

O peso do ceco completo, ceco vazio e conteúdo do ceco são apresentados na Figura 3.

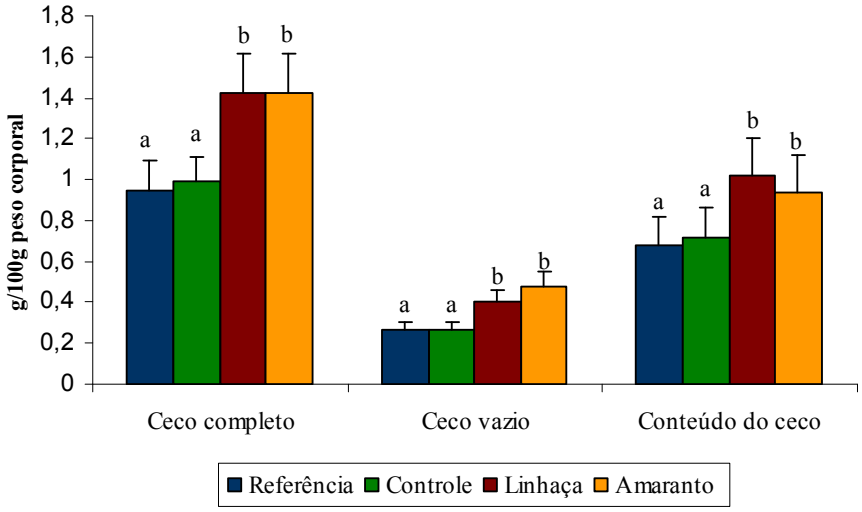


**Figura 3** - Peso ajustado (g/100g peso corporal) para o ceco cheio, ceco vazio, e conteúdo do ceco para os grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto.

Barras com letras iguais não diferem entre si, ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$). Nas colunas está indicado o erro padrão (n=12). Referência = dieta Controle AIN-93G; Controle = Dieta Controle AIN-93G + 0,5% de colesterol; Linhaça = FA da farinha de linhaça desengordurada + 0,5% de colesterol; Amaranto = farinha de amaranto desengordurada e extrusada + 0,5% de colesterol.

Observa-se aumento estatisticamente significativo do peso do ceco com conteúdo, ceco vazio, e conteúdo do ceco dos animais dos grupos Linhaça e Amaranto em relação aos grupos Referência e Controle. Verificou-se ainda que não houve diferença significativa entre os grupos Linhaça e Amaranto (p= 0,141).

De acordo com a Figura 4, os dados apresentam queda significativa do pH no ceco dos animais dos grupos Linhaça e Amaranto em relação aos grupos Controle e Referência.

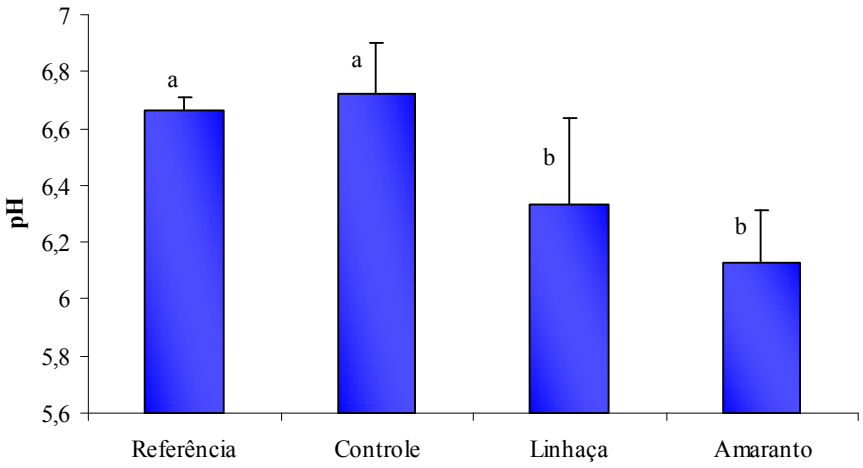


**Figura 4** – pH do conteúdo do ceco dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto.

Barras com letras iguais não diferem entre si, ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$). Nas colunas está indicado o erro padrão (n=12). Referência = dieta Controle AIN-93G; Controle = Dieta Controle AIN-93G + 0,5% de colesterol; Linhaça = FA da farinha de linhaça desengordurada + 0,5% de colesterol; Amaranto = farinha de amaranto desengordurada e extrusada + 0,5% de colesterol.

Na Figura 5 são apresentados o peso das fezes úmidas e secas. Observa-se que houve aumento do peso das fezes úmidas para os grupos Linhaça e Amaranto. No entanto, para as fezes secas, observou-se aumento apenas para o grupo Amaranto, sugerindo aumento de massa bacteriana. A porcentagem de umidade dos grupos Linhaça e Amaranto (43,3 ± 2,3% e 38,8 ± 2,1%, respectivamente) não diferiram

entre si (p=0,146), mas foram maiores que os grupos Referência e Controle (20,1 ± 2,2% e 21,0% ± 2,2%, respectivamente).

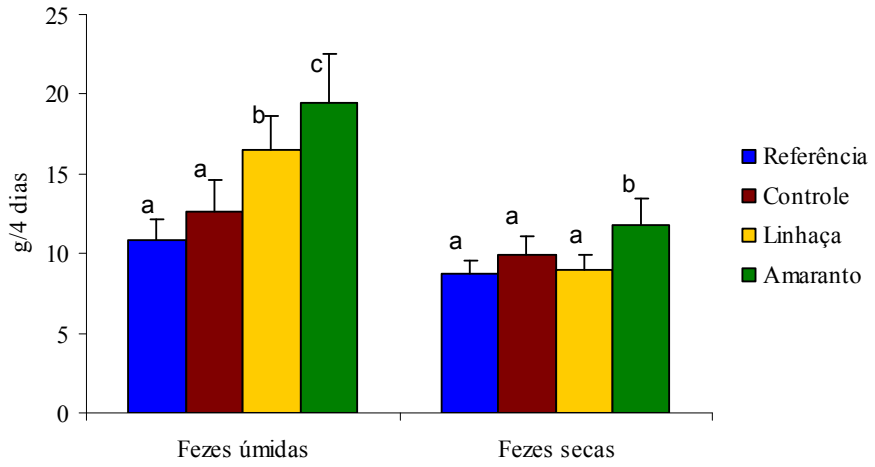


**Figura 5** – Peso das fezes úmidas e dessecadas, correspondente a 4 dias de coleta, dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto.

Barras com letras iguais não diferem entre si, ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$). Nas colunas está indicado o erro padrão (n=12). Referência = dieta Controle AIN-93G; Controle = Dieta Controle AIN-93G + 0,5% de colesterol; Linhaça = FA da farinha de linhaça desengordurada + 0,5% de colesterol; Amaranto = farinha de amaranto desengordurada e extrusada + 0,5% de colesterol.

A Figura 6 apresenta as concentrações de AGCC quantificadas no conteúdo do ceco dos animais.

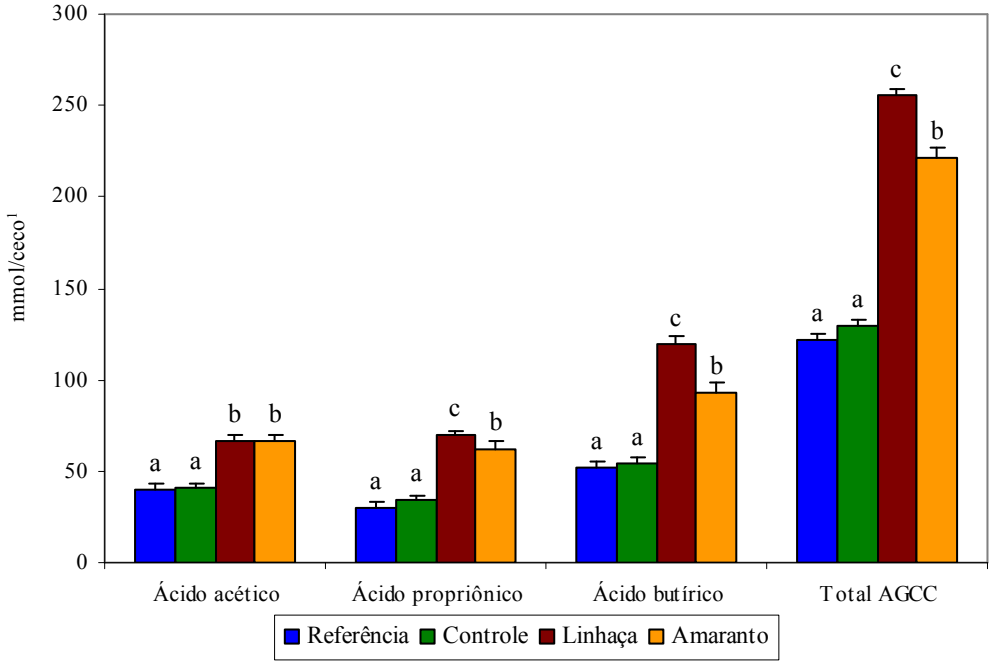


**Figura 6** – Concentração de AGCC (ácido acético, propiônico e butírico) no conteúdo do ceco, dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto.

[1]mmol/ceco = mmol/g x conteúdo cecal (g). Barras com letras iguais não diferem entre si, ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$). Nas colunas está indicado o erro padrão (n=12). Referência = dieta Controle AIN-93G; Controle = Dieta Controle AIN-93G + 0,5% de colesterol; Linhaça = FA da farinha de linhaça desengordurada + 0,5% de colesterol; Amaranto = farinha de amaranto desengordurada e extrusada + 0,5% de colesterol.

As concentrações (mmol/g ceco) de AGCC foram maiores para os três ácidos graxos nos grupos Linhaça e Amaranto em relação aos grupos Referência e Controle. As FAs de Linhaça e Amaranto promoveram aumento na produção de AGCC, em

relação ao grupo Controle, respectivamente de: 61,7 e 61,4% para o ácido acético (p= 0,000 e p=0,000); 103,5 e 80% para o ácido propiônico (p=0,000e p=0,000); e 120,0% e 71,8% para o ácido butírico (p=0,000 e p=0,000). Estes valores são expressivos, destacando-se que as concentrações dos ácidos propiônico e butírico dobraram para o grupo Linhaça em relação ao Controle.

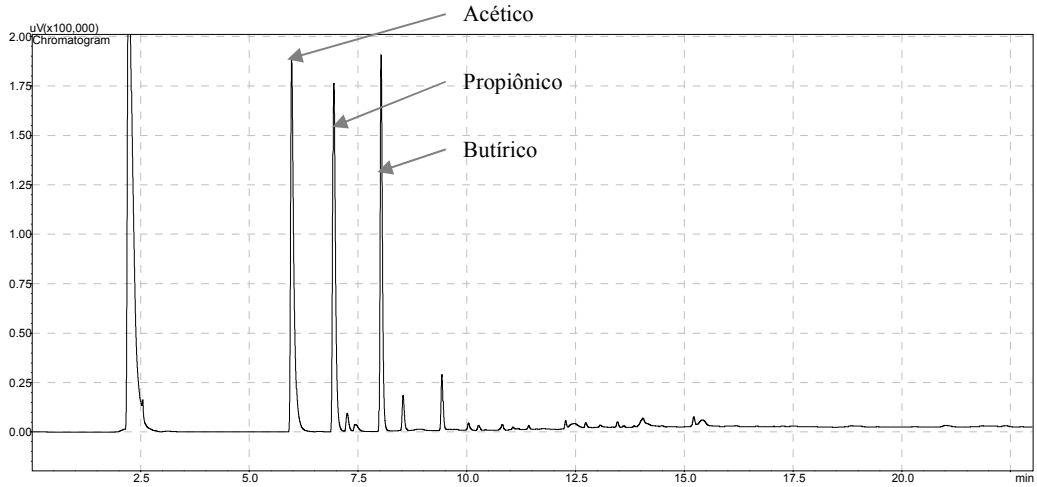


**Figura 7** - Cromatograma obtido por Cromatografia Gasosa para identificação e quantificação dos ácidos acético, propiônico e butírico.

Na Tabela 5 são apresentados os dados para consumo de FA e quantificação de fibras nas fezes durante os 4 últimos dias de experimento, bem como o grau de fermentação observados das frações de FA dos diferentes grupos. Com exceção do grupo Referência, todos os animais consumiram quantidade semelhante de FA. O grau de fermentação, através da diferença percentual entre as fibras totais consumidas e excretadas nas fezes, foi 13,6 e 21,9% para os grupos Linhaça e Amaranto, respectivamente.

Como esperado, a celulose apresentou pequeno grau de fermentação (grupos Referência e Controle).

**Tabela 5** - Consumo da fração FA, fração FA nas fezes e porcentagem de fermentação da FA para os animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto.

| | Consumo de FA[1] (g/4 dias) | Fibras nas fezes[2] (g/4dias) | Grau de fermentação[3] (%) |
|---|---|---|---|
| Referência | 6,43 (0,45)[a] | 6,29 (0,60)[b] | 2,18 |
| Controle | 6,97 (0,66)[b] | 6,81 (0,85)[c] | 2,29 |
| Linhaça | 7,57 (0,90)[c] | 6,54 (0,56)[b] | 13,6 |
| Amaranto | 7,02 (0,80)[b] | 5,49 (0,65)[a] | 21,8 |

[1]Os dados estão expressos como média (desvio padrão) n=12. Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si. ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$);[2]as fibras alimentares foram quantificadas no *pool* das fezes de 12 animais, dados expresso com média (desvio padrão) n=3. [3]Grau de fermentação =100 -(Consumo de FA/Fibras nas fezes)*100. Referência = dieta Controle AIN-93G; Controle = Dieta Controle AIN-93G + 0,5% de colesterol; Linhaça = FA da farinha de linhaça desengordurada + 0,5% de colesterol; Amaranto = farinha de amaranto desengordurada e extrusada + 0,5% de colesterol.

## 4.5 Lipídeos plasmáticos

As dietas dos grupos Linhaça e Amaranto não promoveram alterações significativas no perfil dos lipídeos plasmáticos como pode ser observado na Tabela 6.

**Tabela 6** – Concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), triglicérides (TG) e frações colesterol (HDL-c, não HDL-c) dos animais (mg/dl) dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto.

| | CT | TG | HDL-c[1] | não-HDL-c[2] |
|---|---|---|---|---|
| Referência | 71,9 (3,27)[a] | 92,6 (5,66)[a] | 43,0 (1,43)[b] | 28,9 (3,33)[a] |
| Controle | 85,1 (3,22)[b] | 143,9 (5,01)[bc] | 37,0 (1,36)[a] | 47,9 (3,39)[b] |
| Linhaça | 85,2 (3,16)[b] | 170,4 (5,08)[b] | 40,9 (1,72)[b] | 44,3 (3,18)[b] |
| Amaranto | 84,1 (3,24)[b] | 124,1 (4,62)[ac] | 43,4 (2,01)[b] | 40,1(3,31)[b] |

Os dados estão expressos como média (erro padrão) n=12. Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$). [1]HDL-c: lipoproteína de alta densidade; [2]não-HDL-c: (CT – HDL-c); Referência = dieta Controle AIN-93G; Controle = Dieta Controle AIN-93G + 0,5% de colesterol; Linhaça = FA da farinha de linhaça desengordurada + 0,5% de colesterol; Amaranto = farinha de amaranto desengordurada e extrusada + 0,5% de colesterol.

A adição de colesterol às dietas promoveu aumento médio de 18% de CT para os grupos Controle, Linhaça e Amaranto, não sendo observada redução do CT nos grupos experimentais Linhaça e Amaranto.

Observou-se aumento de TG em todos os grupos suplementados com colesterol. Com relação ao grupo Amaranto não foram observadas diferenças significativas em relação aos grupos Controle e Referência (p=0,162 e p=0,259, respectivamente). O grupo Linhaça comportou-se de forma similar ao grupo Controle (p=0,186).

Observou-se que para os grupos experimentais Linhaça e Amaranto a fração HDL-colesterol apresentou valores semelhantes aos observados no grupo Referência (p=0,384 e p=0,994, respectivamente), o qual não recebeu suplementação de

colesterol. Já para a fração não-HDL-c observou-se aumento médio de 52% em relação ao grupo Referência, porém sem diferenças significativas entre os grupos Controle, Linhaça e Amaranto.

Na Figura 8 são apresentados o peso do fígado ajustado pelo peso dos animais (g/100g de peso do animal) dos diferentes grupos. Verificou-se que os grupos Linhaça e Amaranto apresentaram perfil semelhante ao grupo Referência (p=0,976 e p=0,913), respectivamente). Ao contrário, estes apresentaram perfil estatisticamente diferente do grupo Controle (p=0,000 e P=0,000, respectivamente), ou seja, o peso do fígado dos animais dos grupos Linhaça e Amaranto foi inferior ao observado nos animais alimentados com colesterol.

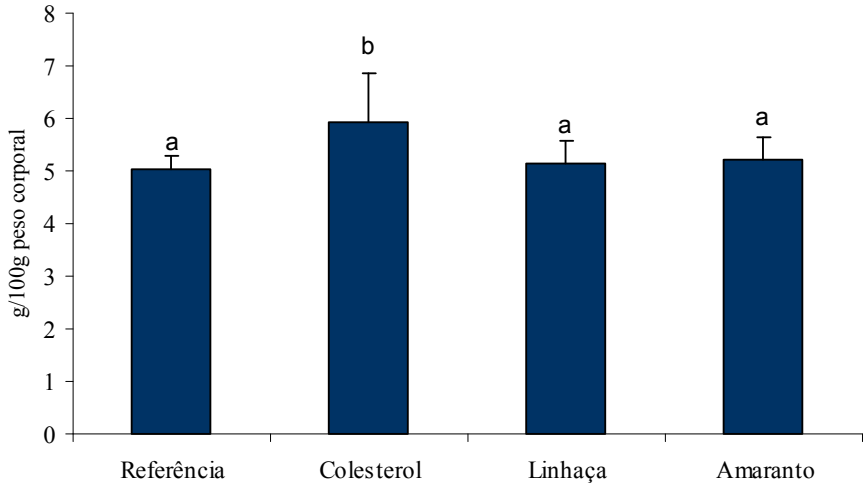


**Figura 8** – Peso do fígado dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto.

Barras com letras iguais não diferem entre si, ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$). Nas colunas está indicado o erro padrão (n=12).Referência = dieta Controle AIN-93G; Controle = Dieta Controle AIN-93G + 0,5% de colesterol; Linhaça = FA da farinha de linhaça desengordurada + 0,5% de colesterol; Amaranto = farinha de amaranto desengordurada e extrusada + 0,5% de colesterol.

O aumento do peso do fígado no grupo Controle pode estar associado a um maior acúmulo de lipídeos no órgão destes animais, uma vez que foi observado um valor reduzido de lipídeos hepáticos nos grupos Linhaça e Amaranto (Tabela 7), em relação ao grupo Controle (p=0,020 e p=0,000, respectivamente). Para o colesterol hepático foi observada diminuição da concentração apenas para o grupo Linhaça, com redução de 38% em relação ao grupo Controle (p=0,008), porém ainda maior que o grupo Referência (p=0,011). Não foi observada redução dos valores de colesterol hepático para os animais do grupo Amaranto em relação ao grupo Controle (p=0,788).

**Tabela 7** - Colesterol e Lipídeos hepáticos dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto.

| | Colesterol hepático total[1] | Lipídeos hepáticos totais |
|---|---|---|
| | mg/peso de fígado[2] | g/peso do fígado[2] |
| Referência | 21,5 (3,97)[a] | 0,24 (0,02)[a] |
| Controle | 47,1 (2,28)[c] | 0,39 (0,02)[c] |
| Linhaça | 29,2 (4,31)[b] | 0,29 (0,02)[b] |
| Amaranto | 43,9 (6,38)[c] | 0,30 (0,01)[b] |

Os dados estão expressos como média (desvio padrão) de 3 determinações (*pool* dos animais). Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$). [1]Colesterol hepático total = quantificado a partir do extrato lipídico saponificado;[2]peso do fígado ajustado ao peso de 100g do animal. Referência = dieta Controle AIN-93G; Controle = Dieta Controle AIN-93G + 0,5% de colesterol; Linhaça = FA da farinha de linhaça desengordurada + 0,5% de colesterol; Amaranto = farinha de amaranto desengordurada e extrusada + 0,5% de colesterol.

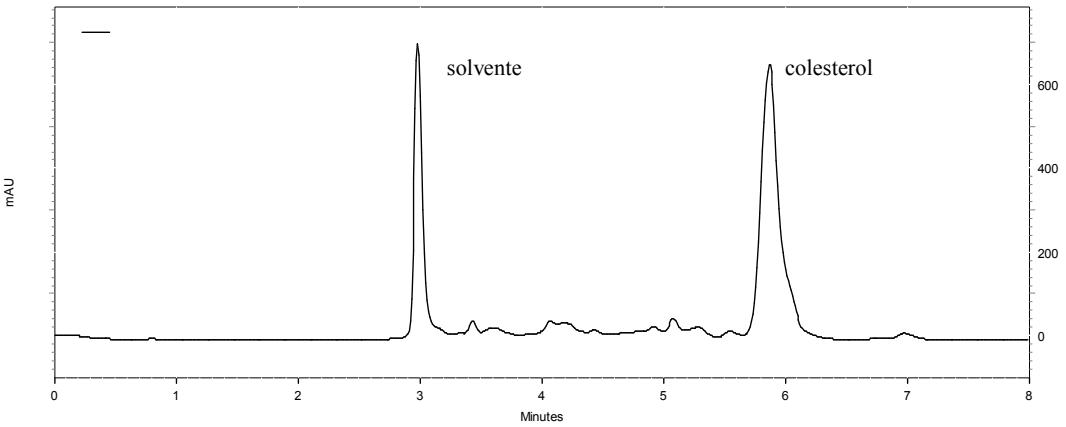


**Figura 9** – Cromatograma obtido por Cromatografia de alta eficiência para a identificação e quantificação do colesterol hepático e fecal.

## 4.6 – Excreção fecal de colesterol e ácidos biliares

A Tabela 8 apresenta os valores de colesterol e ácidos biliares excretados nas fezes correspondentes aos 4 últimos dias de ensaio. O grupo Referência apresentou baixos valores de colesterol e ácidos biliares excretados nas fezes, uma vez que a dieta destes animais não foi adicionada de colesterol. Não houve aumento na excreção de colesterol e ácidos biliares para o grupo Linhaça quando comparado com o grupo Controle (p=0,841e p=0,071, respectivamente). Em relação ao grupo Amaranto foi observado aumento significativo da excreção de colesterol (56%, p=0,000), enquanto a excreção de ácidos biliares foi significativamente menor (52%, p=0,000).

**Tabela 8** – Colesterol e ácidos biliares excretados nas fezes dos animais dos grupos Referência, Controle, Linhaça e Amaranto.

| | Colesterol | Ácidos biliares |
|---|---|---|
| | mg/4dias | μmol/4 dias[1] |
| Referência | 21,0 (2,62)[a] | 31,94 (2,60)[a] |
| Controle | 156,3 (6,46)[b] | 58,98 (3,19)[c] |
| Linhaça | 169,4 (7,21)[b] | 51,28 (2,65)[c] |
| Amaranto | 244,5 (9,32)[c] | 28,38 (2,31)[b] |

Os dados estão expressos como média (erro padrão) n=12. Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si. ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$). Referência = dieta Controle AIN-93G; Controle = Dieta Controle AIN-93G + 0,5% de colesterol; Linhaça = FA da farinha de linhaça desengordurada + 0,5% de colesterol; Amaranto = farinha de amaranto desengordurada e extrusada + 0,5% de colesterol.

## 4.7 – CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS DE ESTUDO.

Os valores obtidos através do Coeficiente de correlação de Pearson, entre as variáveis do estudo, com respectivos valores de p, são apresentados em anexo (Anexos V-XII).

# 5 DISCUSSÃO

## 5.1 CONSUMO

O consumo de ração pelos animais dos grupos Linhaça e Amaranto foi maior em relação aos demais. Entretanto, apesar deste maior consumo, não se observou diferença no ganho de peso dos animais de todos os grupos (Tabela 4).

Resultados semelhantes ao deste estudo foram observados por outros autores. Ratos alimentados com extrato de chicória e amido resistente, respectivamente, também aumentaram o consumo de ração, sem comprometimento do peso final dos animais em relação ao grupo Controle celulose (KIM e SHIN, 1999; YOUNES e col, 1995). REEDY e col. (1980), e HENNINGSSON e col. (2002) também utilizando dietas com controle celulose, observaram o oposto, onde os animais cujas dietas apresentavam pectina, carragena e goma guar, respectivamente, diminuíram o consumo de ração, sem alteração no peso final dos animais.

Outros autores não relatam alterações no padrão de consumo das dietas com diferentes qualidades de fibras alimentares (ADAM e col., 2001; FUKUSHIMA e col., 2001; YOKOGOSHI e col., 1999; GORINSTEIN e col., 1998; ARJMANDI e col. 1996).

## 5.2 PARÂMETROS FERMENTATIVOS

Alguns aspectos do "metabolismo" das fibras solúveis podem ser avaliados pelo grau de fermentação (Tabela 5), produção de AGCC no cólon (Figura 6 e 7), queda do pH do conteúdo do ceco (Figura 4), e aumento do peso e conteúdo do ceco (Figura 3) tanto para os grupo Linhaça como para o grupo Amaranto.

O aumento do peso da parede do ceco é provavelmente decorrente do incremento da produção de ácido butírico, reconhecido por ser o principal substrato preferencialmente utilizado no metabolismo oxidativo energético dos colonócitos, promovendo assim a proliferação e diferenciação dos mesmos (GÕNI e LOPES-OLIVA, 2006; FERGUNSON e col., 2001, VELASQUES e col. 1997 e 1996).

Estudos observaram que administração de AGCC estimula o crescimento das células da mucosa intestinal, quando introduzidos diretamente no cólon (TOPPING e CLIFTON, 2001; KRIPKE e col., 1989).

ADAM e col. (2001), em estudo com ratos, observaram que o ácido butírico aparece em pequenas proporções na veia porta, e em altas concentrações no ceco, sugerindo que ele é absorvido através da parede cecal e metabolizados *in situ*, promovendo o trofismo da mucosa intestinal, ou seja, o aumento do número de células intestinais, os colonócitos. Este efeito trófico do ácido butírico exerce um importante papel na inibição das células colônicas neoplásicas (VELASQUEZ e col., 1996; SCHEPPACH e col., 1995)

No intestino, os ácidos biliares são desconjugados e convertidos a ácidos biliares secundários, reconhecidos como promotores tumorais. Dentre as atribuições

anti-tumorais do ácido butírico destaca-se o efeito de interferir na ação dos ácidos biliares secundários (VELÁSQUEZ e col., 1996).

O aumento do volume do bolo fecal está relacionado à melhora do trânsito intestinal e laxação do intestino grosso. O peso das fezes úmidas dos grupos Linhaça e Amaranto foi significativamente maior que o dos grupos Controle e Referência, provavelmente pela maior capacidade de retenção de água no cólon, promovida por estas FAs, resultando, em maior peso das fezes.

Com relação ao aumento do peso das fezes úmidas é conveniente salientar que vários trabalhos que se propõem a objetivos semelhantes, utilizando FA de outros produtos, tais como: frutas, cereais, farelos, e gomas, utilizam para os grupos controle dietas isentas de FAs (DONGOWSKI e col., 2002; LEVRAT e col., 2000; KIM e SHIN, 1998; EVANS e col., 1992). Com a ausência de celulose nos grupos controle o efeito no aumento do peso das fezes, pelo aumento da capacidade de retenção de água, será muito mais expressivo nas dietas dos grupos testes.

As bactérias representam em média 40 a 50% do peso das fezes (ADAM e col., 2001). Assim é de se supor que o aumento de peso das fezes secas dos animais do grupo Amaranto sugere possível aumento na flora bacteriana, provavelmente em função da fermentação da FA. Este aumento de peso não foi observado nas fezes do grupo Linhaça.

Observou-se aumento das concentrações totais de AGCC no ceco dos grupos experimentais em relação ao controle. São vários os efeitos benéficos atribuídos a fermentação dos carboidratos no cólon e produção de AGCC. A produção de AGCC justifica a queda de pH observada (Figura 4). A literatura refere que esta acidificação do meio colônico inibe o crescimento de bactérias patogênicas, principalmente

*clostridium*; aumenta indiretamente a absorção de minerais; e reduz a absorção de amônia (WONG e col., 2006). Além dos efeitos benéficos do ácido butírico, citados anteriormente, a possível influência do ácido propiônico no metabolismo hepático será posteriormente discutida.

A queda do pH no ceco representa um indicador da fermentação colônica e está de acordo com a produção de AGCC. Para os grupos Linhaça e Amaranto foram observados valores de pH de 6,33 e 6,13, indicando queda de 0,4 e 0,6 unidades, respectivamente, em relação ao pH do grupo Controle, caracterizando acidificação moderada.

Por meio da investigação da fermentação *in vitro,* SWANSON e col. (2001) observaram que a linhaça apresenta grau de fermentação moderado, 1,44 mmol/g de matéria orgânica (MO), em relação a produtos de controle: pectina (6,66 mmol/g MO), psilium (3,29 mmol/gMO) e flocos de soja (0,05 mmol/g MO) e outros vegetais estudados (polpa de maçã 2,24 mmol/g MO; polpa de cenoura 4,22 mmol/g MO; polpa de uva 0,83 mmol/g MO; pistache 0,46 mmol/g MO, e polpa de tomate 1,71 mmol/g MO.

Desconhecem-se na literatura outros trabalhos que tenham investigado a produção de AGCC promovida pela fermentação colônica da FA dos grãos de linhaça e amaranto.

FUKUMOTO e col. (2003) observaram que os AGCC estimulam o trânsito intestinal pela 5-hidroxitriptamina, que é transportada pelo sistema vagal eferente, onde é estimulada a liberação da acetilcolina a partir do plexo mesentérico colônico, resultando na contração do músculo do cólon proximal. Apesar de ao longo do trabalho não ter sido possível a investigação da freqüência de defecação dos animais,

o aumento da capacidade de absorção de água das fibras dos grãos de linhaça e amaranto, e o aumento da produção de AGCC, mostram a influência destas fibras na melhora do trânsito intestinal.

Os resultados demonstram que o grau de fermentação da FA da linhaça foi 13,6 % e da FA alimentar do amaranto 21,8 % (Tabela 5). Este dado é interessante uma vez que as frações solúveis das FAs são reconhecidas como mais fermentáveis que as fibras insolúveis (WONG e col., 2006), e as dietas dos grupos Linhaça e Amaranto apresentaram 33% e 10% de fibra solúvel, respectivamente. Ou seja, observa-se uma maior fermentação para o grupo com menor teor de fibra solúvel (grupo Amaranto), e menor fermentação para o grupo com maior teor de fibra solúvel (grupo Linhaça).

Segundo ADAM e col. (1994), quando a celulose está dispersa na matriz complexa da farinha do grão, ela está mais exposta à degradação microbiana, e esta característica pode em parte explicar a fermentação da FA da farinha de amaranto, em proporção acima ao teor de fibra solúvel quantificado por métodos analíticos.

Segundo a FAO/OMS (1998) os termos fibra solúvel e insolúvel surgiram com os estudos químicos dos polissacarídeos não amiláceos à medida que se observaram que frações destes polissacarídeos podiam ser separadamente extraídas através de mudanças de pH das soluções. No início, esta classificação foi bastante útil permitindo uma simples diferenciação entre as frações que em geral promoviam efeitos fisiológicos benéficos com relação ao metabolismo lipídico (fração solúvel), daquelas frações que sendo pouco fermentadas melhoravam o trânsito intestinal (fração insolúvel). No entanto, propõe-se que a separação das frações em solúveis e insolúveis não é muito distinta quimicamente, uma vez que depende das condições

de extração. Com base nesta problemática, a junta de *experts* da Conferência sobre Carboidratos e Nutrição Humana organizada pela FAO e OMS (1998) sugeriu que os termos fibra solúvel e insolúvel, apesar de serem amplamente utilizados, fossem gradualmente colocados em desuso, uma vez que não se pode necessariamente atribuir efeito fisiológico característico de uma determinada fração apenas pela sua determinação química em fibra solúvel ou insolúvel em água.

Alguns trabalhos destacam que alimentos com mesmo teor de fibras solúveis, mas com graus de polimerização ou metoxilação diferentes (no caso de pectinas, por exemplo), promovem efeitos também distintos *in vivo*. EVANS e col. (1992) observaram três galactomanas com diferentes razões de galactose/manose, observando que esta proporção influenciou no grau de efeito hipercolesterolemiante, bem como produção de AGCC. Pectinas com diferentes graus de metilação e pesos moleculares, influenciaram as concentrações e composição intestinal e fecal de esteróis em ratos (DONGOWSKI e LORENZ, 2003).

## 5.3 METABOLISMO LIPÍDICO

Não foram observadas diferenças significativas no colesterol plasmático total entre os grupos Linhaça e Amaranto, quando comparados ao grupo Controle. Entretanto, verificaram-se alterações nas frações lipoprotéicas com aumento dos valores de HDL-colesterol para os grupos Linhaça e Amaranto, 10,5 e 17,3%, respectivamente, em relação ao grupo Controle, sem diferenças estatisticamente

significativas em relação ao grupo Referência (Tabela 6). Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores. Com a administração de diferentes concentrações de extrato de chicória e inulina, KIM e SHIN (1998) não observaram diferença nos valores de colesterol total, porém aumento da fração HDL-c em ratos. DONGONSKY e col. (2002) em experimento com cevada, utilizando ratos com níveis plasmáticos de lipídeos normais, também não observaram alterações nos níveis de colesterol total e frações. APRIKIAN e col. (2003) em estudo com ratos hipercolesterolemizados, também não observaram diferenças no colesterol total (não são referidas as frações no trabalho), em estudo com um grupo de animais alimentados com extrato de fibra de maçã, e outro com polifenóis de maçã.

O efeito hipocolesterômico observado em estudos com fibras alimentares está intimamente relacionado com o grau de hipercolesterolemia induzida, porcentagem de adição de colesterol, presença ou ausência de ácido cólico, a quantidade de FA utilizada, e ao modelo e espécies de animais envolvidos (KIM e SHIN, 1998), bem como diferentes mecanismos de ação entre as FAs (GALLAHER e col., 1993). Quanto maior o aumento de hipercolesterolemia induzida nos animais, ou em caso de humanos o grau de hipercolesterolemia pré-existente, maiores são os percentuais de queda do colesterol plasmático ou sérico, onde a magnitude da resposta é inversamente relacionada ao grau inicial de colesterolemia (BAKHIT e col., 1993; HILLMAN e col., 1985; KIM e SHIN 1998). Neste trabalho com a adição de 0,5% de colesterol às rações, obteve-se apenas 18% de incremento nas concentrações de colesterol total para o grupo Controle (Tabela 6).

No presente trabalho optou-se por estudar o comportamento da FA dos grãos de linhaça e amaranto sem extrair-se a fração solúvel, pois teve-se a intenção de

investigar um possível efeito funcional da recomendação do consumo destes grãos na alimentação. As inferências quanto ao aumento da fração HDL-colesterol observadas no modelo utilizado, não podem ser diretamente relacionadas com o metabolismo humano (WILLIAN e col., 1976). Os efeitos hipercolesterolemiantes atribuídos às FAs, na literatura, são relacionados principalmente às frações solúveis, as quais representam 33% e 10% respectivamente, do total de fibra adicionada às dietas Linhaça e Amaranto, neste experimento. Esta modesta quantidade de fibra solúvel pode não ter sido suficiente para a não redução do colesterol plasmático.

Apesar da extensa utilização de ratos para a investigação do metabolismo lipídico, se reconhece que outros modelos animais como hamsters e coelhos são mais recomendados, uma vez que apresentam perfil de lipoproteínas e reagem a uma dieta hipercolesterolemizante mais semelhantemente ao homem.

Um dos objetivos deste trabalho foi a investigação de parâmetros fermentativos, e para isso, a utilização de animais que apresentam mecanismos para digestão intestinal, mesmo que parcial das FAs, não era conveniente. Nos hamsters o estômago é separado em duas partes, sendo que já foram observados AGCC no conteúdo da primeiro estômago, e desse modo, sugere-se que possa haver fermentação bacteriana no estômago tal como ocorre no rúmen (HOOVER e col., 1969).

Dentre os mecanismos propostos para esclarecer a capacidade das fibras solúveis em reduzir o colesterol plasmático, dois se destacam. O primeiro sugere que as FAs solúveis aumentam a viscosidade do lúmen intestinal, inibindo a reabsorção de colesterol e ácidos biliares, sendo excretados nas fezes. Isto, por sua vez estimula a síntese de ácidos biliares utilizando colesterol do *pool*, e consequentemente

observa-se a redução do colesterol plasmático. O outro mecanismo sugere que o efeito hipercolesterolemiante pode também estar relacionado à fermentação das FAs solúveis pela flora colônica no intestino grosso. Os AGCC produzidos, em especial o ácido propiônico, carreados pela veia porta, seriam responsáveis pela supressão da síntese de colesterol hepático (WONG e col., 2006).

Considerando os resultados do presente estudo, observa-se que para a FA da linhaça a absorção de colesterol e ácidos biliares não se alterou, uma vez que não foi observada maior excreção fecal dos mesmos. Estes dados sugerem que a capacidade viscosa da FA da linhaça, ou a quantidade presente (33% de fibra solúvel no total de fibra da dieta), não foram suficientes para seqüestrar o colesterol e ácidos biliares no lúmen colônico dos ratos. E em decorrência da reabsorção de ácidos biliares e colesterol no lúmen intestinal, esta FA não foi eficiente para promover a queda no colesterol plasmático.

Por outro lado, foi observado aumento de 103% na concentração de AGCC, em relação ao grupo Controle (Figura 6), e redução do colesterol total hepático (Tabela 7), sugerindo que o ácido propiônico possa ter favorecido a supressão da síntese de colesterol hepático no grupo Linhaça.

Vários autores propõem que o ácido propiônico afeta o metabolismo dos tecidos periféricos e inibe a síntese de colesterol hepático. WRIGHT e col., (1990) verificaram o efeito do ácido propiônico na síntese de lipídeos nos hepatócitos de ratos, observando que ele inibiu a síntese de colesterol e ácidos graxos. HARA e col. (1999) em estudo ratos que receberam uma mistura dos ácidos butírico, propiônico e acético na forma de sais de sódio, observaram menor síntese de colesterol hepático com a administração de AGCC, acompanhado de queda no colesterol plasmático.

CHEN e col. (1984) e VENTER e col. (1990) observaram redução dos lipídeos séricos e hepáticos em ratos alimentados com ácido propiônico (0,5% e 2% de propionato de sódio, respectivamente). LEVRAT e col. (1991), e MOURAND e col. (1992) observaram que inulina e amido resistente, respectivamente, apresentavam efeito hipercolesterolemiante apesar destas FAs alimentares não serem viscosas, e atribuíram este efeito a uma possível ação do ácido propiônico, uma vez que estas frações são amplamente fermentadas. MOUNDRAS e col. (1995) observaram em estudo com ratos, que receberam colestiramina (resina com grande capacidade sequestrante de ácidos biliares) e β-ciclodextrina (oligossacarídeos amplamente fermentado no cólon), que a colestiramina foi mais efetiva na excreção de ácidos biliares nas fezes, Todavia o grupo β-ciclodextrina, apesar de promover menor excreção de ácidos biliares, apresentou maior efeito hipocolesterolemiante. Os autores sugerem que houve um efeito sinérgico entre a excreção de ácidos biliares e alta produção de AGCC, em especial o ácido propiônico, que inibe a síntese de colesterol hepático.

No entanto, as investigações ainda não são conclusivas quanto ao real papel do ácido propiônico sobre o metabolismo lipídico. LEVRAT e col. (1994) observaram em estudo com ratos que a administração de altas doses de ácido propiônico não foi suficiente para conter a indução da HMG-CoA redutase, sugerindo que as perdas fecais de ácidos biliares representam o principal papel no efeito hipercolesterolemiante dos carboidratos indigeríveis. NISHINA e FREELAND (1990) também não observaram inibição da síntese de HMG-CoA redutase pela ação do ácido propiônico em hepatócitos isolados *in vitro*.

Outros autores também observaram queda do colesterol hepático, sem alteração significativa do colesterol plasmático para farelo de aveia e fibra de soja, atribuindo estes efeitos intermediários ao fato destas frações apresentarem tanto fibra solúvel como insolúvel na sua composição (ANDERSON e col., 1994). Tal como as fibras de linhaça e amaranto.

Maiores esclarecimentos sobre o provável efeito hepaprotetor da produção de ácido propiônico pela fermentação da FA da Linhaça, poderiam ser melhor avaliados pela investigação das taxas de síntese de esteróis hepáticos

O grupo Amaranto não apresentou queda no colesterol hepático, apenas o teor de lipídeos totais foi menor que o do grupo Controle. KIM e SHIN (1998), e VANHOOF e De SCHRIJVER (1995) também não observaram queda do colesterol hepático com administração de extrato de chicória e inulina em ratos, o contrário do observado com pectinas e goma guar (ANDERSON e col.,1994).

No grupo Amaranto foi observada maior excreção de colesterol e menor excreção de ácidos biliares nas fezes em relação ao grupo Controle sem, no entanto, verificar-se efeito hipercolesterolemiante. Destaca-se a queda do teor de excreção de ácidos biliares nas fezes.

A síntese de colesterol e ácidos biliares no fígado está envolvida em um complexo mecanismo molecular, sendo que a conversão hepática do colesterol em ácidos biliares é o caminho predominante para a excreção de colesterol em mamíferos. A maior parte dos ácidos biliares excretados no intestino é reabsorvida (principalmente no íleo e em menor extensão no intestino grosso), e por este motivo é baixa a excreção de ácidos biliares nas fezes. O aumento da excreção de ácidos biliares está relacionado a diferentes mecanismos que levam a uma interrupção

parcial da sua circulação entero-hepática (MOUNDRAS e col 1996). A queda da excreção dos ácidos biliares no grupo Amaranto em relação ao grupo Controle, não é usualmente observada na literatura científica, uma vez que os efeitos hipercolesterolemiantes das fibras alimentares frequentemente estão associados a uma possível aceleração da oxidação do colesterol pela indução da colesterol 7α-hidroxilase, enzima limitante da taxa de síntese de ácidos biliares no fígado, em resposta à menor reabsorção de ácidos biliares (DONGOWSKI e col. 1999).

MENDONÇA (2006), em estudo com hamsters também observou menor excreção de ácidos biliares nas fezes do grupo que recebeu isolado protéico de amaranto em relação ao grupo Controle, com concomitante redução do colesterol plasmático e maior excreção fecal de colesterol Em estudo com pectina de maçã, APRIKIAN e col. (2003) observaram comportamento semelhante ao da fibra do amaranto extrusado, onde houve aumento da excreção de colesterol nas fezes, redução da excreção de ácidos biliares, e nenhuma alteração no colesterol plasmático em relação ao grupo Controle.

CARR e col. (2003) avaliaram fibras alimentares com diferentes graus de viscosidade em ratos e hamsters, e apesar das altas viscosidades observadas nos conteúdos intestinais, foi observada redução da excreção de ácidos biliares nas fezes. LEVRAT e col. (1994 e 1991) observaram menor excreção de ácidos biliares em ratos alimentados com inulina. Nestes casos (CARR e col, 2003; LEVRAT e col., 1994 e 1991) apesar da redução na excreção de ácidos biliares nas fezes, foi observado efeito hipercolesterolemiante com as dietas administradas. Estes dados mostram que os estudos para a avaliação dos mecanismos pelos quais as FA reduzem o colesterol plasmático e hepático ainda são inconsistentes e conflitantes.

Alguns autores sugerem que o aumento da excreção de ácidos biliares e perfil qualitativo dos esteróis nas fezes estão intrinsecamente relacionados com a fermentação de carboidratos não digeríveis no cólon. DONGOWSKY e LORENZ, (2003) observaram maior excreção de ácidos biliares e esteróis neutros em animais convencionais quando comparados com animais tratados com antibióticos (*germ free*). Considerando-se os resultados observados para o grupo Amaranto, a ausência de efeito hipercolesterolemiante e redução da excreção de ácidos biliares, sugere-se que apesar do aumento da produção de ácidos graxos, 80,4% a mais de ácido propiônico em relação ao grupo Controle, e diminuição de pH colônico, não houve suficiente estímulo para que se afetasse a solubilidade dos ácidos biliares no lúmen intestinal, e sua excreção fosse aumentada. Outro fator pode ser a baixa viscosidade da FA do grão de amaranto no cólon.

Os resultados observados por DANZ e LUPTON (1992) são justamente opostos aos observados no presente trabalho. Em estudo com ratos (Sprague Dawley) alimentados com 8% de suplemento de fibra de amaranto (*Amaranthus cruentus L.*) (sendo que deste suplemento 17% são representados por FA) relatam redução de 24% e 28% no colesterol plasmático e hepático, respectivamente, nenhuma redução de pH e aumento da área do ceco. Estes dados são conflitantes ao encontrados no presente estudo, e confundem ainda mais a investigação dos efeitos das FAs alimentares do grão de amaranto, bem como os mecanismos fisiológicos envolvidos. Sugere-se que a pequena concentração de fibra alimentar presente na dieta dos animais (DANZ e LUPTON, 1992), que representa 1,36 % do total (17% dos 8% de suplemento FA alimentar adicionado à dieta) não permitiu a observação de efeitos fisiológicos fermentativos como alterações no pH colônico e aumento da área do

ceco. Desconhecem-se outros autores que estudaram características semelhantes das FAs do grão de amaranto.

Vários autores atribuem efeito hipercolesterolemiante ao grão de amaranto, através de estudos conduzidos com animais, tanto com o grão integral, como com o estudo de suas frações. QURESHI e col. (1996) em estudo com galinhas que receberam rações com grão de amaranto integral, estourado (*popped*) e óleo de amaranto, observaram redução do colesterol sérico e LDL-colesterol (10-30% e 7 a 70%, respectivamente), sem alteração da fração HDL-colesterol. Os autores sugerem que este efeito está relacionado a tocotrienóiss e esqualeno. MENDONÇA (2006) observou que o isolado protéico de amaranto promoveu queda no colesterol total plasmático de hamsters. PLATE e ARÊAS (2002) verificaram que o grão extrusado desengordurado promoveu queda no colesterol plasmático em coelhos, porém não observaram efeito hipercolesterolemiante nos animais alimentados com a fração lipídica do grão. Dentro das condições do presente trabalho, a administração de 7% de FA do grão de amaranto em ratos não promoveu queda no colesterol plasmático, sugerindo que frente aos estudos atuais o efeito hipercolesterolemiante observado para o grão de amaranto parece estar relacionado a fração protéica, sendo que os dados hipercolesterolemiantes relacionados a fração lipídica ainda são inconclusivos.

A título de comparação, o grão de soja apresenta em média 20 % de FAs, todavia, a proteína de soja e isoflavonas são mais fortemente relacionados ao efeito hipercolesterolemiante da soja. Vários estudos corroboram os efeitos hipercolesterolemiantes da proteína de soja (ANDERSON e col., 1995; CARROL e KUROWSKA, 1995) tanto que a *Food and Drug Administration*, norte-americana aprovou o isolado protéico de soja como alimento funcional, considerando que o

consumo de 25g ao dia, aliados a uma dieta pobre em gorduras saturadas e colesterol, contribui para a redução do colesterol sérico (FDA, 1999). Apesar de ser observado efeito hipercolesterolemiante para a fibra de soja, este não é expressivo (ADAM e col., 1994; BAKHIT e col., 1994). Em estudo com indivíduos hipercolesterolêmicos, a utilização de dietas com isolado protéico de soja e isolado protéico com FA de soja, não promoveu maior efeito hipercolesterolemiante para a dieta adicionada de FA (BAKHIT e col. 1994).

A linhaça é considerada um alimento funcional que recentemente vem ganhando atenção, dentre outras situações, na prevenção do risco cardiovascular. Dentre os mecanismos que estão associados a esta proteção estão a redução do colesterol sérico, da agregação plaquetária, modulação de marcadores inflamatórios; melhora da tolerância da glicose; e ação antioxidante. BLOEDON e col. (2004) em revisão levantaram estudos que demonstram que a linhaça está envolvida em vários destes mecanismos, especialmente pela presença na sua constituição de: ácido α-linolêico, lignanas e fibra solúvel. Sugere-se que a ação do ácido α-linolêico esteja relacionada à sua interferência na produção de eicosanóides (prostaglandinas E2, tromboxanos Ax2 e leucotrienos B4) que são pró-inflamatórios e pró- agregatórios plaquetários (KINSELLA e col., 1990). PRASAD e col. (1999) sugerem que as lignanas apresentem ação direta sobre a redução do colesterol.

A maioria dos estudos para avaliar o comportamento do grão de linhaça no metabolismo lipídico foi realizada com o grão integral (moído ou não), sendo observados efeitos modestos na redução do colesterol, em humanos e animais, com pouco ou nenhum efeito nas frações HDL-colesterol e triglicérides (PELLIZZON e col., 2007; LEMAY e col., 2002; LUCAS e col., 2002; CLARK e col., 2001;1995;

ARJMANDI e col., 1998; CUNNANE e col., 1995, 1993;BIEREBAUM e col., 1993).

Em estudo com mulheres após a menopausa, que consumiram *muffins* com 50g de farinha de linhaça parcialmente desengordurada (sem ácido α-linolêico), JENKINS e col. (1999) observaram redução do colesterol (-4,6 %) e LDL (-7,6%), atribuindo este efeito a presença de FA e lignanas. PRASAD e col. (1998) em estudo com coelhos, alimentados com dieta hipercolesterolemiante (1% de colesterol) e linhaça parcialmente desengordurada (porém com quantidade de lignanas semelhante a da farinha integral) observaram redução no colesterol sérico e LDL-colesterol. Estudo posterior avaliou a administração de 15mg/kg de lignanas em coelhos hipercolesterolemizados, observando expressivos resultados no perfil lipídico com redução do colesterol total, LDL-colesterol e aumento da HDL-colesterol (-33%, - 35 e + 140%, respectivamente) (PRASAD e col.,1999).

Apesar do não conhecimento das diferentes frações que compõem as FAs dos grãos de linhaça e amaranto, levanta-se nesse trabalho o julgamento que a ação fisiológica de uma fração indigerível no trato gastrintestinal superior, não deve ser presumida unicamente com base na mensuração das frações solúvel e insolúvel por análises de quantificações químicas *in vitro*. As análises químicas são muito importantes e permitem compreender diferentes comportamentos das fibras alimentares, além de comporem as tabelas de composição dos alimentos, contribuindo com o trabalho de profissionais de saúde na escolha dos alimentos. Todavia, certas atribuições de causa e efeito devem ser feitas com cautela, uma vez que a matriz da FA é muito complexa.

Considerando o observado no presente estudo, reconhece-se que a linhaça apresenta alto teor de fibra solúvel, todavia, esta fibra solúvel não foi eficiente no seqüestro de colesterol e ácidos biliares no lúmen intestinal, e não reduziu a colesterolemia. Por outro lado, a FA do grão de amaranto, apesar de apresentar pequena quantidade de fibra solúvel (10% do total de FA), foi fermentada pela flora colônica promovendo significativo aumento da produção de AGCC em quantidades semelhantes à FA da linhaça.

# 6 CONCLUSÕES

As fibras alimentares dos grãos de linhaça e amaranto foram parcialmente fermentadas pela flora intestinal colônica.

O trofismo observado no ceco provavelmente está relacionado ao crescimento saudável dos colonócitos pela utilização do butirato produzido pela fermentação colônica, que contribui para a promoção de uma mucosa mais resistente à patógenos e carcinógenos.

O significativo aumento do peso das fezes úmidas evidencia a capacidade de retenção de água destas frações, parâmetro este relacionado com a melhora da velocidade do trânsito intestinal e laxação. A fibra de amaranto, além do aumento em peso das fezes úmidas, também favoreceu o aumento de peso das fezes secas, sugerindo aumento da flora bacteriana, decorrente da fermentação colônica.

Em relação ao total de FA mensurado, o grau de fermentabilidade das FAs dos grãos de amaranto e linhaça não se relacionaram com os valores previamente determinados para a fração FA solúvel, respectivamente. Dentro deste contexto, não se mostra adequado presumir o efeito fisiológico das FAs somente pela avaliação dos teores das frações solúveis e insolúveis mensuradas quimicamente.

Não foi observada ação hipocolesterôlemica promovida pelas FA dos grãos de linhaça e amaranto nas condições utilizadas. A FA da linhaça não se mostrou capaz de seqüestrar os ácidos biliares e colesterol do lúmen intestinal. Com relação à fibra do grão de amaranto, se desconhecem os mecanismos que promoveram o aumento da excreção de colesterol e diminuição de ácidos biliares nas fezes.

A redução do colesterol hepático observada no grupo Linhaça pode estar relacionada à “hipótese do propionato”, uma vez que houve aumento da produção colônica deste.

# 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abell LL, Levy BB, Brodie RB, Kendall RB. Simplified method for the estimation of total cholesterol I serum and demonstration of its specificity. **J Biol Chem** 1952; 195: 357-366.

Adam A, Levrat-Verny MA, Lopez HW, Leuillet M, Demigné C, Rémesy C. Whole wheat and triticale flours with differig viscosities stimulate cecal fermentations and lower plasma and hepatic lipids in rats. **J Nutr** 2001, 131: 1770-1776.

Anderson JW, Jonhstone BM, Cook-Newel ME. Metha-analysis of effects of soy protein intake on serum lipids in humans. **N Eng J Med** 1995, 333: 276-282.

Aprikian O, Duclos V, Guyot S, Besson C, Manach C, Bernalier A, Morand C, Rémesy C, Demigné C. Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. **J Nutr** 2003, 133: 1860-5.

Arêas JAG. Uso de matérias-primas não convencionais na composição de Dietas especiais. **Cadernos de Nutrição** 1983; 6:11-15.

American Association of Cereal Chemists. The definition of dietary fiber. Report of the dietary fiber definition committee to the board of directors of the AACC. **Cereal Foods World** 2001; 46(3): 112-129.

Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of Analysis.** 13ª ed., Washington: AOAC; 1990. p. 858.

Association of Official Analytical Chemists**.** Method 991.43, Total, Insoluble and Soluble Dietary Fiber in Food-Enzymatic-Gravimetric Method, MES-TRIS Buffer. **Official Methods of Analysis***,* 16th ed., Gaithersburg, MD, 1995.

Arjmandi BH, Khan DA, Juma S, Drum ML, Venkatesh S, Sohn E, Wei L, Derman R. Whole flaxseed consumption lower serum LDL and lipoprotein (a) concentrations in postmenopausal women. **Nutr Res** 1998; 18 (7): 1203-14.

Bakhit RM, Klein BP, Essex-Sorlie D, Ham JO, Erdman JW, Potter SM. Intanke of 25g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. **J Nutr** 1993; 124: 213-222.

Barros, Silva RSF, Borsato D, Arêas JAG. Otimização das condições de extrusão de farelo de soja pelo emprego da metodologia de superfície de resposta. **Bol Centro Pesquisa e Process Aliment** 1987; 5: 61-70.

Barry JL, Hoebler C, Macfarlane GT, Marfarlane S, Mathers JC, Reed KA, Mortesen PB, Nordgaard I, Rowland IR, Rumney CJ. Estimation of the fermentability of dietary fiber in vitro: a European interlaboratory study. **Br J Nutr** 1995; 74: 303-322

Bartiniskowska E. The role of dietary fiber in the prevention of lipid metabolism disordens. CHO SS, Prosky L, Dreher M. **Complex carbohydrates in foods**. New York: Marcel Dekker; 1999. p.53-62

Belobrajdic DP, Mcintosh GH, Dietary butyrate inhibits NMU-induced mammary cancer in rats, **Nutr. Cancer** 2000**;** 36: 216-223.

Bhathena SJ, Ali AA, Haudenschild C, Latham P, Ranich T, Mohamed AI, Hansen CT, Velasquez MT. Dietary flaxseed meal is more protective then soy concentrate against hypertriglyceride and steatosis of the liver in an animal model of obesity. **J Am Coll Nutr** 2003; 22 (2): 157-64.

Bierebaum ML, Reichstein R, Watkins TR. Reducing atherogenic risk in hyperlipemic humans with flax seed supplementation: a preliminary report. **J Am Coll Nutr** 1993; 12:501-504.

Bloedon LT, Szapary PO. Flaxseed and cardiovascular risk. **Nutr Rev** 2004, 62:18-27.

Bourquin LD, Titgemeyer EC, Fahey GC. Fermentation of various dietary fiber sources by human fecal bacteria. **Nutr Res** 1996; 16 (7): 1119-1131.

Burkitt D, Heaton K. **Dietary fibre, fibre-depleted foods and diseases**. London. Academic Press. 1985. p1-20. Apud Dreher M. Handbook of dietary fiber: an applied approach. New York. Marce Dekker. 1987. P 1-13

Burkit DP, Spiller GA Dietary fiber: from early hunter-gatherers to the 1990s. In Spiller GA. **CRC Handbook of dietary fiber in human nutrition**. 2ed. Boca Raton: CRC Press; 1993. p3-6.

Carr TP, Wood KJ, Hassel CA, Bahl R, Callaher DD. Raising intestinal contents viscosity leads to great excretion of neutral steroids but not bile acids in hamsters and rats. **Nutr Res** 2003; 23: 91-102.

Carrol KK, Kurowska EM. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and humans studies. **J Nutr** 1995; 125:594S-597S.

Casterline JL, Oles CJ, Ku Y. In vitro fermentation of various food fiber fractions.**J Agric Food Chem** 1997; 45 (7):2463-7.

Chen WJ, Anderson JW, Jennings D. Propionate may mediate the hypocoleterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. **Proc Soc Exp Biol Med** 1984; 175: 215-218.

Chen BH, Chen YC. Evaluation of the analysis of cholesterol oxides by liquid chromatography. **J Chromat** 1994; 661:127-136.

Clark WF, Parbtani A, Huff MW. Flaxseed: a potential treatment for lupus nephritis. **Kidney Int** 1995, 48:474-480.

Clark WF, Kortas C, Heidenheim AP, Garland J, Spanner E, Parbtani A. Flaxseed in lupus nephritis: a two-year nonplacebo-controlled crossover study. **J Am Coll Nutr** 2001; 20:143-148.

Coelho, KD. Desenvolvimento e avaliação da aceitação de cereais matinais e barras de cereais à base de amaranto (Amaranthus curentus L.) [Dissertaçãode mestrado]. São Paulo: Nutrição Humana Aplicada (FCF/FEA/FSP); 2006.

Cui WS. Flaxseed: a functional food for the 21 st century. **Canad Chem News** 1998; 50 (5) p19.

Cunname SC, Hamedeh MJ, Liede AC, Thompson LU, Wolover TM, Jenkins DJ. Nutritional attributes of traditional flaxseeds in healthy young adults. **Am J Clin Nutr** 1995; 61:62-68.

Danz RA, Lupton JR. Physiological effects of dietary amaranth (Amaranthus cruentus) on rats. **Cereal Food World** 1992; 37:489-494.

Derive SCN, Mendez MHM. Uma visão retrospectiva da fibra e doenças cardiovasculares. In Lajolo FM, Saura-Calixto F, Penna E W, Menezes E W. **Fibra dietética em iberoamérica: tecnologia e salud: obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 2001. p 311-38.

De Vries JW, Rader JI. Historical perspective as a guide for identifying and developing applicable methods for dietary fiber. **J. AOAC International** 2005; 88 (5):1349-1366.

De Vries JW. The definition of dietary fiber. **Cereal Foods World** 2001; 46 (3): 112-29.

Dongowski G, Ehwald R. Binding of water, oil, and bile acids of dietary fibers of the cellan type. **Biotechnol. Prog** 1999; 15: 250-258.

Dongowski G, Lorenz A. Intestinal steroids in rats are influenced by the structural parameters of pectin. **J Nutr Biochem** 2003; 15: 196-205.

Dongowski G, Huth M, Gebhardt E, Flamme W. Dietary fiber-rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats. **J. Nutr** 2002; 132: 3704-3714.

Eaton SB, Konmer M Paleolithic nutrition consideration of its nature and current implication. **N Eng J Med** 1985; 312(5): 283-9.

Evans B, Hood R, Oakenfull D, Sidhu G. Relationship between structure and function of dietary fibre: a comparative study of the effects of three galactomannans on cholesterol metabolism in the rat. **Brit J Nutr** 1992; 68: 217-29.

Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO) Codex Alimentarius Commission**. Proposals for a Definition and Methods of Analysis for Dietary Fibre Content**. 26th Session, Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses; November 21, 2004; Bonn, Germany.

FAO/WHO Food and Agriculture Organization/ World Health Organization.**Carbohydrates in human nutrition**. Report of a join FAO/WHO expert consultation. 66. Rome 1998.

Fergunson LR, Ramesh RC, Harris PJ. Changing concepts of dietary fiber: implications for carcinogenesis, **Nutrition and Cancer** 2001**;** 2: 155-169.

Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Washington, DC: National Academies Press; 2002. [acesso em 12 jun 2007].Disponível: http://www.nap.edu/books/0309085373/html.

Fda.gov [home page da internet]. FDA approves new health claim for soy protein and coronary heart disease. Department of Health and Human Services. [acesso em 15 jul 2007].Disponível em:http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/ANS00980.html

Fukumoto S, Tatewaki M, Yamada T, Fujimiya M, Mantyh C, Voss M, Eubanks S, Harris M, Pappas TN, Takanhashi T. Short chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comput Physiol** 2003, 284, R1269-76.

Fukushima M, Ohashi T, Fujiwara Y, Sonoyama K, Nakano M. Cholesterol-lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake, (*Lentinus edodes*), fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats. **Exp Biol Med** 2001, 226(8): 758-65.

Gallaher DD, Massel CA, Lee K, Gallaher CM. Viscosity and fermentability as attributes of dietary fiber responsible for the hypocholesterolemic effect in hamsters. **J Nutr** 1993; 123: 244-252.

Gõni I, Lopes-Oliva E. Carbohidratos y salud gastrointestinal. In: Lajolo FM, Menezes EW(eds.) **Carbohidratos en alimentos regionales ibero americanos. Projecto CYTED/CNPq XI.18. Composion, estructura, propriedades biológicas de carbohidratos y su utilización en alimentos**. São Paulo: EDUSP; 2006.p.289-308.

Gõni I, Martín-Carrón N.Fermentación cólonica de fibra dietética y almidón resistent. In Lajolo FM, Saura-Calixto F, Penna E W, Menezes E W. **Fibra dietética**

**em iberoamérica: tecnologia e salud: obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 2001. p 311-38.

Goñi I, Garcia Alonso A, Saura-Calixto F. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. **Nutr Res** 1997; 17(3): 427-7.

Goñi I. In vitro fermentation and hydration properties of commercial dietary fiber rich supplements. **Nutr Res** 1998; 18: 1077-89.

Gorinstein S, Bartnikowska E, Kulasek G, Zemser M, Trakhtenberg S. Dietary persimmon improves lipid metabolism in rats fed diets containing cholesterol. **J Nutr** 1998; 128: 2023-7.

Hara H, Haga S,Aoyama Y, Kiriyama S. Short-Chain Fatty Acids Suppress Cholesterol Synthesis in Rat Liver and Intestine. **J Nutr** 1999; 129: 942-948.

Henningsson AM, Björck IME, Nyman MGL. Combinations of indigestible carbohydrates affect short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats. **J Nutr** 2002; 132: 3098-3104.

Hillman L, Peters S, Fisher A, Pomare E. The effects of the fiber components pectin, cellulose and lignin on serum cholesterol levels. **Am J Clin Nutr** 1985; 42: 207-13.

Hipsley E H. Dietary "fibre" and pregnancy toxaemia. **Brit. Med. J** 1953;2:420. apud De Vries JW, Prosky L, Li B, Cho S. A Historical Perspective on Defining Dietary Fiber. **Cereal Foods World** 1999; 44 (5): 367-369.

Hoover WH, Mannings CL, Sheerin HE.Observations on digestion in the Golden hamster. **J Anim Sci** 1968; 28: 349-352.

Hutchins AM, Martini MC, Olson BA, Thomas W, Slavin JL. Flaxseed consumption influences endogenous hormone concentrations in postmenopausal women. **Nutr Cancer** 2001; 39:58-65.

Illman R J, Trimble RP, Snosweel AM, Topping DL. Daily variations in the concentrations of volatilefatty acids in the blood vessels of rats fed diets high in pectin and bran. **Nutr Rep Int** 1982; 26: 439-46.

Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3ed. São Paulo: SN; 1985. V1.

Jenkins DG, Kendall CW, Vidgen E, Agarwal S, Rao AV, Rosenberg RS, Diamandis EP, Novorket R, Meheling CC, Perera T, Griffin LC and Cunanne SC. Health aspects of partially deffated flaxseed, including effects on serum lipids, oxidative measure and *ex vivo* androgen and progestin activity: a controlled cross-over trial. **Am J Clin Nutr** 1999; 69: 395-402.

Jones JR, Lineback DM, Levine MJ. Dietary reference intake: implications for fiber labelin and consumption: a summary of the International Life Sciences Institute North America Fiber workshop, june 1-4, 2004, Washington, DC. **Nutr Rev** 2006; 64 (1): 31-38.

Kinsella JE, Lokesh B, Stone RA, Dietary n-3 poly-unsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms.**Am J Clin Nutr** 1990; 52:1-28.

Kim M, Shin HK. The Water-Soluble Extract of Chicory Influences Serum and Liver Lipid Concentrations, Cecal Short-Chain Fatty Acid Concentrations and Fecal Lipid Excretion in Rats. **J Nutr** 1998; 128:1731-6.

Lemay A, Dodin S, Kadri N, Jacques H, Forest JC. Flaxseed dietary supplement versus hormone replacement therapy in hypercholesterolemic menopausal women. **Obstet Gynecol** 2002; 100:495-504.

Levrat M, Behr S, Mustad V, Remésy C, Demigné C. Low levels o viscous hydrocolloids lower plasma cholesterol in rats primarily by imparing cholesterol absorption. **J Nutr** 2000; 130: 243-248.

Levrat M, Favier M, Moundras C, Rémésy C, Demigné C, Mourand C. Role of dietary propiônico acid and bile acid excretion in hypocholesterolemic effects of oligosaccharides in rats**. J Nutr** 1994; 124: 531-538.

Levrat M, Rémésy C, Demigné C. High proprionic acid fermentations and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin. **J Nutr** 1991; 121: 1730-1737.

Lucas EA, Wild RD, Hammond LJ, Khalil DA, Juma S, Daggy BP, Stoecker BJ, Arjmandi BH.Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87 (4) : 1527-32.

Marmer WN, Maxweel RJ. Dry column method for the quantitative extration and simultaneous class separation of lipids from muscle tissue. **Lipids** 1981; 5: 365-371.

Mendonça S. **Efeito hipocolesteolemizante da protéina de amaranto (*Amaranthus cruentus* BRS Alegria) em hamsters** [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública ; 2006.

Meagher LP, Beecher GR. Assessement of data on the lignan content of foods. **J Food Comp Anal** 2000; 13:935-974.

Mitchell JR, Arêas JAG. Structural changes in biopolymers during extrusion. In: Kokini LK, Ho C, Karwe MV. **Food extrusion science and technology.** New York: Marcel Dekler;. 1992. p.345-60.

Morris DH. Essential nutrients and other functional compounds in flaxseed. **Nutr Today** 2001; 33 (3) p 159.

Moundras C, Demigné C, Mazur A, Rémesy C. The cholesterol lowering effect of steroid sequestrants is modulated by large intestine fermentations. **J Nutr Biochem** 1995; 6: 158-162.

Mourand C, Rémésy C, Levrat M-A, Demigné C. Replacement of digestible wheat starch by cornstarch alters splanchnic metabolism in rats. J Nutr 1992; 122: 345-354.

Nishina PM, Freeland RA. Effects of proprionate on lipids biosynthesis in isolated rat hepatocytes. **J Nutr** 1990; 120: 668-673.

National Research Council**. Lost crops of the Incas: Little-known plants of the Andes with promise for the worldwide cultivation**. Washington: National Academy Press; 1989. p.1446.

Oke OL. Amaranth. In: Chan HT, **Handbook of tropical foods.** New York:: Marcel-Dekker; 1983. p.1 apud: Teutonico RA, Knorr D. Amaranth, composition, properties, and applications of a rediscovered food crop. **Food Technol** 1985; 39(4) ,49-60.

Oomah BD. Flaxseed as a functional food source. **J Sci Food Agric**. 2001; 81: 889-894.

Pacheco MTB, Sgarbieri VC. Fibra e doenças gastrointestinais.. In Lajolo FM, Saura-Calixto F, Penna E W, Menezes E W. **Fibra dietética em iberoamérica: tecnologia e salud: obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 2001. p 385-97 2001.

Pedersen B, Kalinowski LS, Egum BO. Nutritive value of grain (*Amaranthus caudatus*.):1.Protein and minerals of raw and processed grain. **Plant Foods Hum Nutr** 1987; 36: 309-24.

Pellizzon MA, Billheimer JT, Bloedon LT. Flaxseed reduces plasma cholesterol levels in hypercholesterolemic mouse models. **J Am Coll Nutr** 2007; 26:66-75.

Plate AYA, Arêas JAG Cholesterol-lowering effects of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits. **Food Chem** 2002; 76: 1-6.

Prasad K. Flaxseed: a source of hypocholesterolemic and antiatherogenic agents. **Drug News Persp** 2000; 13 (2): 99-104.

Prasad K. Reduction of serum cholesterol and hypercholesterolemic atherosclerose in rabbits by secoisolariciresinol diglucosidase isolated from flaxseed. Circulation 1999; 99:1355-1362.

Prasad K, Mantha SV, Muir AD, Westcott ND. Reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by CDC-flaxseed with very low alpha-linolenic acid. Atherosclerosis 1998; 136:367-375.

Prasad K. Dietary flaxseed in prevention of hypercholesterolemic ahterosclerosis. **Atheroscl** 1997; 132 (1):69-76.

Qureshi AA, Lehmann JW, Peterson DM. Amaranth and its oil inhibit cholesterol biosynthesis in 6-weel-old- female ckichen. **J Nutr** 1996; 126: 1972-8.

Reddy B, Watanabe K, Sheinfil A. Effect of dietary wheat bran, alfafa, pectin and carrageenan on plasma cholesterol and fecal bile acids and neutral sterol excretion in rats. **J Nutr** 1980; 110: 1247-54.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final reort of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr** 1993; 123: 1939-51.

Ruiz-Roso B, Peres-Olleros L, García-Cuevas M. Influencia da fibra dietaria (FD) em la biodisponibilidad de los nutrientes. In Lajolo FM, Saura-Calixto F, Penna E W, Menezes E W. **Fibra dietética em iberoamérica: tecnologia e salud: obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 2001. p 345-70.

Saunders RM, Becker R. Amaranth: a potential food and feed recourse. **Adv Cereal Sci Technol** 1984; 6: 357-96.

Scheppach W, Bartram HP, Richter F. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. **Eur J Cancer** 1995; 31A: 1077-80.

Siegel S, Castellan Jr NJ. Nonparametric Statistics for behavioral sciences. McGraw-Hill International Editions. Statistics Series, 2nd edition. New York, 1988.

Southgate DAT. The dietary fiber hypothesis: a historical perspective. In:Schweizer TF, Edwards CA. Dietar fiber: a component of food. Nutritional function in health and disease. New York: Springer Verlag. ILSI Human Nutriion Reviews; 1992, p.3-20.

Swanson KS, Grieshop CM, Clapper GM, Shields RG, Belay T, Merchen NR, Fahey GC. Fruit and vegetable fiber fermentation by gut microflora from canines. **J Anim Sci** 2001; 79:919-926.

Terpstra AHM, Lapre JA, Vries HT de, Beynen AC. Dietary pectin with high viscosity lowers plasma cholesteryl ester transfer protein activity in hamsters. **J Nutr** 1998; 128 (11) 1944-1949.

Thompson T. Case problem: questions regarding the susceptibility of buckwheat, amaranth, quinoa, and aots from a patient with celiac disease. **J Am Diet Assoc** 2001; 101: 586-7.

Todesco T, Rao AV, Bosello O, Jenkins DJA. Proprionate lowers blood glucose alters lipid metabolism in health subjects. **Am J Clin Nutr** 1991; 54: 860.

Tosi EA, Re E, Lucero H, Masciarelli R. Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) grain by differential milling. **Food Chem** 2001; 101: 586-7.

Trowell H. Crude fibre, dietary fibre, and artheroschlerosis. **Atheroscler**. 16:138, 1972. apud Jones JR, Lineback DM, Levine MJ. Dietary reference intake: implications for fiber labelin and consumption: a summary of the International Life Sciences Institute North America Fiber workshop, june 1-4, 2004, Washington, DC. **Nutr Rev** 2006; 64 (1): 31-38.

Trowell HC, Southgate DAT, Wolever TMS, Leeds AR, Gassull MA, Jenkins D J. A. Dietary fiber redefined. **Lancet:** 967, 1976.

Van der meer R, Vries H, Glatz FC. T butanol extration of feces: a rapid procedure for enzymic determination of fecal bile acids. In: Beyben AC, Geeleb MJH, Katan MB, Schoyten JA. **Cholesterol metabolism in health and disease: studies in the Netherlands. Wageningen**: Ponsen & Looijen; 1985. p 113-19.

Velasques OC, Seto RW, Choi J, Zhou D, Breen F, Fisher JD, Rombeuau JL. Butyrate inhibits deoxycholate-induced increase of colonic mucosal DNA and protein synthesis in vivo. **Dis Colon Rectum** 1997; 40: 1368-1375.

Velasquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocytes. Implications for neoplasia. **Dig Dis Sci** 1996; 41:727-39.

Yokogoshi H, Mochizuki H, Nanami K, Hida Y, Miyachi F, Oda H. Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high- cholesterol diet. **J Nutr** 1999; 129: 1709-12.

Younes H, Levrat M, Demigné C, Rémésy C. Resistant starch is more effective than cholestiramine as a lipid-lowering agent in the rat. **Lipids** 1995; 30: 847-53.

Williams CSF. Pratical guide to laboratory animals. St.Louis: The C.V. Mosby; 1976. Apud. Kim M, Shin HK. The Water-Soluble Extract of Chicory Influences Serum and Liver Lipid Concentrations, Cecal Short-Chain Fatty Acid Concentrations and Fecal Lipid Excretion in Rats. **J Nutr** 1998; 128:1731-6.

Wong JMW, Souza R. Kendall CWC, Eman A, Jenkins DJA. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. **J Clin Gastroenterol** 2006;40: 235–243.

Word Health Organization. **Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases**. World health organ Technical report Series 797, WHO, Geneva, Switzerland. 1990.

Wright RS, Anderson JW, Bridges SR. Proprionate inhibits hepatocyte lipid synthesis. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med**. 195: 26-29.

Zhao G, Nyman M, Jönsson JA. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extration and direct-injection gas-chromatography. **Biomed Chromatogr**, 2006; 20: 674-82.

# ANEXOS

**ANEXO I** - Aprovação do Comitê e Ética

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS

# *APROVAÇÃO*

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.02.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **068/06**, intitulado: **"Avaliação dos efeitos fisiológicos da fração fibra alimentar do grão de amaranto (Amaranthus cruentus L.) e semente de linhaça (Linum usitatissimum L)."** apresentado pelo **CENTRO DE BIOTÉRISMO.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX, 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Sr. Robison José da Cruz**
Pesquisador(a) Executante: **Sra. Andréa Carvalheiro Guerra Matias**
Orientador: **Dr. José Alfredo Gomes Areãs**

CAPPesq, 23 de Fevereiro de 2006.

**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**
**Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC/FM/USP e da FM/USP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 Fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: capesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
/VCN

**ANEXO II** – Adaptação das gaiolas para coleta das fezes

1° Piso

2° Piso

Gaiola Completa

**ANEXO III –** Extrusora de Laboratório RXPQ-Labor24

**ANEXO IV –** Verificação da normalidade das variáveis pelo de teste de Komogorov Smirnov.

| Variável | valor de p |
|---|---|
| Ganho de peso dos animais(g) | 0,440 |
| Consumo da dieta (g) | 0,552 |
| Consumo médio diário da dieta (g) | 0,710 |
| Cociente de Eficiência Alimentar(CEA) | 0,674 |
| Peso do ceco completo (g) | 0,591 |
| Peso do ceco vazio (g) | 0,185 |
| Peso do conteúdo do ceco (g) | 0,532 |
| pH do conteúdo do ceco | 0,274 |
| Àcido acético (mmol/ceco) | 0,782 |
| Àcido propiônico (mmol/ceco) | 0,499 |
| Ácido butírico (mmol/ceco | 0,918 |
| Total de AGCC (mmol/ceco) | 0,800 |
| Consumo de FA (g/4dias) | 0,948 |
| Peso das fezes dessecadas (g/4dias) | 0,483 |
| Peso das fezes úmidas (g/4dias) | 0,356 |
| Colesterol total (mg/dl) | 0,666 |
| Triglicérides (mg/dl) | 0,999 |
| HDL-c (mg/dl) | 0,849 |
| Não HDL-c (mg/dl) | 0,992 |
| Peso do fígado (g/100g peso corporal) | 0,150 |
| Lipídeos hepáticos (mg/peso de fígado) | 0,838 |
| Colesterol hepático (mg/peso do fígado) | 0,789 |
| Colesterol nas fezes (mg/4dias) | 0,356 |
| Ácidos biliares nas fezes (umol/4dias) | 0,557 |

Quando p> 0,05 a variável segue a distribuição normal na população estudada.

**ANEXO V**- Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos dos animais do grupo Referência,

| | pH | Ceco completo (g/100g peso corporal) | Parede do ceco (g/100g peso corporal) | Ácido acético | Àcido propiônico | Ácido butírico | AGCC Total | Consumo FA | Umidade nas fezes | Peso das fezes secas |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ceco completo (g/100g peso corporal) | 0,048 | | | | | | | | | |
| | (0,902) | | | | | | | | | |
| Parede do ceco (g/100g peso corporal) | -0,053 | 0,183 | | | | | | | | |
| | (0,892) | (0,569) | | | | | | | | |
| Ácido acético (mmol/ceco) | -0,420 | 0,516 | 0,267 | | | | | | | |
| | (0,260) | (0,105) | (0,427) | | | | | | | |
| Àcido propiônico (mmol/ceco) | **-0,780** | 0,531 | 0,313 | **0,913** | | | | | | |
| | **(0,022)** | (0,141) | (0,412) | **(0,001)** | | | | | | |
| Ácido butírico (mmol/ceco) | -0,617 | 0,364 | -0,157 | 0,171 | 0,378 | | | | | |
| | (0,103) | (0,301) | (0,665) | (0,637) | (0,356) | | | | | |
| AGCC Total (mmol/ceco) | -0,214 | 0,576 | 0,293 | **0,879** | **0,926** | 0,266 | | | | |
| | (0,610) | (0,081) | (0,411) | **(0,001)** | **(0,001)** | (0,458) | | | | |
| Consumo FA (g/4dias) | 0,109 | -0,158 | 0,193 | 0,529 | 0,342 | -0,862 | 0,224 | | | |
| | (0,862) | (0,736) | (0,678) | (0,280) | (0,573) | (0,060) | (0,717) | | | |
| Umidade das fezes (%) | 0,185 | 0,061 | -0,343 | -0,275 | -0,169 | 0,049 | -0,236 | 0,040 | | |
| | (0,633) | (0,851) | (0,275) | (0,413) | (0,664) | (0,893) | (0,512) | (0,932) | | |
| Peso das fezes secas (g/4 dias) | 0,514 | 0,250 | 0,463 | 0,362 | 0,014 | -0,452 | 0,325 | **0,996** | -0,013 | |
| | (0,157) | (0,433) | (0,130) | (0,274) | (0,972) | (0,190) | (0,359) | **(0,000)** | (0,968) | |
| Peso das fezes úmidas (g/4dias) | 0,509 | 0,236 | 0,219 | 0,106 | -0,135 | -0,359 | 0,162 | 0,734 | 0,537 | **0,832** |
| | (0,162) | (0,460) | (0,494) | (0,756) | (0,728) | (0,308) | (0,654) | (0,061) | (0,072) | **(0,001)** |

Entre parênteses são apresentados os valores de p

**ANEXO VI** - Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos dos animais do grupo Controle.

| | pH | Ceco completo (g/100g peso corporal) | Parede do ceco (g/100g peso corporal) | Ácido acético | Àcido propiônico | Ácido butírico | AGCC Total | Consumo FA | Umidade nas fezes | Peso das fezes secas |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ceco completo (g/100g peso corporal) | 0,126 | | | | | | | | | |
| | (0,696) | | | | | | | | | |
| Parede do ceco (g/100g peso corporal) | 0,131 | -0,315 | | | | | | | | |
| | (0,685) | (0,319) | | | | | | | | |
| Ácido acético (mmol/ceco) | 0,122 | 0,141 | -0,155 | | | | | | | |
| | (0,705) | (0,662) | (0,631) | | | | | | | |
| Àcido propiônico (mmol/ceco) | -0,168 | 0,206 | 0,126 | -0,086 | | | | | | |
| | (0,642) | (0,568) | (0,730) | (0,814) | | | | | | |
| Ácido butírico (mmol/ceco) | -0,053 | -0,177 | 0,115 | **0,753** | 0,335 | | | | | |
| | (0,878) | (0,603) | (0,737) | **(0,007)** | (0,378) | | | | | |
| AGCC Total (mmol/ceco) | -0,133 | -0,480 | **0,726** | 0,506 | 0,300 | **0,844** | | | | |
| | (0,732) | (0,191) | **(0,027)** | (0,164) | (0,433) | **(0,004)** | | | | |
| Consumo FA (g/4dias) | -0,294 | 0,042 | -0,195 | 0,073 | 0,800 | -0,254 | -0,903 | | | |
| | (0,572) | (0,938) | (0,711) | (0,891) | (0,200) | (0,680) | (0,283) | | | |
| Umidade das fezes (%) | 0,394 | 0,406 | -0,498 | -0,421 | -0,146 | -0,783 | **-0,896** | -0,114 | | |
| | (0,205) | (0,190) | (0,100) | (0,173) | (0,687) | (0,004) | **(0,001)** | (0,830) | | |
| Peso das fezes secas (g/4 dias) | 0,071 | 0,021 | -0,213 | -0,173 | 0,269 | -0,400 | -0,580 | 0,991 | 0,452 | |
| | (0,826) | (0,949) | (0,505) | (0,590) | (0,453) | (0,223) | (0,102) | (0,000) | (0,140) | |
| Peso das fezes úmidas (g/4dias) | 0,179 | 0,192 | -0,379 | -0,310 | 0,132 | **-0,660** | **-0,826** | **0,971** | **0,758** | **0,922** |
| | (0,577) | (0,550) | (0,225) | (0,326) | (0,716) | **(0,027)** | **(0,006)** | **(0,001)** | **(0,004)** | **(0,000)** |

Entre parênteses são apresentados os valores de p

**ANEXO VII** - Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos dos animais do grupo Linhaça.

| | pH | Ceco completo (g/100g peso coporal) | Parede do ceco (g/100g peso corporal) | Ácido acético | Àcido propiônico | Ácido butírico | AGCC Total | Consumo FA | Umidade nas fezes | Peso das fezes secas |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ceco completo (g/100g peso corporal) | 0,533 | | | | | | | | | |
| | (0,091) | | | | | | | | | |
| Parede do ceco (g/100g peso corporal ) | -0,073 | 0,442 | | | | | | | | |
| | (0,832) | (0,150) | | | | | | | | |
| Ácido acético (mmol/ceco) | 0,007 | -0,198 | -0,325 | | | | | | | |
| | (0,983) | (0,538) | (0,302) | | | | | | | |
| Àcido propiônico (mmol/ceco) | -0,167 | -0,002 | -0,127 | 0,464 | | | | | | |
| | (0,645) | (0,996) | (0,709) | (0,151) | | | | | | |
| Ácido butírico (mmol/ceco) | -0,386 | -0,382 | -0,393 | **0,637** | 0,540 | | | | | |
| | (0,271) | (0,246) | (0,232) | **(0,035)** | (0,107) | | | | | |
| AGCC Total (mmol/ceco) | -0,383 | -0,304 | -0,410 | **0,928** | **0,654** | **0,974** | | | | |
| | (0,310) | (0,394) | (0,239) | **(0,000)** | **(0,040)** | **(0,000)** | | | | |
| Consumo FA (g/4dias) | -0,132 | **-0,675** | -0,483 | 0,345 | -0,280 | 0,377 | 0,285 | | | |
| | (0,734) | **(0,032)** | (0,158) | (0,328) | (0,466) | (0,318) | (0,493) | | | |
| Umidade das fezes (%) | -0,433 | -0,529 | -0,035 | 0,088 | 0,124 | -0,015 | -0,003 | 0,236 | | |
| | (0,211) | (0,095) | (0,918) | (0,798) | (0,733) | (0,968) | (0,995) | (0,542) | | |
| Peso das fezes secas (g/4 dias) | -0,038 | -0,469 | 0,142 | 0,244 | -0,210 | 0,343 | 0,244 | 0,939 | 0,210 | |
| | (0,912) | (0,124) | (0,660) | (0,445) | (0,536) | (0,302) | (0,496) | (0,000) | (0,536) | |
| Peso das fezes úmidas (g/4dias) | -0,290 | **-0,614** | -0,095 | 0,348 | 0,258 | 0,434 | 0,439 | **0,712** | **0,784** | **0,755** |
| | (0,416) | **(0,044)** | (0,781) | (0,295) | (0,471) | (0,210) | (0,238) | **(0,031)** | **(0,004)** | **(0,007)** |

Entre parênteses são apresentados os valores de p

**ANEXO VIII** - Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos dos animais do grupo Amaranto.

| | pH | Ceco completo (g/100g peso corporal) | Parede do ceco (g/100g peso corporal) | Ácido acético | Àcido propiônico | Ácido butírico | AGCC Total | Consumo FA | Umidade nas fezes | Peso das fezes secas |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ceco completo (g/100g peso corporal) | 0,151 | | | | | | | | | |
| | (0,658) | | | | | | | | | |
| Parede do ceco (g/100g peso corporal) | -0,074 | **0,660** | | | | | | | | |
| | (0,829) | **(0,020)** | | | | | | | | |
| Ácido acético (mmol/ceco) | -0,536 | 0,452 | 0,386 | | | | | | | |
| | (0,137) | (0,190) | (0,271) | | | | | | | |
| Àcido propiônico (mmol/ceco) | -0,650 | -0,091 | 0,010 | **0,813** | | | | | | |
| | (0,081) | (0,815) | (0,980) | **(0,008)** | | | | | | |
| Ácido butírico (mmol/ceco) | -0,607 | 0,490 | 0,305 | 0,423 | 0,307 | | | | | |
| | (0,110) | (0,181) | (0,425) | (0,257) | (0,460) | | | | | |
| AGCC Total (mmol/ceco) | **-0,892** | 0,017 | 0,206 | **0,777** | **0,873** | 0,682 | | | | |
| | **(0,007)** | (0,969) | (0,624) | **(0,023)** | **(0,005)** | (0,062) | | | | |
| Consumo FA (g/4dias) | 0,115 | -0,401 | -0,604 | -0,521 | -0,045 | -0,103 | -0,114 | | | |
| | (0,786) | (0,285) | (0,085) | (0,151) | (0,915) | (0,808) | (0,808) | | | |
| Umidade das fezes (%) | 0,194 | -0,107 | 0,040 | 0,084 | 0,532 | -0,114 | 0,426 | -0,012 | | |
| | (0,568) | (0,740) | (0,902) | (0,817) | (0,140) | (0,771) | (0,292) | (0,975) | | |
| Peso das fezes secas (g/4 dias) | -0,258 | -0,558 | **-0,656** | -0,362 | -0,190 | 0,151 | -0,091 | **0,828** | -0,123 | |
| | (0,444) | (0,060) | **(0,021)** | (0,304) | (0,624) | (0,699) | (0,831) | **(0,006)** | (0,703) | |
| Peso das fezes úmidas (g/4dias) | -0,191 | **-0,592** | **-0,584** | -0,247 | 0,104 | 0,041 | 0,145 | **0,721** | 0,374 | **0,868** |
| | (0,574) | **0,043** | **(0,046)** | (0,491) | (0,791) | (0,916) | (0,731) | **(0,028)** | (0,231) | **(0,000)** |

Entre parênteses são apresentados os valores de p

**ANEXO IX** - Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos e metabolismo lipídico dos animais do grupo Referência.

| | Ácido acético (mmol/ceco) | Ácido propiônico (mmol/ceco) | Ácido butírico (mmol/ceco) | Total Ácidos graxos (mmol/ceco) | Peso do fígado (g/100 g de peso do animal) | Colesterol total (mg/dl) | HDL (mg/dl) | Não HDL (mg/dl) | Colesterol fezes (mg/4 dias) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ácido propionico (mmol/ceco) | **0,913** | | | | | | | | |
| | **(0,001)** | | | | | | | | |
| Ácido butírico (mmol/ceco) | 0,171 | 0,378 | | | | | | | |
| | (0,637) | (0,356) | | | | | | | |
| Total Ácidos graxos (mmol/ceco) | **0,879** | **0,926** | 0,266 | | | | | | |
| | **(0,001)** | **(0,001)** | (0,458) | | | | | | |
| Peso do fígado (g/100 g de peso do animal) | 0,046 | -0,105 | -0,319 | 0,348 | | | | | |
| | (0,899) | (0,805) | (0,402) | (0,359) | | | | | |
| Colesterol Total (mg/dl) | -0,044 | -0,062 | 0,260 | 0,115 | -0,125 | | | | |
| | (0,897) | (0,874) | (0,469) | (0,752) | (0,715) | | | | |
| HDL (mg/dl) | 0,181 | -0,092 | 0,278 | 0,165 | 0,136 | 0,009 | | | |
| | (0,594) | (0,815) | (0,437) | (0,649) | (0,690) | (0,979) | | | |
| Não HDL (mg/dl) | -0,082 | -0,047 | 0,197 | 0,078 | -0,153 | **0,978** | -0,200 | | |
| | (0,810) | (0,905) | (0,586) | (0,831) | (0,653) | **(0,000)** | (0,533) | | |
| Colesterol fezes (mg/4dias) | -0,099 | -0,173 | -0,737 | -0,155 | 0,454 | 0,279 | **-0,731** | 0,427 | |
| | (0,833) | (0,743) | (0,059) | (0,740) | (0,306) | (0,504) | **(0,040)** | (0,292) | |
| Ácidos biliares fezes (µmol/4dias) | -0,249 | -0,621 | -0,288 | -0,297 | 0,256 | 0,180 | 0,329 | 0,115 | 0,292 |
| | (0,460) | (0,074) | (0,420) | (0,404) | (0,448) | (0,575) | (0,297) | (0,722) | (0,482) |

Entre parênteses são apresentados os valores de p

**ANEXO X** - Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos e metabolismo lipídico dos animais do grupo Controle.

| | Ácido acético (mmol/ceco) | Ácido propiônico (mmol/ceco) | Ácido butírico (mmol/ceco) | Total Ácidos graxos (mmol/ceco) | Peso do fígado (g/100 g de peso do animal) | Colesterol total (mg/dl) | HDL (mg/dl) | Não HDL (mg/dl) | Colesterol fezes (mg/4 dias) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ácido propionico (mmol/ceco) | -0,086 | | | | | | | | |
| | (0,814) | | | | | | | | |
| Ácido butírico (mmol/ceco) | **0,753** | 0,335 | | | | | | | |
| | **(0,007)** | (0,378) | | | | | | | |
| Total Ácidos graxos (mmol/ceco) | 0,506 | 0,300 | **0,844** | | | | | | |
| | (0,164) | (0,433) | **(0,004)** | | | | | | |
| Peso do fígado (g/100 g de peso do animal) | -0,309 | -0,136 | -0,581 | -0,666 | | | | | |
| | (0,418) | (0,770) | (0,131) | (0,148) | | | | | |
| Colesterol Total (mg/dl) | -0,081 | -0,374 | 0,121 | 0,310 | -0,416 | | | | |
| | (0,813) | (0,321) | (0,740) | (0,455) | (0,305) | | | | |
| HDL (mg/dl) | 0,073 | -0,242 | 0,173 | 0,104 | 0,106 | 0,508 | | | |
| | (0,842) | (0,563) | (0,657) | (0,824) | (0,802) | (0,163) | | | |
| Não HDL (mg/dl) | -0,094 | -0,496 | 0,106 | 0,378 | -0,450 | **0,992** | 0,395 | | |
| | (0,809) | (0,257) | (0,803) | (0,459) | (0,311) | **(0,000)** | (0,293) | | |
| Colesterol fezes (mg/4dias) | 0,214 | **0,880** | 0,459 | 0,276 | 0,112 | **-0,723** | -0,508 | **-0,847** | |
| | (0,611) | **(0,021)** | (0,300) | (0,653) | (0,810) | **(0,043)** | (0,244) | **(0,016)** | |
| Ácidos biliares fezes (µmol/4dias) | -0,421 | -0,081 | **-0,652** | **-0,815** | 0,558 | -0,252 | 0,081 | -0,288 | -0,188 |
| | (0,173) | (0,823) | **(0,030)** | **(0,007)** | (0,119) | (0,455) | (0,825) | (0,452) | (0,656) |

Entre parênteses são apresentados os valores de p

**ANEXO XI** - Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos e metabolismo lipídico dos animais do grupo Linhaça,

| | Ácido acético (mmol/ceco) | Ácido propiônico (mmol/ceco) | Ácido butírico (mmol/ceco) | Total Ácidos graxos (mmol/ceco) | Peso do fígado (g/100 g de animal) | Colesterol total (mg/dl) | HDL (mg/dl) | Não HDL (mg/dl) | Colesterol fezes (mg/4 dias) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ácido propionico (mmol/ceco) | 0,464 | | | | | | | | |
| | (0,151) | | | | | | | | |
| Ácido butírico (mmol/ceco) | **0,637** | 0,540 | | | | | | | |
| | **(0,035)** | (0,107) | | | | | | | |
| Total Ácidos graxos (mmol/ceco) | **0,928** | **0,654** | **0,974** | | | | | | |
| | **(0,000)** | **(0,040)** | **(0,000)** | | | | | | |
| Peso do fígado (g/100 g de peso do animal) | -0,420 | 0,013 | -0,057 | -0,231 | | | | | |
| | (0,227) | (0,973) | (0,883) | (0,582) | | | | | |
| Colesterol Total (mg/dl) | -0,382 | -0,251 | -0,274 | -0,401 | -0,075 | | | | |
| | (0,221) | (0,456) | (0,416) | (0,251) | (0,837) | | | | |
| HDL (mg/dl) | 0,031 | -0,077 | -0,077 | -0,093 | 0,331 | -0,030 | | | |
| | (0,923) | (0,822) | (0,822) | (0,798) | (0,349) | (0,927) | | | |
| Não HDL (mg/dl) | -0,415 | -0,370 | -0,299 | -0,449 | -0,087 | **0,979** | -0,136 | | |
| | (0,179) | (0,263) | (0,371) | (0,193) | (0,811) | **(0,000)** | (0,674) | | |
| Colesterol fezes (mg/4dias) | 0,315 | 0,096 | 0,126 | 0,294 | 0,231 | -0,153 | 0,093 | -0,155 | |
| | (0,375) | (0,806) | (0,746) | (0,480) | (0,551) | (0,673) | (0,798) | (0,668) | |
| Ácidos biliares fezes (µmol/4dias) | 0,276 | 0,137 | 0,366 | 0,315 | 0,096 | 0,046 | 0,270 | 0,095 | 0,214 |
| | (0,385) | (0,688) | (0,268) | (0,375) | (0,792) | (0,887) | (0,395) | (0,769) | (0,553) |

Entre parênteses são apresentados os valores de p

**ANEXO XII-** Correlação de Pearson e significância entre variáveis dos parâmetros fermentativos e metabolismo lipídico dos animais do grupo Amaranto.

| | Ácido acético (mmol/ceco) | Ácido propiônico (mmol/ceco) | Ácido butírico (mmol/ceco) | Total Ácidos graxos (mmol/ceco) | Peso do fígado (g/100 g de peso do animal) | Colesterol total (mg/dl) | HDL (mg/dl) | Não HDL (mg/dl) | Colesterol fezes (mg/4 dias) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ácido propionico (mmol/ceco) | **0,813** | | | | | | | | |
| | **(0,008)** | | | | | | | | |
| Ácido butírico (mmol/ceco) | 0,423 | 0,307 | | | | | | | |
| | (0,257) | (0,460) | | | | | | | |
| Total Ácidos graxos (mmol/ceco) | **0,777** | **0,873** | 0,682 | | | | | | |
| | **(0,023)** | **(0,005)** | (0,062) | | | | | | |
| Peso do fígado (g/100 g de peso do animal) | -0,302 | -0,015 | 0,587 | 0,500 | | | | | |
| | (0,468) | (0,974) | (0,166) | (0,312) | | | | | |
| Colesterol Total (mg/dl) | 0,267 | -0,056 | -0,307 | -0,068 | -0,205 | | | | |
| | (0,487) | (0,894) | (0,459) | (0,885) | (0,598) | | | | |
| HDL (mg/dl) | 0,627 | 0,512 | 0,004 | 0,250 | -0,461 | 0,072 | | | |
| | (0,096) | (0,240) | (0,994) | (0,633) | (0,211) | (0,843) | | | |
| Não HDL (mg/dl) | -0,138 | -0,422 | -0,315 | -0,238 | -0,005 | **0,863** | -0,442 | | |
| | (0,745) | (0,346) | (0,491) | (0,650) | (0,990) | **(0,001)** | (0,201) | | |
| Colesterol fezes (mg/4dias) | 0,298 | 0,277 | -0,442 | 0,045 | -0,793 | -0,029 | 0,019 | 0,356 | |
| | (0,566) | (0,595) | (0,456) | (0,943) | (0,060) | (0,957) | (0,976) | (0,557) | |
| Ácidos biliares fezes (µmol/4dias) | -0,362 | -0,169 | 0,044 | -0,063 | 0,092 | -0,453 | -0,143 | -0,431 | -0,404 |
| | (0,304) | (0,664) | (0,910) | (0,882) | (0,800) | (0,162) | (0,693) | (0,214) | (0,369) |

Entre parênteses são apresentados os valores de p