UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Fermentabilidade de frutanos da cebola (*Allium cepa* L.): estudo *in vivo*, *in vitro* e do efeito trófico no intestino grosso

GRAZIELI BENEDETTI PASCOAL

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR.

Orientador:

Prof^a Dr^a Elizabete Wenzel de
Menezes

São Paulo

2007

GRAZIELI BENEDETTI PASCOAL

Fermentabilidade de frutanos da cebola (*Allium cepa* L.): estudo *in vivo*, *in vitro* e do efeito trófico no intestino grosso

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora:

Profª Drª Elizabete Wenzel de Menezes

**São Paulo
2007**

18.888

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012967

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pascoal, Grazieli Benedetti
P281f Fermentabilidade de frutanos da cebola (*Allium cepa* L.): estudo
in vivo, *in vitro* e do efeito trófico no intestino grosso / Grazieli
Benedetti Pascoal. -- São Paulo, 2007.
166p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental

Orientador: Menezes, Elizabete Wenzel de

I. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos I. T. II.
Menezes, Elizabete Wenzel de, orientador.

641.1 CDD

GRAZIELI BENEDETTI PASCOAL

**Fermentabilidade de frutanos da cebola (*Allium cepa* L.):
estudo *in vivo*, *in vitro* e do efeito trófico no intestino
grosso**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a Dr^a Elizabete Wenzel de Menezes *Elizabete Wenzel de Menezes*
Orientador/Presidente

Prof^a Dr^a Eliana Parisi Alvarez
1º. examinador

Prof^a Dr^a Maria Lúcia Zaidan Dagli
2º. examinador

Prof^a Dr^a Tullia Maria Clara Caterina Filisetti
3º. examinador

Prof^a Dr^a Célia Colli
4º. examinador

São Paulo, 15 de Maio de 2007.

AGRADECIMENTOS

A minha família, Conceição (mãe), Jamil (pai) e João Paulo (irmão), pelo apoio e amor incondicionais, sem eles eu não chegaria até aqui. Minha família é meu alicerce. Amo vocês.

A Prof.^a Dr.^a Elizabete Wenzel de Menezes, orientadora, que me acolheu, confiou na minha capacidade para o doutorado-direto e me proporcionou crescimento profissional.

A Prof.^a Dr.^a Tullia M. C. C. Filisetti, minha ex-orientadora da iniciação científica. Meus primeiros passos na pesquisa foram dados com a ajuda dela, sou grata pela grande amizade, carinho e oportunidade que me deu.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto pela imensa ajuda e amizade, sem dúvida é um exemplo de profissional para todos.

A todos do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Em especial às “minhas irmãs” Eliana, Giselli, Milana, Juliana e Gabriela pela amizade, companheirismo e apoio.

Ao Alexandre R. Lobo pela grande amizade, ensinamentos e apoio.

A Patrícia Vidal Romano, revisora da tese e minha grande amiga.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Doutorado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

A todos os funcionários, professores e estudantes do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas da USP, por tornarem possível a realização do curso de doutorado.

Aos funcionários do Biotério da FCF/IQ-USP, em especial ao Wagner, pelo apoio e, principalmente, pela grande amizade.

A empresa Liotécnica Ltda pelo fornecimento da matéria-prima.

A Prof^a Dr^a Eliana Parisi Álvares e a Prof^a Dr^a Patrícia Gama do Laboratório de Biologia dos Epitélios Digestivos do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela orientação, amizade e por disponibilizar a estrutura do laboratório para a realização da pesquisa. Meus agradecimentos, também, ao Cruz Alberto Junior, técnico do laboratório.

A todos meus amigos e parentes que, de alguma maneira, me ajudaram na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

Resumo

Os frutanos são carboidratos não-disponíveis, classificados como fibra alimentar solúvel e, também, prebióticos. Chegam intactos no intestino grosso (IG) e sofrem fermentação pela microbiota, fornecendo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), gases e biomassa. Os objetivos foram avaliar a fermentação *in vivo* e *in vitro* de frutanos da cebola (*Allium cepa* L.) e seu efeito no intestino grosso de ratos. Durante 38 dias, ratos machos Wistar receberam ração controle (RC) ou suplementada com cebola (10% de frutanos) (RF). Na fermentação *in vivo* foram avaliados: peso e umidade das fezes, umidade do conteúdo cecal, AGCC, peso total e parede do ceco e pH. Paralelamente, fragmentos do ceco e cólon foram coletados para avaliação morfométrica e proliferação celular. Na fermentação *in vitro*, as frações indigeríveis das rações (RC e RF) e da cebola foram avaliadas sob diferentes parâmetros, como: pH, AGCC, fermentabilidade e resíduo não-fermentado. A fermentação *in vivo* causou no grupo frutanos 10%, em relação ao controle, os seguintes efeitos: aumento significativo do peso e umidade das fezes, da umidade do conteúdo cecal, do peso e parede do ceco e da concentração de AGCC e diminuição do pH cecal, no grupo frutanos 10% em relação ao controle. Na fermentação *in vitro*, houve alterações tanto quantitativas como qualitativas de todos os substratos fermentados. De acordo com todas as variáveis analisadas, a RF apresentou maior fermentabilidade quando comparada com a RC. O grupo frutanos 10% apresentou, no ceco, aumento significativo no tamanho das criptas, no número de criptas bifurcadas e no índice metafásico em relação ao controle. No cólon não foi evidenciada qualquer mudança microscópica entre os grupos. Os resultados indicam que a ingestão de frutanos causou mudanças significantes nos parâmetros fermentativos, tanto na fermentação *in vivo* (ratos) quanto na *in vitro* e na proliferação celular do ceco. A fermentação *in vitro* mostrou o possível perfil fermentativo dos substratos, a RF teve fermentabilidade maior que a RC. Esse perfil foi confirmado *in vivo*, onde o grupo frutanos 10% apresentou aumento na produção de AGCC em relação ao controle. O aumento do butirato provavelmente provocou efeito trófico do ceco, evidenciado pelo aumento de peso e de proliferação celular.

Palavras-chave: frutanos, prebióticos, fermentação e proliferação celular.

Abstract

Fructans are unavailable carbohydrates, classified as soluble dietary fiber and prebiotics. They arrive intact in the large intestine (LI) and are fermented by the microbiota. This fermentation mainly produces short chain fatty acids (SCFA), gases and biomass. The objectives were evaluation of the *in vitro* and *in vivo* fermentation of onion fructans (*Allium cepa* L.) and their effect in the large intestine of rats. Male Wistar rats received, for 38 days, control diet (CD) or onion supplemented diet (10% fructans) (FD). In the *in vivo* fermentation were evaluated: faeces weight and moisture, moisture of caecal content, SCFA, cecum weight and wall and pH. In parallel, fragments of cecum and colon were collected for morphometric and cellular proliferation evaluation. In the *in vitro* fermentation, non-digestible fractions of CD and FD were evaluated under different parameters, such as: pH, SCFA, fermentability and non-fermentable residues. *In vivo* fermentation caused, in the 10% fructans group in relation to the control group, the following effects: a significant increase in faeces weight and moisture, in the moisture of caecal content, in cecum weight and wall, in the concentration of SCFA and a decrease in the caecal pH. The *in vitro* fermentation showed both quantitative and qualitative changes of all fermented substrates. The FD presented greater fermentability when compared to the CD, according to all variables analyzed. The 10% fructans group presented greater depth and fission of caecal crypts and metaphasic index in relation to the control group. No microscopic changes were noticed in the colon between the groups. The results indicated that the ingestion of fructans caused significant changes on the fermentative parameters, both *in vivo* (rats) and *in vitro* fermentation, and on cell proliferation in the cecum. *In vitro* fermentation indicated a possible fermentative behavior of the substrates and the FD had greater fermentability than the CD. These results were confirmed *in vivo*, once the 10% fructans group presented an increase in the SCFA production compared to the control group. The increase in butyrate might have caused the trophic effect of the cecum, which was noticed by the increase in weight and cellular proliferation.

Key words: fructans, prebiotics, fermentation and cellular proliferation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da estrutura química dos frutanos.....	16
Figura 2: Fermentação no intestino grosso de acordo com a região.....	28
Figura 3: Regiões da cripta colônica.....	42
Figura 4: Representação do ciclo da cripta.....	43
Figura 5: Posições celulares da cripta colônica.....	59
Figura 6: Fluxograma para determinação de frutanos.....	64
Figura 7: Diagrama de dispersão da quantidade de AGCC em relação à fermentabilidade.....	84
Figura 8: Diagrama de dispersão do peso do resíduo não-fermentado (RNF) em relação à fermentabilidade.....	85
Figura 9: Diagrama de dispersão da pressão em relação à fermentabilidade.....	85
Figura 10: Diagrama de dispersão do pH 24h em relação à fermentabilidade.....	85
Figura 11: Diagrama de dispersão do Δ pH em relação à fermentabilidade.....	86
Figura 12: Ganho de peso dos animais do grupo controle (<i>ad libitum</i>), pareado e frutanos 10%, ao longo do período experimental.....	90
Figura 13: Ganho de peso dos animais do grupo controle (<i>ad libitum</i>), pareado e frutanos 10%, ao longo do período experimental.....	92
Figura 14: Peso úmido das fezes (g/animal) durante 10 dias de coleta (do 14.º ao 23.º dia de experimento) dos grupos controle e frutanos 10%.....	95
Figura 15: Peso seco das fezes (g/animal) durante 10 dias de coleta (do 14.º ao 23.º dia de experimento) dos grupos controle e frutanos 10%.....	95
Figura 16: Umidade das fezes (%) durante 10 dias de coleta (do 14.º ao 23.º dia de experimento) dos grupos controle e frutanos 10%.....	96
Figura 17: Contribuição absoluta do peso seco das fezes e umidade em fezes dos animais do grupo controle e frutanos 10%.....	97

Figura 18: Umidade do conteúdo cecal (%) dos grupos controle e frutanos 10%.....	98
Figura 19: pH do ceco dos grupos controle e frutanos 10%.....	100
Figura 20: Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) ($\mu\text{mol/g}$) do conteúdo cecal dos grupos controle e frutanos 10%.....	102
Figura 21: Proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (%) do conteúdo cecal dos grupos controle e frutanos 10%.....	103
Figura 22: Diagrama de dispersão do pH do ceco em relação à quantidade total de AGCC dos grupos controle e frutanos 10%.....	105
Figura 23: Diagrama de dispersão do pH em relação ao peso da parede do ceco dos grupos controle e frutanos 10%.....	105
Figura 24: Diagrama de dispersão dos AGCC em relação ao peso da parede do ceco, dos grupos controle e frutanos 10%.....	106
Figura 25: Peso total, peso do conteúdo e peso da parede do ceco (g/100g animal) dos grupos controle e frutanos 10%.....	109
Figura 26: Ceco de rato alimentado com ração controle e suplementada com cebola (10% de frutanos).....	110
Figura 27: Altura das criptas do ceco (células/hemi-cripta) (20x) dos grupos controle e frutanos 10%.....	111
Figura 28: Número médio de criptas bifurcadas/campo do ceco (20x) dos grupos controle e frutanos 10%.....	112
Figura 29: Índice metafásico do ceco (%) (100x) dos grupos controle e frutanos 10%.....	112
Figura 30: Índice metafásico médio (%) (n=6) em relação à posição da célula na cripta do ceco do grupo controle. (0 = base da cripta).....	114
Figura 31: Índice metafásico médio (%) (n=6) em relação à posição da célula na cripta do ceco do grupo frutanos 10%. (0 = base da cripta).....	114
Figura 32: Corte histológico da região do ceco do grupo controle. Foto demonstrativa das criptas. Coloração H&E. Ampliação de 40x.....	116
Figura 33: Corte histológico da região do ceco do grupo frutanos 10%. Foto demonstrativa das criptas. Coloração H&E. Ampliação de 20x.....	116
Figura 34: Corte histológico da região do ceco do grupo controle. A seta indica uma cripta em bifurcação. Coloração H&E. Ampliação de 40x..	117

Figura 35: Corte histológico da região do ceco do grupo frutanos 10%. A seta indica uma cripta em bifurcação. Coloração H&E. Ampliação de 40x.....	117
Figura 36: Corte histológico da região do ceco do grupo controle. Coloração PAS. Ampliação de 40x.....	118
Figura 37: Corte histológico da região do ceco do grupo frutanos 10%. Coloração PAS. Ampliação de 40x.....	118
Figura 38: Corte histológico da região do ceco do grupo controle. Coloração H&E. A seta indica célula em mitose. Ampliação de 40x.....	119
Figura 39: Corte histológico da região do ceco do grupo frutanos 10%. Coloração H&E. A seta indica célula em mitose. Ampliação de 40x.....	119
Figura 40: Altura das criptas do cólon (células/hemi-cripta) (20x) dos grupos controle e frutanos 10%.....	121
Figura 41: Número médio de criptas bifurcadas/campo do cólon (40x) dos grupos controle e frutanos 10%.....	121
Figura 42: Índice metafásico do cólon (%) (100x) dos grupos controle e frutanos 10%	122
Figura 43: Índice metafásico médio (%) (n=6) em relação à posição da célula na cripta do cólon do grupo controle (0 = base da cripta).....	122
Figura 44: Índice metafásico médio (%) (n=6) em relação à posição da célula na cripta do cólon do grupo frutanos 10% (0 = base da cripta).....	123
Figura 45: Corte histológico da região do cólon do grupo controle. Foto demonstrativa de uma cripta em bifurcação. Coloração H&E. Ampliação de 40x.....	124
Figura 46: Corte histológico da região do cólon do grupo frutanos 10%. A seta indica uma cripta em bifurcação. Coloração H&E. Ampliação de 40x.....	124
Figura 47: Corte histológico da região do cólon do grupo controle. Coloração PAS. Ampliação de 40x.....	125
Figura 48: Corte histológico da região do cólon do grupo frutanos 10%. Coloração PAS. Ampliação de 40x.....	125
Figura 49: Corte histológico da região do cólon do grupo controle. Coloração H&E. A seta indica célula em mitose. Ampliação de 40x.....	126

Figura 50: Corte histológico da região do cólon do grupo frutanos 10%.
Coloração H&E. A seta indica célula em mitose. Ampliação de 40x..... 126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Conteúdo de frutanos nos alimentos <i>in natura</i>	18
Tabela 2: Classificação de carboidratos não-disponíveis como substratos colônicos e/ou prebióticos.....	23
Tabela 3: Distribuição dos ingredientes nas rações experimentais do primeiro ensaio biológico.....	50
Tabela 4: Distribuição dos ingredientes nas rações experimentais do segundo ensaio biológico.....	51
Tabela 5: Composição química da cebola (<i>Allium cepa</i> L.) em pó (primeiro ensaio biológico).....	74
Tabela 6: Composição química da cebola (<i>Allium cepa</i> L.) em pó (segundo ensaio biológico).....	75
Tabela 7: Composição química da ração controle e suplementada com cebola (10% de frutanos) (primeiro ensaio biológico).....	76
Tabela 8: Composição química da ração controle e suplementada com cebola (10% de frutanos) (segundo ensaio biológico).....	77
Tabela 9: Cálculo estimado da concentração de carboidratos não-disponíveis da cebola e das rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos).....	79
Tabela 10: Concentrações das frações indigeríveis totais (FIT), solúvel (FIS) e insolúvel (FII) presentes na cebola e nas rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos).....	80
Tabela 11: Fermentabilidade <i>in vitro</i> da lactulose e das frações indigeríveis da cebola e das rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos).....	83
Tabela 12: Proporção molar de AGCC produzidos na fermentação <i>in vitro</i> da lactulose e das frações indigeríveis da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos).....	83
Tabela 13: Parâmetros nutricionais dos animais do grupo controle e frutanos 10% (primeiro ensaio biológico).....	91

Tabela 14: Peso dos órgãos dos animais do grupo controle e frutanos 10% (primeiro ensaio biológico).....	91
Tabela 15: Parâmetros nutricionais dos animais do grupo controle e frutanos 10% (segundo ensaio biológico).....	93
Tabela 16: Peso dos órgãos dos animais do grupo controle e frutanos 10% (segundo ensaio biológico).....	93
Tabela 17: Parâmetros intestinais dos grupos controle e frutanos 10%..	94
Tabela 18: Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos <i>in vivo</i> no ceco dos grupos controle e frutanos 10%.....	102
Tabela 19: Proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos no ceco dos grupos controle e frutanos 10%.....	103
Tabela 20: Proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos pela fermentação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	107
Tabela 21: Parâmetros intestinais no ceco dos grupos controle e frutanos 10%.....	109
Tabela 22: Parâmetros histológicos do ceco dos grupos controle e frutanos 10%.....	113
Tabela 23: Parâmetros histológicos do cólon dos grupos controle e frutanos 10%.....	120

ÍNDICE

1	Introdução	14
1.1	Alimentos funcionais	14
1.2	Os frutanos (inulina e frutooligossacarídeos)	15
1.2.1	Frutanos da cebola (<i>Allium cepa</i> L.)	19
1.3	Efeitos fisiológicos dos frutanos no trato gastrointestinal	21
1.3.1	Os frutanos como fibra alimentar e prebiótico.....	21
1.3.2	Fermentação colônica dos carboidratos não-disponíveis	25
1.3.3	Efeitos fisiológicos dos ácidos graxos de cadeia curta	32
2	Justificativa	46
3	Objetivo Geral	47
3.1	Objetivos específicos	47
4	Material e Métodos	48
4.1	Amostra.....	48
4.2	Animais	48
4.3	Rações experimentais.....	48
4.4	Protocolo experimental	51
4.5	Avaliação de parâmetros no intestino grosso	54
4.5.1	Umidade das fezes e do conteúdo cecal e pH.....	54
4.5.2	Bulking index	54
4.5.3	Fermentação <i>in vivo</i>	54
4.5.4	Histologia do ceco e cólon.....	55
4.5.4.1	Preparação dos tecidos.....	55
4.5.4.2	Morfometria	57
4.5.4.3	Proliferação celular.....	58
4.6	Análises químicas.....	59
4.6.1	Umidade.....	59
4.6.2	Fração cinza.....	60
4.6.3	Proteínas	60
4.6.4	Lipídios.....	60
4.6.5	Fibra alimentar	60
4.6.6	Frutanos, frutose, glicose, sacarose e grau de polimerização	61
4.6.7	Amido resistente.....	65

4.6.8	Fração indigerível.....	67
4.6.9	Isolamento de fração indigerível	68
4.6.10	Fermentação <i>in vitro</i>	68
4.7	Análise estatística	72
5	Resultados e discussão	73
5.1	Concentração de frutanos e composição química da cebola e rações 73	
5.2	Perfil de carboidratos não-disponíveis da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos)	78
5.3	Fermentação <i>in vitro</i> da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos).....	81
5.4	Ensaio biológico	89
5.4.1	Parâmetros nutricionais do primeiro ensaio biológico	89
5.4.2	Parâmetros nutricionais do segundo ensaio biológico	92
5.5	Parâmetros de fermentação <i>in vivo</i> de carboidratos não-disponíveis 93	
5.6	Análises macroscópicas e microscópicas do ceco e cólon	108
6	Considerações finais	133
7	Conclusões.....	135
8	Referências	136

1 Introdução

1.1 Alimentos funcionais

Atualmente, a população está mais informada e consciente a respeito dos possíveis benefícios que a alimentação pode desempenhar no controle das diversas doenças e, também, se interessando cada vez mais na relação entre a alimentação e a qualidade de vida (WRICK, 1995; DIPLOCK et al., 1999; JONES, 2002).

Evidências científicas mostram que a alimentação, além de fornecer nutrientes suficientes para satisfazer as necessidades metabólicas dos indivíduos, é capaz de modular funções específicas do organismo através de inúmeras substâncias bioativas. Portanto, a dieta não auxilia apenas no alcance de uma ótima saúde e bem-estar, mas pode, também, desempenhar um papel importante na minimização de certas patologias. Esta ampliação dos conceitos de nutrição é a nova proposta da ciência dos alimentos funcionais (DIPLOCK et al., 1999; LAJOLO, 2002; JEFFERY, 2005, ROBERFROID, 2005).

Em 1984, o Japão foi o primeiro país a criar o conceito de "alimentos funcionais" através de um projeto de pesquisa financiado pelo Ministério da Educação, Cultura, Esportes, Ciência e Tecnologia (DIPLOCK et al., 1999; ARAI et al., 2001; OHAMA, IKEDA, MORIYAMA, 2006).

Por definição, os alimentos funcionais são alimentos ou bebidas que além de desempenhar a função básica de nutrir, possuem substâncias específicas que fornecem benefícios fisiológicos ao organismo, melhorando a saúde ou auxiliando na diminuição do risco de desenvolver doenças crônicas

não-transmissíveis. Essas substâncias, denominadas de compostos bioativos, estão presentes nos alimentos *in natura* ou são ingredientes adicionados em alimentos industrializados (ROBERFROID, 1999; MILNER, 1999; DIPLOCK et al., 1999; MILNER, 2000; ARAI et al., 2001; JONES, 2002; ROBERFROID, 2002; HASLER et al., 2004; ROBERFROID, 2005; OHAMA, IKEDA, MORIYAMA, 2006).

Em síntese, uma das principais razões para a pesquisa dos compostos bioativos são as evidências apresentadas pelos estudos epidemiológicos, que mostram a redução de patologias, como as cardiovasculares e neoplásicas, ocasionada pelo aumento do consumo de alimentos ricos em compostos bioativos, como as frutas e hortaliças (MILNER, 1999; LAJOLO, 2002; JEFFERY, 2005).

1.2 Os frutanos (inulina e frutooligossacarídeos)

Nos últimos 20 anos, a ciência dos alimentos evoluiu de maneira significativa e, nesse contexto, as pesquisas relacionadas com os carboidratos (carboidratos disponíveis, fibras alimentares, amido resistente, frutanos) e sua relação com a saúde humana também têm conseguido grande destaque (CUMMINGS; ENGLYST, 1995).

Foi identificado um grupo de carboidratos, com características bem peculiares, denominado frutanos. Os frutanos (inulina e os frutooligossacarídeos) são carboidratos constituídos principalmente por monômeros de β -D-frutofuranosil (frutose), unidos entre si por ligações $\beta(2\rightarrow1)$ ou $\beta(2\rightarrow6)$, formando moléculas lineares (inulina) ou ramificadas (levano), respectivamente (HOEBREGS, 1997; CARABIN; FLAMM, 1999;

ANDERSEN; SORENSEN, 1999; ROBERFROID, 1999; FLAMM et al., 2001; KAUR; GUPTA, 2002; GIBSON; MCCARTNEY; RASTALL, 2005; ROBERFROID, 2005; PAK, 2006; LOBO; COLLI; FILISETTI, 2006).

Dependendo da espécie vegetal, os frutanos possuem grau de polimerização (GP) que varia de 2 até 70 (**Figura 1**). Podem ser finalizados ou não com uma molécula de glicose, a qual está unida à frutose através da ligação $\alpha(1\rightarrow2)$, como ocorre na sacarose. Depois do amido, os frutanos são os polissacarídeos não-estruturais mais abundantes encontrados na natureza (HOEBREGS, 1997; CARABIN; FLAMM, 1999; ANDERSEN; SORENSEN, 1999; ROBERFROID, 1999; FLAMM et al., 2001; KAUR; GUPTA, 2002; ROBERFROID, 2005; PAK, 2006).

Figura 1: Representação da estrutura química dos frutanos (DELAQUIS; MAZZA, 1998).

Geralmente, os frutanos com GP entre 10 e 70 unidades monossacarídicas são chamados de inulina, ao passo que os

frutooligossacarídeos (FOS), ou oligofrutoses, são definidos como substâncias com GP entre 2 até 10 (ANDERSEN; SORENSEN, 1999; CARABIN; FLAMM, 1999; COUSSEMENT, 1999; GIBSON; McCARTNEY; RASTALL, 2005; ROBERFROID, 2005; WATZL; GIRRBACH; ROLLER, 2005; PAK, 2006).

É importante ressaltar que os FOS e as oligofrutoses são sinônimos (PROSKY, 1999; ROBERFROID, 2005), a diferença entre eles é que os FOS são sintetizados a partir da sacarose, *in natura* ou produzida sinteticamente, ao passo que as oligofrutoses são formadas pela hidrólise da inulina (ROBERFROID; DELZENNE, 1998; ROBERFROID, 2005; PAK, 2006).

A inulina e os FOS são carboidratos de reserva naturalmente presentes em mais de 36.000 espécies vegetais. São freqüentemente encontrados em uma ampla variedade de alimentos constituintes da dieta brasileira. Podem estar presentes em cereais (trigo, centeio, cevada e aveia), raízes tuberosas (yacon e chicória), bulbos (alho, alho-porró e cebola), frutas (banana, maçã, pêra e ameixa), hortaliças (tomate, almeirão, aspargos, alcachofra e cebolinha) e leguminosas (soja) (GIBSON, 1994; VAN LOO et al., 1995; DE CARVALHO; ZOIDAN; DIETRICH, 1997; NINESS, 1999; CAPITO, 2001; L'HOMME et al., 2001; GIBSON; McCARTNEY; RASTALL, 2005; ROBERFROID, 2005; PAK, 2006; LOBO; COLLI; FILISETTI, 2006; SCHOLTENS et al., 2006) ou em alguns produtos como iogurtes, sorvetes, alimentos infantis e dietas enterais industrializadas (GIBSON; McCARTNEY; RASTALL, 2005; SCHOLTENS et al., 2006).

O consumo médio diário de frutanos nos Estados Unidos varia de 1g a 4g/dia, enquanto na Europa varia de 3g a 11g (VAN LOO et al., 1995; MOSHFEGH et al., 1999; ROBERFROID, 2005; SCHOLTENS et al., 2006).

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) fez um estudo entre 1994 e 1996 sobre o consumo de inulina pela dieta dos norte-americanos. A pesquisa revelou que a maior fonte alimentar de frutanos veio do trigo (69%), seguido pela cebola (23%), banana e alho (3%) e outros alimentos (2%) (MOSHFEGH et al., 1999).

Apesar de os frutanos estarem amplamente presentes na dieta e serem benéficos à saúde humana, a sua determinação em alimentos é escassa, possivelmente devido à complexidade da metodologia, que exige equipamento e enzimas muito caros e longo tempo de análise. A **Tabela 1** mostra o conteúdo de frutanos em alguns alimentos (GIBSON et al., 1994; CAPITO, 2001).

Tabela 1: Conteúdo de frutanos em alimentos *in natura*

Alimentos <i>in natura</i>	Frutanos (%)
Cebola (<i>Allium cepa</i> L.)	4-12
Chicória (<i>Chicorium intybus</i>)	20-30
Aspargos (<i>Asparagus officinalis</i>)	2-50
Alho-porró (<i>Allium ampeloprasum</i> L. var <i>porrum</i>)	5-15
Alho (<i>Allium sativum</i> L.)	12-22
Banana (<i>Musa spp</i>)	0,6-1,4
Trigo (<i>Triticum spp</i>)	2-8
Centeio (<i>Secale cereale</i> L.)	1-2
Cevada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	1-3
Yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	0,9-4

Há na literatura poucas informações sobre o GP dos alimentos ricos em frutanos. O gênero mais estudado é o *Allium spp*, que abrange grande variedade de vegetais presentes freqüentemente na dieta da população brasileira: cebola (*Allium cepa* L.), alho (*Allium sativum* L.), alho-porró (*Allium ampeloprasum* L.) e cebolinha (*Allium schoenoprasum*). Esses alimentos, apesar de pertencerem ao mesmo gênero, possuem concentrações e perfis diferenciados de frutanos (ERNST et al., 1998).

1.2.1 Frutanos da cebola (*Allium cepa* L.)

A cebola (*Allium cepa* L.) pertence à família *Liliaceae* e sua estrutura de reserva e parte comestível é chamada de bulbo. É um vegetal originário da Ásia que se adapta facilmente a grandes variações de temperatura e possui variedades de cultivares, colorações, formas, quantidade de matéria seca (sólidos totais), *flavours* e texturas (ERNST et al., 1998; GRIFFITHS et al., 2002).

A composição química da cebola é extremamente variável, estando relacionada com a época de plantio, tipo de solo, estado fisiológico da planta, condições sazonais ou meteorológicas, ponto de colheita, manejo de cultura e metodologia utilizada para análise dos seus nutrientes (FUKAI et al., 1997; SALUNKHE; KADAM, 1998; USP, 1998).

Em geral, seus bulbos destacam-se pela elevada concentração de umidade (88,53%). Na base seca contém, em média, 11,90% de proteínas, 1,57% de lipídios, 67,92% de carboidratos, 4,01% de cinzas e 14,60% de fibras alimentares (YOKOMIZO et al., 1977; FILISETTI-COZZI; LAJOLO,

1991; SOUCI et al., 1994; SALUNKHE; KADAM, 1998; USP, 1998; USDA, 2001; PASCOAL; FILISETTI, 2002).

A concentração de frutanos da cebola varia de 25,94% a 41,50% na base seca, possuindo valor médio de 35,31% (VAN LOO et al., 1995; TANWAR; SOOD, 1996; ANDERSEN; SORENSEN, 1999; JAIME et al., 2000; JAIME et al., 2001; PASCOAL et al., 2004) e grande quantidade de FOS, cujo GP médio é 5, com predominância de cestoses (GF₂) (VAN LOO et al., 1995; CAMPBELL et al., 1997; ERNST et al., 1998).

A cebola apresenta diversos compostos bioativos, como os flavonóides, principalmente da subclasse dos flavonóis, e antocianinas. A substância mais abundante é a quercetina, um antioxidante amplamente encontrado em frutas e hortaliças. A quantidade média de flavonóides na base integral varia de 30mg a 100mg por 100g (MIEAN; MOHAMED, 2001; GENOVESE; LAJOLO; ARABBI, 2004).

Há também outras substâncias, com atividades biológicas, presentes nesse bulbo, como por exemplo: allicina (antimicrobiana); alliina (hipolipidêmica, antimicrobiana, hipoglicêmica); ajoene (antitrombótica); sulfeto de dialila (quimiopreventiva); tiosulfinatos (antiinflamatórios); ácido ascórbico (antioxidante); ácido caféico (antitumoral, antimutagênico, antioxidante, antiviral), S-metilmetanotiosulfonato (antimutagênico), entre outros compostos bioativos (DELAQUIS; MAZZA, 1998).

1.3 Efeitos fisiológicos dos frutanos no trato gastrointestinal

1.3.1 Os frutanos como fibra alimentar e prebiótico

Outro atributo nutricional importante dos frutanos é sua ação como fibra alimentar (FA) (PROSKY, 1999; PAK, 2003; CAERS, 2005).

O conceito de FA não foi ainda estabelecido de maneira satisfatória (DE FRANCISCO, 2005; FILISETTI, 2006; SAURA-CALIXTO, 2006; MENEZES, 2007). Dentre as diversas definições, pode ser mencionada a proposta pela Associação Americana de Químicos de Cereais (*American Association of Cereal Chemists – AACC*): *"A fibra alimentar é a parte comestível das plantas ou carboidratos análogos que são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado de humanos com fermentação completa ou parcial no intestino grosso. A fibra alimentar promove efeitos fisiológicos benéficos, incluindo laxação e/ou atenuação do colesterol sangüíneo e/ou atenuação da glicose sangüínea"* (AACC, 2001).

Os frutanos são considerados fibras alimentares solúveis em virtude da resistência à digestão no intestino delgado, devido à incapacidade de hidrólise das ligações químicas $\beta(2\rightarrow1)$ da inulina ou $\beta(2\rightarrow6)$ do levano pelas enzimas do trato gastrointestinal. Conseqüentemente, em vez de serem absorvidos são completamente fermentados no intestino grosso, provocando fezes mais volumosas (ROBERFROID, 1993; ROBERFROID; DELZENNE, 1998; NINESS, 1999; ROBERFROID, 1999; ROBERFROID, 2002; FAO/WHO, 2003; ROBERFROID, 2005).

Com isso, pode-se estimar o *bulking index* de uma fibra alimentar que, por definição, é o aumento no peso fecal úmido (g) por grama de carboidrato não-disponível ingerido (NYMAN, 2002).

Apenas parte da energia dos frutanos é metabolicamente utilizada e, por essa razão, podem ser classificados como substâncias de baixo conteúdo energético, pois fornecem de 40% a 50% da energia dos carboidratos disponíveis (4kcal/g ou 16,8kJ/g). O valor energético dos frutanos varia de 1kcal/g a 2kcal/g (4,2kJ/g a 8,4kJ/g) ou pode-se considerar, também, o valor médio de 1,5kcal/g (6,3kJ/g) (ROBERFROID, 1993; ROBERFROID; DELZENNE, 1998; NINESS, 1999; ROBERFROID, 1999; ROBERFROID, 2002; FAO/WHO, 2003).

Os frutanos são também classificados como prebióticos, os quais são carboidratos não-disponíveis que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias do cólon, melhorando a saúde do hospedeiro (ROBERFROID et al., 1998; GIBSON; ROBERFROID, 1995; GIBSON, 2004; ROBERFROID, 2005; ROBERFROID, 2007).

Entretanto, nem todos os carboidratos não-disponíveis e fermentáveis são prebióticos (**Tabela 2**). Alguns critérios devem ser considerados, tais como (GIBSON; ROBERFROID, 1995; GIBSON, 2004; ROBERFROID, 2005; ROBERFROID, 2007):

- Devem resistir à acidez gástrica;
- Não devem sofrer hidrólise pelas enzimas do intestino delgado ou ser absorvidos;

- Devem ser substratos seletivos para um ou um número limitado de bactérias “benéficas” ao cólon, nas quais o crescimento e/ou atividade metabólica estão estimulados;
- Devem ser capazes de, conseqüentemente, alterar a composição da microbiota, aumentando o número de lactobacilos e bifidobactérias;
- Devem induzir efeitos locais ou sistêmicos benéficos à saúde do hospedeiro.

Tabela 2: Classificação de carboidratos não-disponíveis como substratos colônicos e/ou prebióticos

Carboidrato não-disponível	Substrato colônico fermentativo	Prebiótico
Amido resistente	Sim	???
Hemiceluloses	Sim	Não
Pectinas	Sim	Não
Gomas	Sim	Não
Polidextrose	Sim	???
Lactulose	Sim	Sim
Frutanos (inulina e FOS)	Sim	Sim

Gibson et al., 2004; Roberfroid, 2007.

Outros carboidratos não-disponíveis estão sendo estudados para verificar o seu possível efeito prebiótico. Entre eles a polidextrose e o amido resistente. Gibson et al. (2004) e Roberfroid (2007) publicaram uma revisão oferecendo informações atualizadas sobre o conceito de prebióticos e as principais substâncias que são ou que podem vir a ser classificadas como tal.

Os estudos preliminares com esses compostos indicam capacidade de aumentar de maneira significativa as bifidobactérias e os lactobacilos, mas são necessários mais ensaios clínicos e experimentais que comprovem seus efeitos benéficos no intestino grosso (JIE et al., 2000; WANG et al., 2002;

GIBSON et al., 2004; PROBERT et al., 2004; LEAL, 2005; ROBERFROID, 2007).

A ingestão média recomendada de frutanos, para alcançar o efeito prebiótico, é de 4g a 5g por dia (ROBERFROID, 1999; BOUHNİK, 2007), mas o resultado depende da composição inicial da microbiota, do tipo de alimentação e, principalmente, do número inicial de bifidobactérias (ROBERFROID, 1999; ROBERFROID, 2005; ROBERFROID, 2007).

Os frutanos podem desempenhar alguns efeitos deletérios no intestino grosso: dor ou desconforto abdominal, flatulência e diarreia. Esses efeitos acontecem dependendo da dose diária ingerida, da resposta do indivíduo à fermentação, do tipo de microbiota e do GP da molécula (GUDIEL-URBANO; GOÑI, 2002; CUMMINGS; MACFARLANE, 2002; WHELAN et al., 2005; SCHOLTENS et al., 2006, ROBERFROID, 2007).

Pedersen et al. (1997) realizaram um estudo randomizado duplo-cego com mulheres, com duração de um mês. Ofereceram 14g de inulina por dia e os sintomas gastrintestinais foram flatulências, ruídos, dores gástricas e intestinais.

Outros estudos indicaram que a ingestão de 20g de frutanos por dia foi bem assimilada, enfatizaram que os sintomas gastrintestinais foram doses dependentes e variaram de acordo com a tolerância individual (FLAMM et al., 2001). Pode ocorrer diarreia se a ingestão diária de frutanos for acima de 30g (CUMMINGS; MACFARLANE, 2002). Por isso, a dose aconselhável de ingestão de frutanos é de 15g por dia (GIBSON et al., 1995).

1.3.2 Fermentação colônica dos carboidratos não-disponíveis

Todos os compostos que chegam ao cólon são substratos potenciais para a fermentação, processo metabólico anaeróbico altamente complexo, que transforma alguns nutrientes presentes no cólon em subprodutos com características bioquímicas e mecanismos de ação específicos (CUMMINGS; ENGLYST, 1987; CUMMINGS; MACFARLANE, 1991; GIBSON, 1999; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; LAJOLO et al., 2001; GUARNER; MALAGELADA, 2003; GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006; WONG et al., 2006).

Os principais fatores que modulam a fermentação são: a quantidade, a estrutura físico-química e o grau de fermentabilidade dos substratos; o número de bactérias presentes no cólon e o tempo de contato entre a microbiota e os compostos fermentativos (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; MACFARLANE; MACFARLANE, 2003).

A maior parte dos substratos para fermentação é proveniente da dieta, tais como: fibras alimentares, amido resistente, proteínas, lipídios, polifenóis, FOS, inulina, entre outros. Entretanto, substâncias endógenas produzidas pelo próprio organismo (mucinas, células epiteliais mortas e enzimas) também podem sofrer fermentação pela microbiota (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; LAJOLO et al., 2001; GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006).

Os principais substratos para o crescimento bacteriano são os carboidratos alimentares que não foram digeridos e absorvidos no intestino delgado. Aproximadamente, de 20g a 80g de carboidratos não-disponíveis alcançam o cólon por dia. Destes, de 8g a 40g são amidos resistentes, 8g a 18g polissacarídeos não-amido (fibras alimentares), 2g a 10g açúcares não-

absorvidos e 2g a 8g outros oligossacarídeos (FOS e inulina) (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991; HENNINGSSON et al., 2002; WONG, 2006).

Para se estudar experimentalmente a fermentação de carboidratos não-disponíveis, há dois tipos de modelo: *in vivo* e *in vitro*.

No modelo *in vivo*, utilizam-se animais (porcos, ratos, etc) ou humanos.

O estudo da fermentação *in vivo* em humanos é difícil e restrito, pois os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) podem ser mensurados apenas nas fezes, não oferecendo indícios confiáveis do processo fermentativo, mas é um método pouco invasivo e muito aplicado. A desvantagem é a subestimação da quantidade de butirato, devido a sua alta absorção nas porções proximais do intestino grosso (TOPPING; CLIFTON, 2001; CAMPBELL et al., 1997; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; WONG et al., 2006).

O estudo da fermentação *in vivo* em animais é bastante empregado e permite avaliar os parâmetros fermentativos (pH, AGCC, composição da microbiota) em qualquer região do intestino grosso. Muitos trabalhos usam ratos (*Rattus norvegicus*) devido à limitação de espaço, seu pequeno porte, baixo custo e ampla disponibilidade (TOPPING; CLIFTON, 2001; MARTIN; DUMON; CHAMP, 1998).

É válido ressaltar que os estudos com animais ou humanos são extremamente importantes e cada método tem sua peculiaridade e limitação analítica. Deve ser levado em consideração que a fermentação dos carboidratos não-disponíveis nos ratos acontece no ceco, ao passo que nos

humanos é, principalmente, no cólon ascendente e transversal (CAMPBELL et al., 1997; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

A fermentação *in vitro* é outro modelo que tem sido amplamente utilizado para estudar o comportamento dos carboidratos não-disponíveis e os possíveis efeitos fisiológicos que os seus produtos desempenham. Reproduz, na medida do possível, o processo nas condições *in vivo* e permite o conhecimento prévio do perfil dos AGCC produzidos por um determinado substrato (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

Basicamente, para que ocorra o modelo *in vitro* deve-se incubar, em condições de anaerobiose, o substrato juntamente com o inóculo e meio de fermentação (MF), os quais fornecem microrganismos e nutrientes, respectivamente. No final, são determinados os produtos originados (AGCC, gases, etc) e a quantidade de substrato que não foi fermentado (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

Existem várias metodologias *in vitro* propostas e as principais diferenças entre elas estão relacionadas com as seguintes características (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001): tipo de inóculo (fezes ou conteúdo cecal); procedência do inóculo (humanos, porcos, ratos, etc); concentração do substrato; concentração do inóculo e duração da fermentação.

Apesar das limitações do modelo *in vitro*, com a finalidade de extrapolar seus resultados às condições *in vivo*, esse método é muito útil para mostrar previamente os produtos da fermentação dos carboidratos não-disponíveis (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001). A fermentação dos substratos ocorre no intestino grosso, o qual é dividido nos seguintes

segmentos: ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, sigmóide e reto (GUYTON, 1998).

Há diferenças metabólicas entre o lado direito (ceco, cólon ascendente e cólon transverso) e o lado esquerdo (cólon descendente e sigmóide) do intestino grosso (**Figura 2**). As peculiaridades de cada região do órgão estão no (a): tipo de substrato biodisponível; concentração dos metabólitos gerados na fermentação; umidade; pH e crescimento bacteriano (CUMMINGS, 1997; WONG et al., 2006).

O lado direito deste órgão corresponde à porção mais proximal, que recebe diretamente os nutrientes não-absorvidos pelo intestino delgado, juntamente com grande quantidade de água e eletrólitos, resultando em intensa atividade fermentativa (CUMMINGS, 1997). A região distal do intestino grosso (cólon descendente e sigmóide) é deficiente de carboidratos e, portanto, as proteínas são utilizadas como substrato fermentativo dominante. Estima-se que a quantidade de proteína disponível varia em torno de 1g a 12g, originando produtos diferentes do metabolismo sacarolítico (CUMMINGS, 1997).

Figura 2: Fermentação no intestino grosso de acordo com a região (Adaptado de CUMMINGS, 1997).

Todos os substratos fermentativos já descritos serão hidrolisados pela microbiota do intestino grosso. O trato gastrointestinal humano contém um número elevado de cepas de bactérias, que constituem um complexo ecossistema metabolicamente ativo e com grande capacidade de adaptação aos compostos disponíveis (BOULEY et al., 1998, CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; BOUHNİK et al., 2004; MAI; MORRIS, 2004; WHELAN et al., 2005; WONG et al., 2006).

Além dos resíduos alimentares, o maior componente do conteúdo do intestino grosso é a biomassa (microbiota), que alcança concentrações no cólon ascendente de 10^{11} a 10^{12} unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de conteúdo luminal. Já nas fezes, aproximadamente 60% da sua parte sólida é formada por bactérias viáveis e não-viáveis (CUMMINGS, 1997; GUARNER; MALAGELADA, 2003; WONG et al., 2006).

A microbiota colônica humana compreende cerca de 500 espécies distintas de bactérias, mas apenas 10% delas pertencem a 5 ou 6 gêneros distintos e representam 99% da biomassa (CUMMINGS, 1997; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; BOULEY et al., 1998; GUARNER; MALAGELADA, 2003; WONG et al., 2006).

Os microrganismos dominantes são anaeróbicos estritos que realizam reações redutoras e hidrolíticas. Pertencem a esse grupo os (as): bacterioides, bifidobactérias, eubactérias, clostrídios, peptococos, peptostreptococos e ruminococos. Os gêneros subdominantes são bactérias anaeróbicas facultativas, tais como: escherichia, enterobacter, enterococos, klebsiella, lactobacilos e estreptococos (CUMMINGS, 1997; BOULEY et al.,

1998; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; GUARNER; MALAGELADA, 2003).

A microbiota permanece relativamente estável em adultos, apresentando diferenças qualitativas e quantitativas em sua composição individual. Entretanto, pode sofrer flutuações sob algumas circunstâncias como, por exemplo: características endógenas dependentes do hospedeiro (conteúdo enzimático, peristaltismo, potencial redox, capacidade de resposta imune); tratamento com antibióticos; condições patológicas da mucosa do intestino grosso (retocolite ulcerativa idiopática, doença de Crohn, diarreia aguda), além de fatores alimentares (prebióticos) (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; GUARNER; MALAGELADA, 2003; ROBERFROID, 2005).

Em geral, a microbiota intestinal pode ser dividida em espécies que possuem propriedades deletérias ou benéficas ao hospedeiro. Alguns gêneros bacterianos são considerados patogênicos ao organismo, devido à produção de toxinas e carcinógenos, entretanto outros são não-patogênicos e oferecem benefícios à saúde (BOULEY et al., 1998; NINESS, 1999; GIBSON; McCARTNEY; RASTALL, 2005, BOUHNİK et al., 2004; ROBERFROID, 2005).

Entre as bactérias benéficas estão as bifidobactérias (*Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* e *B. infantis*) e os lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbruekii*). Ambos os gêneros são sacarolíticos e anaeróbicos estritos (GIBSON; ROBERFROID, 1995; BOULEY et al., 1998; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; BOUHNİK et al., 2004;

GIBSON; McCARTNEY; RASTALL, 2005; ROBERFROID, 2005; WONG et al., 2006).

Entretanto, são as bifidobactérias que constituem a grande maioria da população bacteriana, correspondendo a 25%. Os frutanos são substratos seletivamente fermentados por elas e, em menor extensão, pelos lactobacilos. Como consequência, o crescimento e/ou atividade dessas cepas específicas são estimulados e isso beneficia o hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995; HUGHES; ROWLAND, 2001; CUMMINGS; MACFARLANE, 2002; PAK, 2003; GIBSON; McCARTNEY; RASTALL, 2005; ROBERFROID, 2005; SCHOLTENS et al., 2006).

A fermentação colônica não deve ser considerada como rota metabólica única e sim como processo que gera inúmeros compostos pela ação simultânea de várias cepas de bactérias. É freqüente a existência de inter-relações sinérgicas e competitivas entre os diferentes microrganismos, pois os produtos da fermentação podem provocar a inibição ou estimulação do crescimento de outras bactérias que coexistem no cólon (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; MACFARLANE; MACFARLANE, 2003).

O tipo e a quantidade dos compostos finais da fermentação colônica dependem das características físico-químicas (composição monomérica, ligações glicosídicas, peso molecular e solubilidade) e concentração dos substratos biodisponíveis e particularidades bioquímicas da microbiota (LAMBO-FODJE; OSTE; NYMAN, 2006).

1.3.3 Efeitos fisiológicos dos ácidos graxos de cadeia curta

Em geral, a degradação microbiana dos carboidratos não-disponíveis no cólon fornece: AGCC (ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico), gases (H_2 , CO_2 , e CH_4) e biomassa (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997; GIBSON, 1999; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; MACFARLANE; MACFARLANE, 2003; WONG et al., 2006; SCHOLTENS et al., 2006; LAMBOFODJE; OSTE; NYMAN, 2006). Os gases formados são utilizados pela microbiota ou absorvidos pelo intestino grosso e expelidos pela respiração ou excretados pelas fezes (CHERBUT, 2002).

A concentração colônica dos AGCC no cólon proximal varia de 70mM a 140mM e de 20mM a 70mM no cólon distal (WATZL; GIRRBACH; ROLLER, 2005; WONG et al., 2006). A estequiometria da fermentação mostra que 10g de carboidratos não-disponíveis e fermentáveis fornecem, aproximadamente, 100mmol de AGCC, 3g de biomassa e 50mL a 100mL de hidrogênio (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997; GIBSON, 1999; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

Outros produtos também são gerados, tais como o lactato, piruvato, etanol e succinato. Essas substâncias podem manter o balanço das reações de óxido-redução durante o processo fermentativo (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997; GIBSON, 1999; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; MACFARLANE; MACFARLANE, 2003; WONG et al., 2006).

Os frutanos são fermentados em diferentes regiões do intestino grosso, dependendo do grau de polimerização da molécula. Em geral, os FOS de baixo peso molecular são metabolizados no ceco e cólon

ascendente, ao passo que a inulina, de alto peso molecular, no cólon ascendente, transversal e descendente (COXAM, 2005).

As proteínas também sofrem fermentação bacteriana, processo denominado putrefação. Os produtos da proteólise fornecem: AGCC em pequenas quantidades; ácidos graxos de cadeia ramificada (isobutirato, isovalerato e 2-metilbutirato); amônia (NH_3); metano (CH_4); fenóis e diversos compostos nitrogenados e sulfurados (CUMMINGS, 1997; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; MACFARLANE; MACFARLANE, 2003; GUARNER; MALAGELADA, 2003; WONG et al., 2006).

Os metabólitos fermentativos resultantes podem ter efeitos luminiais, locais (mucosa) e sistêmicos (fígado e tecidos periféricos). Os AGCC são ácidos carboxílicos saturados contendo de 1 a 6 átomos de carbono e constituídos, principalmente, pelo ácido acético (acetato), ácido propiônico (propionato) e ácido butírico (butirato), totalizando de 90% a 95% dos ácidos orgânicos sintetizados no intestino. O restante dos produtos corresponde aos ácidos graxos de cadeia ramificada (COOK; SELLIN, 1998; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; OLIVEIRA; GAZZOLA, 2002; WONG et al., 2006).

O maior local de fermentação e produção de AGCC é na parte mais proximal do intestino grosso (ceco e cólon ascendente), portanto o pH nessa porção do órgão é mais baixo e torna-se alcalino distalmente (WONG et al., 2006).

Devido aos AGCC, ocorre redução do pH colônico, o que favorece o decréscimo da concentração de amônia (NH_3) e elevação do íon amônio (NH_4^+) excretado pelas fezes (YOUNES et al., 1997; ROBERFROID;

DELZENNE, 1998). Ainda ocorre insolubilização dos ácidos biliares e inibição da 7- α -desidroxilase, enzima bacteriana responsável pela conversão desses ácidos primários em secundários, os quais são compostos potencialmente tóxicos e cancerígenos para o intestino grosso (LUPTON, 2000; WONG et al., 2006).

Em indivíduos saudáveis, estima-se produção de 100mM a 720mM de AGCC por dia e a proporção molar desses compostos varia de acordo com o substrato fermentativo. Em geral, é 60:25:15 para ácido acético, propiônico e butírico, respectivamente (COOK; SELLIN, 1998; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; OLIVEIRA; GAZZOLA, 2002; WONG et al., 2006) e é similar tanto no cólon proximal quanto distal (MACFARLANE; MACFARLANE, 2003; WONG et al., 2006).

Os AGCC são ácidos fracos com valores de pKa em torno de 4,7-4,8. Portanto, no pH fisiológico do cólon (pH 6-8), cerca de 95% a 99,99% desses ácidos encontram-se na forma dissociada ou iônica (BUSCHE et al., 2002; OLIVEIRA; GAZZOLA, 2002).

A absorção dos AGCC é um processo eficiente, que pode ocorrer por dois mecanismos: difusão não-iônica ou troca iônica (BUSCHE et al., 2002; OLIVEIRA; GAZZOLA, 2002; WONG et al., 2006). Estima-se que 90% a 95% dos ácidos são absorvidos no cólon e o resto é excretado pelas fezes (ROBERFROID; GIBSON; DELZENNE, 1993; WONG et al., 2006).

Na absorção não-iônica, os AGCC estão na forma protonada, que é lipossolúvel e capaz de atravessar a membrana plasmática por difusão simples. Os ácidos absorvidos são dissociados no citoplasma dos colonócitos, o H⁺ é co-transportado pela bomba Na-H *ATPase*, localizada na

membrana basolateral, evitando a diminuição do pH intracelular. Com isso, esse processo é acompanhado pelo aumento da absorção de sódio (COOK; SELLIN, 1998; OLIVEIRA; GAZZOLA, 2002; WONG et al., 2006).

Já na absorção por troca iônica, a forma dissociada dos AGCC é conduzida para as células pelo transporte ativo secundário (contra-transporte AGCC-HCO₃), onde na membrana apical dos colonócitos ocorre entrada de AGCC ionizáveis em troca de íons HCO₃ (COOK; SELLIN, 1998; OLIVEIRA; GAZZOLA, 2002; WONG et al., 2006).

O ácido acético (acetato), principal ácido graxo presente no cólon, é um AGCC com 2 carbonos (FUKUSHIMA, 1995), absorvido rapidamente e transportado para a veia porta. Pode chegar a valores de 50mM no jejum e 100mM a 300mM no pós-prandial, portanto, é pouco utilizado pelos colonócitos. Uma parte é conduzida para o fígado e outra é empregada como combustível energético pelos tecidos periféricos (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997; WATZL, GIRRBACH, ROLLER, 2005; WONG et al., 2006).

O acetato no hepatócito é um substrato lipogênico, ou seja, fornece carbono para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL). Os AGCL são estereificados a triacilgliceróis e, então, incorporados nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). O restante do *pool* de acetato não-metabolizado pelo fígado chega ao plasma, onde sua meia-vida é de apenas poucos minutos, pois é altamente utilizado como combustível energético principalmente pelos músculos esqueléticos e cardíacos e cérebro (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997; WONG et al., 2006).

O ácido propiônico (propionato) é um AGCC com 3 carbonos (FUKUSHIMA, 1995). É rapidamente absorvido, de modo que a maior parte entra na circulação portal e quantidades muito pequenas são metabolizadas nos colonócitos (CUMMINGS, 1997).

Diversos trabalhos com animais e humanos têm mostrado a ação do propionato no metabolismo lipídico no fígado, onde há evidências de que promove decréscimo na concentração plasmática da VLDL e da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) sendo, portanto, um agente anti-lipogênico (DEMIGNÉ et al., 1995; WILLIAMS; JACKSON, 2002; DELZENNE et al., 2002; BEYLOT, 2005; WONG et al., 2006).

Dietas que contêm carboidratos fermentáveis fornecedores de propionato, como os frutanos, possuem a capacidade de reduzir os níveis de lipídios plasmáticos devido à diminuição na síntese, esterificação e incorporação de triacilgliceróis e colesterol às lipoproteínas VLDL e LDL-c, respectivamente. Os frutanos não são formadores de géis, não aumentam a viscosidade no intestino delgado e não têm propriedades de adsorver lipídios. Mesmo assim, podem alterar a lipogênese através de seus produtos da fermentação, atuando no metabolismo sistêmico (DEMIGNÉ et al., 1995; WILLIAMS; JACKSON, 2002; BEYLOT, 2005; WONG et al., 2006).

Demigné et al. (1995) demonstraram que a incorporação do [^{14}C] acetato à síntese de ácidos graxos e colesterol é altamente inibida pela presença do propionato. O provável mecanismo para redução dos níveis de colesterol plasmático (LDL-c) é a inibição da HMG-CoA redutase, enzima limitante da síntese de colesterol (DEMIGNÉ et al., 1995; WILLIAMS; JACKSON, 2002; KAUR; GUPTA, 2002; BEYLOT, 2005; WONG et al., 2006).

Para diminuir a VLDL, há inibição da lipogênese no fígado através da redução de 50% da atividade de todas as enzimas envolvidas na síntese de lipídios (ácidos graxos sintetase, enzima málica, ATP-citrato-liase e glicose-6-fosfato-desidrogenase) e da expressão gênica da enzima ácido-graxo-sintetase, evidenciada pelo decréscimo de seu RNA-m (DELZENNE; KOK, 1999; DELZENNE et al., 2002; WILLIAMS; JACKSON, 2002; WONG et al., 2006).

O ácido butírico (butirato) é um AGCC de 4 carbonos (FUKUSHIMA, 1995). É a principal fonte energética para os colonócitos, que fornece mais de 70% do total de energia consumida por estas células (MORITA et al., 1998; SMITH; YOKOYAMA; GERMAN, 1998; GIBSON et al., 1999; PRYDE et al., 2002; BAUER-MARINOVIC et al., 2006, WONG et al., 2006).

Uma das teorias para a etiologia das colites ulcerativas (doença de Crohn e retocolite ulcerativa) é a incapacidade de metabolizar o butirato, o que resultaria em deficiência de suprimento de energia para os colonócitos, podendo levar à atrofia da mucosa (CUMMINGS; MACFARLANE, 1997; SMITH; YOKOYAMA; GERMAN, 1998; MORITA et al., 1998; PRYDE et al., 2002).

Entretanto, os outros AGCC já citados são, também, empregados como fonte energética. Pela ordem, as células do intestino grosso, preferencialmente, utilizam o butirato, seguido pelo propionato e, por último, o acetato (SMITH; YOKOYAMA; GERMAN, 1998; WONG et al., 2006).

O butirato possui grande relevância para o intestino grosso. Sua produção provém da fermentação bacteriana e os substratos considerados

butirogênicos são o amido resistente e os frutanos, principalmente os FOS (CAMPBELL et al., 1997; PRYDE et al., 2002; BEYER-SEHLMAYER et al., 2003; GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006; BAUER-MARINOVIC et al., 2006).

Aproximadamente, 95% do butirato é absorvido pela mucosa do cólon e, dessa forma, possui concentrações muito reduzidas e quase indetectáveis na veia porta, evidenciando a sua ação predominantemente local. Ele influencia a morfologia, proliferação, diferenciação e o metabolismo dos colonócitos (SMITH, YOKOYAMA; GERMAN, 1998; PRYDE et al., 2002; BAUER-MARINOVIC et al., 2006; GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006; WONG et al., 2006, COMALADA et al., 2006).

Os efeitos do butirato no cólon são extremamente complexos, especialmente devido à sua ação contraditória e diferenciada nas células normais e neoplásicas, fenômeno designado "*Efeito paradoxal do butirato*" (SCHEPPACH et al., 1995). Nos colonócitos normais, estimula a proliferação celular e, nos colonócitos neoplásicos, inibe a proliferação e induz a diferenciação celular, além de estimular a apoptose (SCHEPPACH et al., 1995; GIBSON et al., 1999; PRYDE, 2002; BEYER-SEHLMAYER et al., 2003; POOL-ZOBEL, 2005; GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006; KIEN et al., 2006; WONG et al., 2006, COMALADA et al., 2006).

Os efeitos microscópicos do butirato no intestino grosso saudável são o aumento da profundidade (altura) e bifurcação das criptas, além do estímulo à hipertrofia do ceco (CAMPBELL et al., 1997; LOBO et al., 2007).

Devido à ação do butirato em colonócitos normais, diversos mecanismos que promovem efeito trófico no intestino grosso foram propostos:

- Estímulo da proliferação celular na zona basal da cripta (60%), onde se encontram os colonócitos sãos e as células indiferenciadas (SCHEPPACH et al., 1995);
- Aumento do metabolismo celular (β -oxidação), pois é a principal fonte energética dos colonócitos (VELÁZQUEZ et al., 1997; SMITH, YOKOYAMA; GERMAN, 1998; PRYDE et al., 2002; LUPTON, 2004; CUFF; BEECHY, 2004; POOL-ZOBEL, 2005; BAUER-MARINOVIC et al., 2006, KIEN et al., 2006; WONG et al., 2006);
- Aumento da enzima glutathione-transferase, responsável pela detoxificação de compostos associados com o estresse oxidativo (BAUER-MARINOVIC et al., 2006; GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006);
- Estímulo da síntese de DNA (GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006; WONG et al., 2006);
- Controle da expressão da deacetilase de histonas (GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006; WONG et al., 2006).

Em contrapartida, estudos *in vitro* e *in vivo* verificaram que o butirato, em colonócitos neoplásicos, promove interrupção do ciclo celular, diferenciação e apoptose através de diversos mecanismos de ação:

- Indução da hiperacetilação das histonas através da inibição da deacetilase de histonas, que bloqueia a fase G1-S do ciclo celular (SCHEPPACH et al., 1995; GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006; LUPTON, 2000; LUPTON, 2004);
- Indução da expressão do gene $p21^{waf1/cip1}$, inibidor do ciclo celular (OHATA; USAMI; MIYOSHI, 2005; GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006; KIEN et al., 2006; COMALADA et al., 2006);

- Ativação da caspase-3 (GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006);
- Regulação da expressão de genes relacionados com a proliferação celular: *p53* (inibição); *PCNA* (estimulação), *ki67* (estimulação) (DAVIE, 2003; GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006);
- Inibição da expressão de proto-oncogenes: *c-ras*, *c-src*, *c-myc* (GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006);
- Regulação da expressão de enzimas relacionadas com a diferenciação celular: fosfatase alcalina (estimulação); dipeptidil-peptidase (estimulação); 5-lipooxigenase (estimulação) (GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006);
- Regulação da expressão de genes relacionados com apoptose celular: *Bax* (estimulação); *Bak* (estimulação); *Bcl-2* (inibição), *Bc-xl* (inibição) (GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006).

Devido a isso, diferentes estudos *in vivo* têm estabelecido correlação inversa entre o aumento da concentração luminal de butirato e diminuição na incidência de câncer de cólon (COMALADA et al., 2006; VERGHESE; CHAWAN; SHACKELFORD, 2002).

Assim, observa-se grande interesse em substratos fermentativos que produzam AGCC. Mas há discussões sobre o papel da fermentação das fibras e sua significância em relação à proteção/promoção do câncer de cólon e existe enorme discrepância entre os resultados *in vivo* e *in vitro* (LUPTON, 2004). Alguns estudos mostram que ocorre relação entre a ingestão de fibras e o baixo risco de desenvolver câncer de cólon e outros não encontram correlação (POOL-ZOBEL, 2005).

Porém, muitas evidências experimentais fornecem resultados promissores sobre o papel dos frutanos na redução do risco de câncer de

cólon. Nesses estudos, foram empregados como modelo animais com câncer de cólon induzido experimentalmente pelo azoximetano (AOM) ou dimetilhidrazina (DMH), os quais geram lesões microscópicas pré-neoplásicas, chamadas focos de criptas aberrantes (FCA) (RENEHAN et al., 2002; POOL-ZOBEL et al., 2002; POOL-ZOBEL, 2005).

Há na literatura muitos trabalhos que correlacionaram o consumo de frutanos e a diminuição dos FCA. Utilizaram o modelo de indução de câncer de cólon por AOM ou DMH em ratos e ofereceram inulina e/ou FOS nas mais diferentes concentrações e tempo de ensaio. Os resultados mostraram diminuição dos FCA e aumento da apoptose celular. A explicação desse efeito fisiológico foi devido à ação do butirato no tecido neoplásico (RENEHAN et al., 2002; POOL-ZOBEL et al., 2002; POOL-ZOBEL, 2005).

Os AGCC, principalmente o butirato, estimulam a síntese de DNA apenas nos compartimentos basais das criptas, os quais correspondem 60% das mesmas. São consideradas zonas fisiológicas proliferativas onde se encontram os colonócitos e as células indiferenciadas (*stem cells*). O restante é a zona apical da cripta (40%), localizada próxima à luz do cólon, onde o processo de divisão celular cessa e os colonócitos se diferenciam (SCHEPPACH et al., 1995; GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006).

No epitélio de revestimento, as células senescentes são esfoliadas e sofrem *anoikis*, processo no qual perdem a adesão com a lâmina própria e são induzidas a apoptose. É na região apical da cripta que acontece, habitualmente, o crescimento maligno/pré-maligno **(Figura 3)** (SCHEPPACH et al., 1995; POTTEN; WILSON; BOOTH, 1997; POTTEN,

1997; WONG; WRIGHT, 1999; JOHNSON, 2002; GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006).

Figura 3: Regiões da cripta colônica (Adaptado de GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006).

Entretanto, pode ocorrer a expansão da zona proliferativa, atingindo regiões apicais da cripta. Esse fenômeno é designado hiperproliferação, considerado indício pré-neoplásico (SCHEPPACH et al., 1995; WASAN; GOODLAD, 1996). Nesse compartimento e, também, nessa linhagem celular pré ou neoplásica, o butirato possui a propriedade de promover apoptose (SCHEPPACH et al., 1995).

Na zona proliferativa da cripta ocorrem apoptoses espontâneas, cuja função é controlar a expansão das células indiferenciadas. Esse processo não é tão regulado no intestino grosso, devido ao aumento da expressão do gene anti-apoptótico *Bcl-2*. Portanto, essa característica pode explicar maior incidência de câncer no intestino grosso do que no delgado (POTTEN, 1997; WASAN; GOODLAD, 1996).

As criptas se reproduzem por fissão (bifurcação), começando pela bifurcação basal, seguida pela divisão longitudinal, gerando duas criptas "filhas" (BASHIR; GERALD; GOODLAD, 2004; CUMMINS; JONES; THOMPSON, 2006). Esse processo foi identificado na década de 1970 pelo pesquisador Clarke R. M, citado por PARK et al. (1997) (**Figura 4**).

A bifurcação tem como função a regeneração e o crescimento intestinal. Entretanto, os mecanismos pelos quais as criptas são induzidas à divisão são pouco conhecidos. Sabe-se que a fissão da cripta inicia-se quando há aumento do número de células indiferenciadas e do seu tamanho (PARK et al., 1997; WRIGHT, 2000; BASHIR; GERALD; GOODLAD, 2004; CUMMINS; JONES; THOMPSON, 2006).

Figura 4: Representação do ciclo da cripta (Adaptado de PARK et al., 1997).

As fibras alimentares fermentáveis podem estimular a proliferação celular no cólon e a importância global disso ainda é desconhecida (WASAN; GOODLAD, 1996).

Devido aos vários trabalhos publicados, Scheppach et al. (1995) sugerem ser improvável que o estímulo à proliferação celular no segmento basal da cripta possa estar relacionado com a carcinogênese coloretal.

Outros pesquisadores, porém, observam que o estímulo à proliferação celular é um marcador de carcinogênese, geralmente considerado como um dos primeiros eventos no desenvolvimento de neoplasias. É indiscutível que a proliferação celular e a fissão da cripta são essenciais para a renovação e defesa do intestino, mas o seu excesso tem sido associado com o aumento no risco de câncer de cólon, pois um desequilíbrio no processo de bifurcação das criptas resultaria em elevação da quantidade de criptas suscetíveis ao desenvolvimento de mutações (PRESTON-MARTIN et al., 1990; McCULLOUGH et al., 1998; WONG; GIBSON, 2003; BASHIR; FITZ-GERALD; GOODLAD, 2004).

O intestino grosso é um dos órgãos mais metabolicamente ativos, porém pouco compreendido (LAMBO-FODJE; OSTE; NYMAN, 2006). Com o avanço das pesquisas, deixou de ser considerado simplesmente um tubo cuja mera função era apenas armazenar e eliminar os resíduos alimentares. Atualmente, reconhece-se que o cólon contribui de maneira vital para a saúde humana, como resultado da complexa relação entre os substratos fermentativos da dieta e a microbiota residente.

Em função dos diversos estudos epidemiológicos que indicam que o baixo consumo de fibra alimentar e de outros compostos bioativos está

relacionado com o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis, bem como o reduzido número de informações sobre a fermentação de carboidratos não-disponíveis no intestino grosso, reconhece-se a importância da realização de estudos experimentais com animais e humanos com a finalidade de aprofundar os mecanismos envolvidos e a inter-relação dieta e saúde.

2 Justificativa

A maior parte dos estudos com frutanos (inulina e FOS) foi realizada a partir da década de 1990, com a introdução do conceito de prebióticos (GIBSON; ROBERFROID, 1995). As pesquisas foram conduzidas com isolados industrializados de inulina (Raftline®) e FOS (Raftlose®), provenientes da raiz da chicória (*Chicorium intybus*) e produzidos pela empresa Orafiti®. Esses estudos confirmam seu efeito prebiótico, como fibra alimentar e na absorção de minerais.

Poucos trabalhos envolvem a utilização de alimentos fonte de frutanos em vez de isolados industrializados. Lobo et al. (2007) verificaram a influência dos frutanos do yacon no metabolismo ósseo e na estrutura do intestino grosso de ratos.

Há, também, poucos estudos que mostram os efeitos dos frutanos na morfometria e proliferação celular no intestino grosso. Os trabalhos sobre o assunto utilizam, contudo, outros tipos de fibras alimentares (FLEMING; FITCH; VRIES, 1992; McCULLOUGH et al., 1998; PERRIN et al., 2001). Da mesma forma, os estudos *in vitro* com frutanos também são escassos.

Portanto, são necessárias pesquisas que avaliem o processo fermentativo de frutanos da cebola e seus efeitos sobre a morfometria e proliferação celular no intestino grosso.

3 Objetivo Geral

Avaliar a fermentação *in vivo* e *in vitro* de frutanos (inulina e frutooligossacarídeos) da cebola (*Allium cepa* L.) e seu efeito no intestino grosso de ratos.

3.1 Objetivos específicos

Avaliar:

- O efeito *in vivo* do consumo de ração suplementada com cebola (10% de frutanos) sob diferentes parâmetros, como: peso e umidade das fezes, umidade do conteúdo cecal, pH cecal, concentração e proporção molar dos AGCC e peso total (parede e conteúdo) do ceco;
- A morfometria do intestino grosso (ceco e cólon);
- A proliferação celular do intestino grosso (ceco e cólon);
- O comportamento fermentativo *in vitro* das frações indigeríveis da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos) sob diferentes parâmetros, como: pH, concentração e proporção molar de AGCC, fermentabilidade, pressão e resíduo não-fermentado.

4 Material e Métodos

4.1 Amostra

Cebola (*Allium cepa* L.) em pó fornecida pela empresa Liotécnica® Tecnologia em Alimentos, Embu, SP.

4.2 Animais

Para a realização do ensaio biológico, foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, var. albinus) da linhagem Wistar Hannover, heterogênicos, com cerca de 5 semanas de idade e com peso médio de $146,8 \pm 7,86$ g.

Os animais foram obtidos a partir de colônias mantidas no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP).

4.3 Rações experimentais

As rações foram elaboradas de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93) (REEVES et al., 1993), produzidas pela Rohster Ltda®, acondicionadas hermeticamente, identificadas e armazenadas a 4°C.

As análises químicas das rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos) foram realizadas no Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF, USP.

As concentrações de fibra alimentar e sacarose, presentes na cebola, foram descontadas na formulação da ração suplementada com cebola (10% de frutanos) (**Tabela 3 e 4**).

Para elaboração das rações suplementadas com cebola (10% de frutanos) foi necessária adição de 37,2g e 40g de cebola em pó para o primeiro e segundo ensaio biológico, respectivamente. Com isso, forneceram 8g e 9,9g de fibras, valor acima do preconizado por Reeves et al. (1993). Para corrigir a concentração de fibras, foram adicionadas 8g e 9,9g de microcelulose para 100g de ração controle.

Para monitoração das possíveis diferenças no consumo diário de ração entre os grupos controle e frutanos 10%, foi introduzido o grupo pareado. O grupo pareado teve ingestão controlada, ou seja, a quantidade diária de ração oferecida era de acordo com o consumo do dia anterior do grupo frutanos 10%.

Para o cálculo do valor energético das rações, os fatores 4, 4, 9 e 1,5kcal/g (16,8; 16,8; 37,8 e 6,3kJ/g) foram utilizados para carboidratos disponíveis, proteínas, lipídeos e frutanos (ROBERFROID et al., 1993), respectivamente.

Tabela 3: Distribuição dos ingredientes nas rações experimentais do primeiro ensaio biológico¹

Ingredientes (%)	Ração	
	Controle	Suplementada com cebola (10% de frutanos)
Caseína (82,23% de proteínas)	20,70	20,70
Fibra (Microcelulose)	8,00	0,00
Óleo de soja	7,00	7,00
L-cistina	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Mistura Vitamínica	1,00	1,00
Mistura salina	3,50	3,50
Sacarose	10,00	7,20
Tert-butilhidroquinona	0,01	0,01
Amido	49,24	22,84
Cebola liofilizada ²	0,00	37,20
Total	100,00	100,00
Valor Energético (kcal/g) ³	3,70	3,40

¹Conforme especificações do AIN-93-G, com algumas modificações (REEVES et al., 1993);

²A cebola liofilizada foi proveniente da empresa Liotécnica Tecnologia em Alimentos Ltda;

³Para o cálculo do valor energético das rações, os fatores 4, 4, 9 e 1,5kcal/g (16,8; 16,8; 37,8; 6,3kJ/g) foram utilizados para carboidratos, proteínas, lipídios e frutanos, respectivamente.

Tabela 4: Distribuição dos ingredientes nas rações experimentais do segundo ensaio biológico¹

Ingredientes (%)	Ração	
	Controle	Suplementada com cebola (10% de frutanos)
Caseína (80% de proteínas)	21,25	21,25
Fibra (Microcelulose)	9,90	0,00
Óleo de soja	7,00	7,00
L-cistina	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Mistura Vitamínica	1,00	1,00
Mistura salina	3,50	3,50
Sacarose	10,00	7,00
Tert-butilhidroquinona	0,01	0,01
Amido	46,79	19,69
Cebola liofilizada ²	0,00	40,00
Total	100,00	100,00
Valor Energético (kcal/g) ³	3,70	3,40

¹Conforme especificações do AIN-93-G, com algumas modificações (REEVES et al., 1993);

²A cebola liofilizada foi proveniente da empresa Liotécnica Tecnologia em Alimentos Ltda;

³Para o cálculo do valor energético das rações, os fatores 4, 4, 9 e 1,5kcal/g (16,8; 16,8; 37,8; 6,3kJ/g) foram utilizados para carboidratos, proteínas, lipídios e frutanos, respectivamente.

4.4 Protocolo experimental

Com o objetivo padronizar todas as técnicas utilizadas no estudo, foi conduzido um ensaio biológico piloto. Os procedimentos otimizados foram: sacrifício do animal; coleta de órgãos (fígado, baço e rins), ceco e cólon; análise das fezes e conteúdo intestinal.

Foram realizados dois ensaios biológicos, nos quais foram utilizados 42 e 18 ratos machos, com peso inicial médio de 145,1±8,62g e 140,2±6,44g, respectivamente.

Todo o protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FCF, USP.

Os ensaios biológicos continham três grupos experimentais: controle (*ad libitum*); pareado (*consumo controlado*) e frutanos 10%.

Os grupos controle e frutanos 10% receberam, *ad libitum*, a ração controle e suplementada com cebola (10% de frutanos), respectivamente, ao passo que o grupo pareado teve consumo controlado.

Durante o período dos ensaios, os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais de aço inoxidável, temperatura média de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $55\pm 10\%$ e ciclo de luminosidade de 12h claro/escuro.

Os ensaios biológicos duraram 32 dias, após 6 dias de adaptação à ração e ao ambiente. A partir do 1.º dia, foram mensurados o consumo diário de ração e o peso corporal a cada 3 dias.

As fezes do primeiro ensaio biológico foram coletadas durante 10 dias (do 14.º ao 23.º dia de experimento), pesadas, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -20°C .

Para o sacrifício dos animais, foram administrados 800 μL (75 $\mu\text{L}/100\text{g}$ de animal) de solução de xilazina (Coopazine®) e cloridrato de cetamina (Vetaset®) na proporção de 1:2 (v/v), via intraperitonal.

No primeiro e segundo ensaios biológicos foram coletados o fígado, baço e rins, lavados com solução salina (NaCl 0,9%) e pesados.

- Primeiro ensaio biológico:

O primeiro ensaio biológico seguiu o protocolo descrito no **item 4.4** e teve como objetivo estudar alguns parâmetros fermentativos e a morfometria do ceco e cólon dos grupos controle e frutanos 10%.

Foram utilizados 14 animais para cada grupo experimental: controle (*ad libitum*), pareado (*consumo controlado*) e frutanos 10%. Para retirada do ceco (inteiro) e cólon (2cm do cólon proximal), foram separados 6 animais dos grupos controle e frutanos 10%. Os tecidos foram lavados com solução salina (NaCl 0,9%), colocados na cortiça, cuidadosamente abertos, esticados, imersos por 20h em solução fixadora (formaldeído 10%) e transferidos para a solução de álcool 70%.

Para os animais remanescentes (n=8), o ceco foi removido, lavado com solução salina (NaCl 0,9%) e pesado, obtendo-se o peso total (parede e conteúdo).

Para análise dos AGCC, foram coletados 500mg de conteúdo cecal, adicionados 400µL de HgCl₂ 0,1% e 105µL de H₃PO₄ 5%, imediatamente imersos em nitrogênio (N₂) líquido e estocados a -20°C.

Após a retirada das alíquotas, o ceco foi limpo com solução salina (NaCl 0,9%) e pesado. O conteúdo do ceco foi determinado pela diferença entre o seu peso total e sua respectiva parede.

Os pesos dos órgãos (fígado, baço e rins) e das paredes do ceco foram expressos em g por 100g de peso do animal.

- **Segundo ensaio biológico**

O segundo ensaio biológico seguiu o protocolo descrito no **item 4.4** e teve como objetivo estudar a proliferação celular do ceco e cólon dos grupos controle e frutanos 10%.

Para cada grupo experimental (controle, pareado e frutanos 10%) foram utilizados 6 animais. O procedimento para a retirada dos tecidos (ceco e cólon) foi igual ao primeiro ensaio biológico.

4.5 Avaliação de parâmetros no intestino grosso

4.5.1 Umidade das fezes e do conteúdo cecal e pH

O pH cecal foi determinado com pHmêtro portátil (Denver Instrument Company®) acoplado com eletrodo de calibre 5mm de diâmetro (Denver Instrument Company® n. ° 3007361).

A umidade das fezes e do conteúdo cecal foi determinada pela perda de peso ao aquecimento em estufa regulada a 105°C por 24 horas.

4.5.2 Bulking index

Com o consumo de ração estatisticamente igual ($p > 0,05$) entre os grupos controle e frutanos 10%, foi possível calcular o *bulking index* (BI). Por definição, o BI é o aumento, em gramas, do peso fecal úmido por grama de carboidrato não-disponível ingerido (NYMAN, 2002). O BI foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Fezes do grupo frutanos 10\% (g)} - \text{Fezes do grupo controle (g)}}{\text{Quantidade ingerida de frutanos pelo grupo frutanos 10\% (g)}}$$

4.5.3 Fermentação *in vivo*

Para análise dos AGCC no conteúdo cecal, foi utilizada a técnica implantada e padronizada no Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP, a qual está baseada no método proposto por Schafer (1995).

No momento das análises, alíquotas de conteúdo cecal (500mg) foram descongeladas e homogeneizadas por 5 minutos. Foram adicionados volumes diferentes de padrão-interno (PI), dependendo da amostra. Os homogeneizados foram centrifugados a 6000rpm por 50 minutos e os sobrenadantes filtrados com membrana de porosidade 0,8 μ m (Minisart®).

Os AGCC foram analisados por cromatografia a gás, utilizando-se o cromatógrafo a gás *HP 6890* com detector de ionização de chama, coluna capilar Chrompac 7485 (25m x 320 μ m x 0,30 μ m nominal), temperatura inicial de 70°C e final 250°C, *split* de 20:1, gás de arraste Hélio (fluxo de 1mL/min) e tempo de corrida de 21 minutos.

A curva-padrão foi construída com soluções de AGCC (Volatile Acid Standard Mix, Supelco®): ácido acético (C₂) (10,07mM), ácido propiônico (C₃) (10,49mM) e ácido *n*-butírico (nC₄) (10,08mM). O ácido 2-metil-valérico (Aldrich 10987-8) foi utilizado como PI. No final, foram injetados 3 μ L das amostras.

4.5.4 Histologia do ceco e cólon

As técnicas histológicas utilizadas foram padronizadas no Laboratório de Biologia dos Epitélios Digestivos do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). A aplicação dessas técnicas foi supervisionada pela Prof^a Dr^a Eliana Parisi Alvares.

4.5.4.1 Preparação dos tecidos

Os tecidos passaram pelas seguintes etapas: fixação; desidratação; diafanização; inclusão e coloração.

- **Fixação**

A fixação estabiliza a morfologia tecidual, evitando-se a autólise do tecido por suas próprias enzimas e as substâncias fixadoras têm função de insolubilizar as proteínas teciduais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; LI, 2003).

No presente trabalho, os tecidos permaneceram por 20 horas no fixador (formaldeído 10%), lavados com água corrente por 20 minutos e submersos no álcool 70%.

- **Desidratação**

A desidratação remove a água tecidual, a qual é extraída pela passagem do tecido em banhos de concentrações crescentes de etanol.

Os tecidos foram imersos em álcool 95% e 100%, em intervalo de 2 horas.

- **Diafanização**

A diafanização consiste na substituição do etanol por um líquido miscível com parafina. As substâncias mais utilizadas para tornarem os tecidos translúcidos são o xilol e o benzol e, além disso, têm a função de retirar os lipídios teciduais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

No presente trabalho, foi utilizado xilol, com 2 horas de duração para cada tecido.

- **Inclusão**

Nesta etapa, os tecidos foram mergulhados em recipiente de fôrma retangular contendo parafina fundida e, devido à temperatura do meio de inclusão, o xilol evaporou.

O complexo "parafina com tecido" solidificou-se a temperatura ambiente e foi seccionado em micrótomo, obtendo-se cortes semi-seriados de 6µm. Os cortes foram estirados em água quente e colocados em lâminas histológicas.

- **Coloração**

Como os tecidos são incolores, os quais dificultam sua visualização no microscópio óptico, eles foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) ou foi feita uma reação histoquímica com ácido periódico de Schiff – PAS (*Periodic Acid Schiff*), que identificou células produtoras de muco (caliciformes).

4.5.4.2 Morfometria

Para realização da análise morfométrica do ceco e cólon (altura das criptas e número de criptas bifurcadas) foram selecionadas as criptas inteiras, perpendiculares à muscular da muçosa e com lúmen.

As lâminas foram analisadas através de microscopia de luz (microscópio Nikon), utilizando-se ocular integradora (n.º 2 Carl Zeiss) e objetiva projetando aumento de 20 vezes, para medida da altura das criptas do ceco e cólon e número de criptas bifurcadas do ceco ou 40 vezes, para medida do número de criptas bifurcadas do cólon.

Foram capturadas imagens dos cortes da mucosa intestinal com o auxílio do software Image Pró Plus (versão 6.0) adaptado ao microscópio óptico Olympus BX51, sob objetiva de 20x ou 40x.

Para cada um dos parâmetros, foram contados 30 "campos" (região do tecido delimitada ao acaso) para cada animal.

A altura das criptas do ceco e cólon foi determinada pela contagem do número de células por hemi-cripta, desde a base até o ápice.

As criptas bifurcadas foram consideradas as que se encontravam em todos os estágios de bifurcação. O índice de bifurcação (%) do ceco e cólon foi determinado pela razão entre o número de criptas bifurcadas pelo número total de criptas contadas em 30 "campos".

4.5.4.3 Proliferação celular

Para avaliação da proliferação celular, foi utilizada a técnica da estimativa do índice metafásico (IMET), descrito por Whight e Appleton, 1980.

O sulfato de vincristina (Tecnocris®) (dose 1mg/kg de peso corporal) foi utilizado como agente bloqueador de mitose no estágio da metáfase (MARTINS et al., 1997). Após 2 horas da administração intraperitoneal dessa substância, os animais foram sacrificados (n=6), reavaliado por Whight e Appleton, 1980.

As criptas coradas com H&E, dispostas longitudinalmente, inteiras e que apresentassem lúmen foram contadas utilizando-se ocular integradora e objetiva projetando aumento de 100 vezes o tamanho do material.

Para o procedimento, foram contadas cerca de 2300 células epiteliais bloqueadas e não-bloqueadas por animal. Para identificação das células bloqueadas pela vincristina, observava-se a cromatina condensada, geralmente de coloração roxa. O índice metafásico (%) foi expresso como:

$$\frac{\text{Número de células metafásicas}}{\text{Número total de células contadas}} \times 100$$

Para localizar em que parte da cripta ocorreram as metáfases (60% - basal ou 40% - apical), as células da hemi-cripta foram numeradas a partir da região basal até a apical e esses números de cada célula identificou sua posição (**Figura 5**). A posição onde ocorreram as metáfases foi importante para caracterizar e interpretar a proliferação celular na cripta.

Figura 5: Posições celulares da cripta colônica.

Foram capturadas imagens dos cortes da mucosa intestinal com o auxílio do software Image Pró Plus (versão 6.0) adaptado ao microscópio óptico Olympus BX51, sob objetiva de 40x.

4.6 Análises químicas

4.6.1 Umidade

A umidade foi determinada pela perda de peso da amostra submetida a aquecimento em estufa a vácuo regulada a 70°C (OSBORNE, 1986).

4.6.2 Fração cinza

A cinza foi determinada pelo peso de material que restou após a destruição da matéria orgânica submetida a 525°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

4.6.3 Proteínas

Para a determinação da proteína foi utilizado o método oficial da AOAC 960.52, método micro-Kjeldhal (AOAC, 1980), com modificação. Utilizou-se catalisador SO₄Cu no lugar do mercúrio e para estimativa da quantidade de proteína o valor do nitrogênio foi multiplicado pelo fator de conversão 6,25 ($N \times 6,25$).

4.6.4 Lipídios

Os lipídios foram determinados pelo peso do material extraído por éter etílico, a partir de amostra dessecada (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

4.6.5 Fibra alimentar

Para determinação de fibra alimentar total (FAT), fibra alimentar solúvel (FAS) e fibra alimentar insolúvel (FAI), foi utilizado o método oficial da AOAC 991.43, enzimico-gravimétrico com tampão MES/TRIS (LEE et al., 1992), com modificação.

A modificação incluiu adição de 200μL de frutanasase (Megazyme® 2200U/mL), pois parte da inulina é determinada pelo método de fibras da AOAC. Para não ocorrer sobreposições de valores, foi feita prévia correção

com a adição de frutanas, a qual hidrolisou os frutanos presentes nas amostras (PROSKY; HOEBREGS, 1999; PAK, 2003; FILISETTI, 2006).

O método baseou-se na determinação do peso do resíduo resultante da eliminação do amido, da proteína e dos frutanos (GP>12), através da α -amilase, amiloglicosidase, protease e frutanas, respectivamente, e posterior precipitação das FAS na presença de etanol 78%.

Para determinação de FAI, o hidrolisado contendo o resíduo foi filtrado e lavado com água. O filtrado e as águas de lavagem foram utilizados para determinar a FAS. O resíduo foi lavado com etanol 95% e acetona, seco e pesado. A FAI correspondeu ao peso do resíduo descontando-se a proteína e as cinzas.

Para análise de FAS, quatro volumes de etanol 98% foram adicionados nos filtrados e nas águas de lavagem, com a finalidade de precipitar os compostos. A solução alcoólica e o precipitado foram filtrados, lavados com etanol 78%, etanol 95% e acetona, secos e pesados. A FAS correspondeu ao peso do precipitado descontando-se a proteína e as cinzas. Portanto, a FAT foi obtida através da soma das frações de FAI e FAS.

4.6.6 Frutanos, frutose, glicose, sacarose e grau de polimerização

Os frutanos, glicose, frutose e sacarose foram analisados pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com Detector de Pulso Amperométrico (CLAE-DPA) (HOEBREGS, 1997), baseado no tratamento da amostra com amiloglicosidase, frutanas e na determinação de açúcares **(Figura 6)**.

A resposta do método de determinação de frutanos por CLAE-PAD é linear ($r^2 = 0,99$), preciso (coeficiente de variação = 5,8%) e com taxa de recuperação média de 108,1%, de acordo com Capito (2001).

Para a extração dos frutanos, glicose, frutose e sacarose nas amostras contendo, aproximadamente, 1g de frutanos (3,6g de cebola e 10g de ração), foi acrescentada água destilada em ebulição (M_1), a temperatura de $85 \pm 2^\circ\text{C}$.

A solução foi transferida para balões volumétricos de 100mL (cebola) ou 250mL (rações), mantendo-os em agitação por 10 minutos e a $85 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após resfriar, o volume do balão, contendo o extrato, foi completado com água e pesado (M_2). O material foi transferido para um béquer de 250mL, misturado sob agitação magnética, foram retirados 10g (M_7) de alíquota para A0 e completados para 100g, com água destilada.

Paralelamente, do material remanescente, foram transferidos 15g de amostra (M_3), adicionados 15g de tampão acetato ($\text{pH } 4,5 \pm 0,05$) e 100 μL de amiloglicosidase (Megazyme® 3260U/mL), incubados a $60 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 minutos e pesados (M_4).

Deste primeiro hidrolisado, 10g de alíquota (M_8) foram retirados para A1 e completados para 100g, com água destilada.

À massa remanescente (M_5), foram adicionados 200 μL de frutanase (Megazyme® 2200U/mL), incubados por 30 minutos a $60 \pm 2^\circ\text{C}$ e pesados (M_6). Deste segundo hidrolisado foi retirado 1g de alíquota (M_9) para A2 e completado para 100g, com água destilada.

Da amostra integral (A0) e do primeiro e segundo hidrolisados (A1 e A2), foram retiradas alíquotas para purificação com hexano, filtradas

através de filtros de microfibra de vidro Whatman® GF/F e filtros de membrana de nylon Whatman® com 0,2µm de porosidade. O material foi analisado por CLAE-PAD, utilizando coluna analítica Carbo Pac PA-1.

Para análise dos açúcares, as condições cromatográficas incluíram temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com fase móvel A, NaOH 300mM (livre de carbonato) e fase móvel B, NaOH 18mM (livre de carbonato), com fluxo de 1mL/min e volume de injeção de 25µL. Os açúcares foram determinados a partir de uma curva-padrão externa, nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60µg/mL.

Figura 6: Fluxograma para determinação dos frutanos.

Para análise das concentrações de frutanos, glicose, frutose e sacarose, no A₀ foram determinadas a frutose livre (F_l), a glicose livre (G_l) e a sacarose (S); no A₁ a frutose livre (F_l), a sacarose (S) e a soma da glicose livre (G_l) e da glicose proveniente do amido (G_a) e no A₂ a glicose (G_t) e a frutose (F_t) total.

Para determinação da glicose (G_f), frutose (F_f) e frutanos (f), provenientes dos frutanos, utilizaram-se as seguintes expressões:

$$G_f = G_t - (S/1,9) - (G_l + G_a)$$

$$F_f = F_t - S/1,9 - F_l$$

$$f = k (G_f + F_f)$$

Onde: $k = [180 + 162(n - 1)]/180n$.

O grau de polimerização (n) foi obtido pela divisão da concentração de frutose pela glicose acrescida uma unidade: $n = [(F_f/G_f) + 1]$.

4.6.7 Amido resistente

O amido resistente (AR), quantificado na cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos), foi baseado no método da AOAC 2002.02 (McCLEARY; MONAGHAN, 2002; McCLARY; McNALLY; ROSSITER, 2002), com adaptações. Todas as amostras foram secas e passadas através de um tamis (60mesh) e desengorduradas.

Triplicatas de 100mg foram analisadas em tubos de plástico (50mL) graduados, de fundo cônico e com tampa. As amostras foram pré-lavadas duas vezes com 8mL de etanol 80% e centrifugadas (3000rpm) por 10

minutos. Os sobrenadantes foram reservados em balões volumétricos de 50mL, fechados e refrigerados a 4°C, para posterior quantificação de açúcares solúveis. Nos resíduos, foram adicionados 4mL de tampão trismaleato/NaOH 0,1M (pH = 6), contendo CaCl₂ 1mM, azida sódica 0,02%, amiloglicosidase (4U/mL, Sigma A-7255), α-amilase (300U/mL, sigma A-3176) e pepsina (500U/mL, Sigma P-7012).

Os tubos contendo os resíduos em suspensão foram agitados, tampados e incubados a 37°C por 16h sob agitação.

Após a incubação, foram adicionados 8mL de etanol 99%, agitados e centrifugados (3000rpm) por 10 minutos, sem tampa. Essa lavagem com álcool se repetiu por mais uma vez e, então, os sobrenadantes foram combinados com o conteúdo dos balões refrigerados a 4°C.

Foram adicionados 3mL de KOH 2M nos tubos, contendo resíduos parcialmente submersos em banho de gelo e sob agitação magnética.

Após 20 minutos, foram adicionados 10mL de tampão NaAc/HAc 1,2M (pH = 3,8) e cessada a agitação magnética. O pH foi verificado e, se necessário, ajustado para 4,75, com solução de NaOH ou HCl.

Imediatamente, 100μL de amiloglicosidase (3200U/mL de tampão NaAc/HAc, pH = 4,75) foram adicionados, agitados, tampados e incubados em banho sob agitação a 50°C por 30 minutos.

Após a incubação, o volume de solução dos tubos foi completado para 20mL com água Milli-Q e centrifugados (3000rpm) por 10 minutos.

No sobrenadante, a concentração de glicose livre foi determinada pelo método enzimático glicoseoxidase/peroxidase/ABTS (BERGMEYER; BERNET, 1974). O feijão foi utilizado como padrão.

4.6.8 Fração indigerível

A fração indigerível (FI) foi determinada pelo método proposto por Saura-Calixto et al. (2000). As amostras foram previamente secas, passadas através de um tamis (60mesh) e desengorduradas.

Em tubos de ensaio de 30mL, previamente secos e tarados, foram pesados 300mg de amostra, em triplicata. Foram adicionados 9mL de tampão KCl/HCl 0,1M (pH = 1,5) e homogeneizados (Brinkmanm, Polytron). Em seguida, 200 μ L de pepsina (65000U/mL tampão KCl/HCl 0,1M, pH = 1,5) foram adicionados, os tubos tampados, agitados e incubados em banho-agitação a 40°C, por 60 minutos.

Após a incubação, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e o pH ajustado para 7, com 150 μ L de NaOH 4M. Em seguida, foram adicionados 9mL de tampão trismaleato/NaOH 0,1M (pH = 7,0) e 1mL de solução de α -amilase (3500U Sigma 3176). Os tubos foram tampados, agitados e incubados em banho-agitação a 37°C, por 16 horas.

Após a incubação, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e centrifugadas (3000g) por 15 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de plástico de 50mL com tampa. Os resíduos foram lavados com 10mL de água Milli-Q, centrifugados novamente, e esse ciclo repetido por duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados e os resíduos reservados.

Fração indigerível insolúvel – para quantificação da FI insolúvel, os resíduos foram colocados em estufa a 105°C por 18h. Quando retirados, foram colocados em dessecadores e pesados. As concentrações de FI insolúvel foram calculadas gravimetricamente.

Fração indigerível solúvel – Após a centrifugação, os sobrenadantes foram dialisados em membranas de diálise de 12000-14000 MWCO por 48h, a 37°C, em baldes com água sob agitação magnética. A água da diálise foi trocada, aproximadamente, 10 vezes em intervalos mínimos de 3 horas, durante 48h de diálise. Os dialisados foram transferidos para frascos de 50mL, previamente secos e tarados. Os frascos, contendo os dialisados, foram colocados na estufa a 105°C por 36h. Quando retirados, foram reservados em dessecadores e pesados assim que atingiram a temperatura ambiente. As concentrações de FI solúvel foram calculadas gravimetricamente.

Fração indigerível total – a FI total foi calculada pela soma de FI insolúvel e solúvel de cada réplica. A farinha de centeio integral foi utilizada como padrão.

4.6.9 Isolamento de fração indigerível

A fração indigerível (FI) foi isolada baseando-se no método do **item 4.6.8**. A quantidade de amostra inicial utilizada foi equivalente à necessária para obtenção de 800mg de FI e as soluções e enzimas adicionadas foram aumentadas proporcionalmente.

A FI total foi obtida pela combinação dos resíduos de FI insolúvel e os dialisados com FI solúvel. A secagem foi feita a vácuo em *speedvac* e a FI seca foi congelada a -20°C, até sua utilização.

4.6.10 Fermentação *in vitro*

Para avaliar a fermentação *in vitro* das frações indigeríveis (FI) da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos), foi

utilizada a técnica implantada e padronizada no Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

Esta técnica consistiu na utilização de culturas em condições anaeróbicas, empregando-se, como inóculo, o conteúdo cecal de ratos. O método foi descrito por Guillon et al. (1995), com modificações realizadas por Cambrodón e Martin-Carrón (2001) e Serrano, Goñi e Saura-Calixto (2005).

As amostras utilizadas foram as FI isoladas de acordo com a descrição do **item 4.6.8**.

Foram preparadas seis réplicas de 100mg de FI de cada amostra em frascos de vidro de 50mL, previamente secos e tarados. Duas triplicatas das amostras foram preparadas para ser indicativas de 0h e 24h de fermentação. Brancos (frascos sem amostra) e padrão (Lactulose – Sigma L-7877) também foram incluídos. As FI contidas nos frascos foram hidratadas com 8mL de meio de fermentação (MF), ativado e anaeróbico. Os frascos foram tampados com septos de borracha, pinçados com agulhas de entrada e saída de gás com válvulas de três vias. Após isso, os frascos foram borbulhados com CO₂ por 1 minuto, para certificação de que o meio estava anaeróbico, fechados e armazenados a 4°C, por 16h.

No dia seguinte, os frascos foram retirados da geladeira e deixados a temperatura ambiente. Foi preparado o inóculo (100g/L) com conteúdo cecal de ratos Wistar machos (300g de peso) e MF, ativado e anaeróbico.

O inóculo foi misturado em homogeneizador de amostras (Stomacher Logen Scientific) e filtrado (1mm mesh) antes de sua utilização. Foram

adicionados 2,5mL de inóculo em cada frasco de fermentação e novamente foi borbulhado CO₂, por 1 minuto, para garantir anaerobiose. Os frascos 24h tiveram as agulhas removidas dos septos, foram revestidos com Parafilm®, para evitar vazamentos de gases e incubados a 37°C, sob leve agitação, por 24h.

Frascos 0h – foram adicionados 5mL de água Milli-Q, o pH foi verificado e, em seguida, foram adicionados 3mL de água (lavagem do eletrodo) e 3mL de NaOH 1M (interrupção da fermentação). Os frascos foram centrifugados (3500rpm) a 4°C por 10 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para balões volumétricos de 25mL. Os resíduos foram colocados em estufa a 105°C para quantificação, por gravimetria, do resíduo não-fermentado (RNF). Os sobrenadantes foram completados para 25mL com água Milli-Q e congelados para análise de AGCC.

Frascos 24h – após 24h, os frascos foram retirados da incubação e resfriados a temperatura ambiente. A pressão interna foi medida com manômetro, com detecção de 0psi a 15psi. Então, foram destampados e o mesmo procedimento efetuado com os frascos 0h.

Os AGCC produzidos pela fermentação *in vitro* foram quantificados em cromatógrafo a gás (CG) HP 6890 Plus, com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar CP7747 de sílica fundida (WCTO), Varian. A temperatura do injetor e do detector foi 270°C, a corrida foi em rampa de 115°C a 270°C, sob pressão constante (tempo de corrida = 13min). As amostras foram injetadas em volume de 3µL, com *split* 1:30, por injetor HP 7683.

A curva-padrão foi obtida com soluções de AGCC (Volatile Acid Standard Mix, Supelco®) e ácido 2-metil-valérico (Aldrich 10987-8) como padrão interno (PI), em concentrações de 0,05 a 5,00mM.

Em *eppendorfs*, foram preparados 0,5mL de solução contendo AGCC, 0,4mL de solução de PI e 0,1mL de HClO₄ em concentrações que mantivessem semelhantes a acidez (pH) das amostras. Os *eppendorfs* foram centrifugados (12000rpm) a 4°C por 15 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para *vials* adaptáveis em bandeja de injeção automática.

Os parâmetros determinados na fermentação *in vitro* foram: pH, concentrações e proporções molares de AGCC (ácido acético, propiônico e butírico), fermentabilidade, pressão e do resíduo não-fermentado (RNF).

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo Centro de Estatística Aplicada (CEA) do Departamento de Estatística do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo (IME/USP).

Os programas computacionais utilizados foram: *Microsoft Excel* (versão XP) e *Statistica 5.0* (StaSoft®). As técnicas estatísticas utilizadas: Análise Descritiva Unidimensional; Análise Descritiva Bidimensional e Teste “t” de Student não-pareado.

Ensaio biológico

- Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão (DP) e as comparações dos grupos controle e frutanos 10% foram feitas através do teste “t” de Student não-pareado.
- Em todas as análises realizadas foi considerado um nível de significância de 5%.
- Foram construídos diagramas de dispersão, que consiste em análise descritiva dos dados obtidos, com o objetivo de comparar os dois grupos (controle e frutanos 10%) quanto aos parâmetros utilizados e verificar o comportamento deles, dois a dois.

Fermentação *in vitro*

- Foram construídos diagramas de dispersão para comparar os dados obtidos dos quatro substratos (lactulose, cebola e rações controle e suplementada com cebola – 10% frutanos), utilizados no método de fermentação *in vitro*, quanto aos parâmetros utilizados e verificar o comportamento deles, dois a dois.

5 Resultados e discussão

5.1 Concentração de frutanos e composição química da cebola e rações

Foram utilizados dois lotes distintos de cebola em pó, que serviram de ingrediente para elaboração das rações do primeiro e segundo ensaios biológicos (**Tabelas 5 e 6**). A concentração de frutanos da cebola, na base seca, foi $27,5 \pm 2,13\%$ e $27,9 \pm 0,22\%$, respectivamente.

O GP médio teórico de frutanos da cebola foi de 4,12, portanto o alimento continha grande quantidade de FOS. O resultado esteve de acordo com Van Loo et al. (1995), em que o GP médio da cebola (*Allium cepa* L.) foi 5, com predominância de 1-cestotriose (GF₂) (VAN LOO et al., 1995; CAMPBELL et al., 1997; ERNST et al., 1998).

Tabela 5: Composição química da cebola (*Allium cepa* L.) em pó (primeiro ensaio biológico)¹

Determinações (%)	Amostra	
	Liofilizada	Seca
Umidade residual ²	2,1±0,09	0,0
Proteína (N x 6,25) ²	10,1±0,26	10,3±0,26
Extrato Etéreo ²	3,3±0,37	3,4±0,38
Cinzas ²	5,2±0,06	5,3±0,06
FAS (sem frutanos) ⁴	3,7±0,05	3,8±0,05
FAI (sem frutanos) ⁴	19,6±0,29	20,0±0,29
FAT (sem frutanos) ⁴	23,3±0,34	23,8±0,34
Frutanos ³	26,9±2,13	27,5±2,13
Glicose ³	7,0±0,07	7,1±0,07
Frutose ³	4,4±0,02	4,5±0,02
Sacarose ³	7,5±0,13	7,7±0,13
Amido resistente total	2,4±0,35	2,4±0,35
Outros carboidratos disponíveis por diferença ⁵	7,8	8,0
Valor energético (kcal/g) ⁶	2,3	2,4

¹Resultados expressos como média ± DP (exceto "outros carboidratos disponíveis por diferença" e "valor energético");

²Para análise das cinzas, extrato etéreo, proteínas e umidade residual foi utilizado n=5;

³Para análise dos frutanos e dos açúcares (glicose, frutose e sacarose) foi utilizado n=3;

⁴Para análise das fibras alimentares foi utilizado n=3; FAS = fibra alimentar solúvel;

FAI = fibra alimentar insolúvel; FAT = FAS + FAI;

⁵Outros carboidratos disponíveis por diferença = 100 - (umidade + proteínas + fibras + frutanos + amido resistente + cinzas + lipídios + glicose + frutose + sacarose);

⁶Para o cálculo do valor energético, foram utilizados os fatores 4; 4; 9 e 1,5kcal/g (16,8; 16,8; 37,8; 6,3kJ/g) para os carboidratos, proteínas, lipídios e frutanos, respectivamente.

Tabela 6: Composição química da cebola (*Allium cepa* L.) em pó (segundo ensaio biológico)¹

Determinações (%)	Amostra	
	Liofilizada	Seca
Umidade residual ²	8,9±0,15	0,00
Proteína (N x 6,25) ²	8,2±0,24	9,0±0,24
Extrato Etéreo ²	3,0±0,37	3,3±0,37
Cinzas ²	4,5±0,03	5,0±0,03
FAS (sem frutanos) ⁴	3,9±0,13	4,3±0,13
FAI (sem frutanos) ⁴	20,8±0,37	22,8±0,37
FAT (sem frutanos) ⁴	24,7±0,37	27,1±0,37
Frutanos ³	25,4±0,22	27,9±0,22
Glicose ³	9,4±0,44	10,3±0,44
Frutose ³	4,4±0,23	4,9±0,23
Sacarose ³	7,4±1,31	8,1±1,31
Outros carboidratos disponíveis por diferença ⁵	4,1	4,4
Valor energético (kcal/g) ⁶	2,0	2,1

¹Resultados expressos como média ± DP (exceto "outros carboidratos disponíveis por diferença" e "valor energético");

²Para análise das cinzas, extrato etéreo, proteínas e umidade residual, foi utilizado n=5;

³Para análise dos frutanos e dos açúcares (glicose, frutose e sacarose), foi utilizado n=3;

⁴Para análise das fibras alimentares foi utilizado n=3; FAS= fibra alimentar solúvel;

FAI= fibra alimentar insolúvel; FAT = FAS + FAI;

⁵Outros carboidratos disponíveis por diferença = 100 - (umidade + proteínas + fibras + frutanos + cinzas + lipídios + glicose + frutose + sacarose);

⁶Para o cálculo do valor energético, foram utilizados os fatores 4; 4; 9 e 1,5 (kcal/g) (16,8; 16,8; 37,8; 6,3kJ/g) para os carboidratos, proteínas, lipídios e frutanos, respectivamente.

Nas **Tabelas 7 e 8** está apresentada a composição química das rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos) do primeiro e segundo ensaios biológicos.

Tabela 7: Composição química das rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos) (primeiro ensaio biológico)¹

Determinações (%)	Ração	
	Controle	Suplementada com cebola (10% de frutanos)
Umidade residual ²	4,7±0,06	5,4±0,07
Proteína (N x 6,25) ²	14,2±0,11	16,0±0,17
Extrato Etéreo ²	10,3±0,55	13,4±1,83
Cinzas ²	2,6±0,01	4,4±0,04
FAS (sem frutanos) ⁴	0,2±0,21	1,6±0,19
FAI (sem frutanos) ⁴	9,7±0,82	8,2±0,22
FAT (sem frutanos) ⁴	9,9±0,82	9,8±0,21
Frutanos ³	-	10,1±0,79
Amido resistente total	2,4±0,52	2,8±0,37
Carboidratos disponíveis por diferença ⁵	58,30	38,20
Valor energético (kcal/g) ⁶	3,8	3,5

¹Resultados expressos como média ± DP (exceto "outros carboidratos disponíveis por diferença" e "valor energético");

²Para análise das cinzas, extrato etéreo, proteínas e umidade residual foi utilizado n=5;

³O valor dos frutanos foi baseado na concentração de frutanos da cebola (*Allium cepa* L.);

⁴Para análise das fibras alimentares foi utilizado n=3; FAS = fibra alimentar solúvel; FAI = fibra alimentar insolúvel; FAT = FAS + FAI;

⁵Outros carboidratos disponíveis por diferença = 100 - (umidade + proteínas + fibras + frutanos + amido resistente + cinzas + lipídios);

⁶Para o cálculo do valor energético, foram utilizados os fatores 4; 4; 9 e 1,5kcal/g (16,8; 16,8; 37,8; 6,3kJ/g) para os carboidratos, proteínas, lipídios e frutanos, respectivamente.

Tabela 8: Composição química das rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos) (segundo ensaio biológico)¹

Determinações (%)	Ração	
	Controle	Suplementada com cebola (10% de frutanos)
Umidade residual ²	6,7±0,14	10,3±0,30
Proteína (N x 6,25) ²	14,5±0,19	16,3±0,17
Extrato Etéreo ²	10,8±0,34	14,0±0,44
Cinzas ²	2,9±0,27	4,7±0,11
FAS (sem frutanos) ⁴	0,3±0,11	0,9±0,17
FAI (sem frutanos) ⁴	9,9±0,27	9,2±0,21
FAT (sem frutanos) ⁴	10,0±0,17	10,1±0,32
Frutanos ³	-	10,3±0,66
Carboidratos disponíveis por diferença ⁵	55,0	34,3
Valor energético (kcal/g) ⁶	3,8	3,4

¹Resultados expressos como média ± DP (exceto "outros carboidratos disponíveis por diferença" e "valor energético");

²Para análise das cinzas, extrato etéreo, proteínas e umidade residual foi utilizado n=5;

³O valor dos frutanos foi baseado na concentração de frutanos da cebola (*Allium cepa* L.);

⁴Para análise das fibras alimentares foi utilizado n=3; FAS = fibra alimentar solúvel;

FAI = fibra alimentar insolúvel; FAT = FAS + FAI;

⁵Outros carboidratos disponíveis por diferença = 100 - (umidade + proteínas + fibras + frutanos + cinzas + lipídios);

⁶Para o cálculo do valor energético, foram utilizados os fatores 4; 4; 9 e 1,5kcal/g (16,8; 16,8; 37,8; 6,3kJ/g) para os carboidratos, proteínas, lipídios e frutanos, respectivamente.

Como foi utilizado ingrediente bruto (não-purificado), no caso a cebola em pó, a ração suplementada com cebola (10% de frutanos) apresentou valores um pouco maiores de proteínas, lipídios, cinzas e FAS (alto peso molecular) em relação à controle.

A cebola continha proteínas e lipídios de baixo valor nutricional e balanço de minerais diferente da preconizada pela AIN-93. Por esse motivo, os nutrientes não foram descontados na formulação das rações. As FAS encontradas nas rações controle (0,2g/100g e 0,3g/100g) e suplementada

com cebola (10% de frutanos) (1,6g/100g e 0,9g/100g) eram, provavelmente, de alto grau de polimerização, com metabolização nas partes mais distais do intestino grosso.

5.2 Perfil de carboidratos não-disponíveis da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos)

Os alimentos contêm diversos compostos resistentes à digestão no trato gastrointestinal. A fração indigerível (FI) é a parte que não foi digerida e absorvida no intestino delgado e alcançou o cólon, servindo como substrato fermentativo para a microbiota. Compreende a fibra alimentar (FA) e outras substâncias não hidrolisadas pelas enzimas, tais como amido resistente (AR), proteínas, polifenóis e compostos associados (SAURA-CALIXTO et al., 2000; GOÑI, 2003; SAURA-CALIXTO; GOÑI, 2004; GOÑI; LOPEZ-OLIVA, 2006).

A fração indigerível insolúvel (FII) é composta de AR, proteínas resistentes, taninos, ligninas, minerais, fibras alimentares insolúveis (FAI) e outros componentes. Já a fração indigerível solúvel (FIS) é composta, basicamente, de fibras alimentares solúveis (FAS) (SAURA-CALIXTO et al., 2000; GOÑI, 2003; SAURA-CALIXTO; GOÑI, 2004; GOÑI; LOPEZ-OLIVA, 2006).

As concentrações de AR, FAT (sem frutanos) e frutanos da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos) foram determinadas pelos métodos da AOAC. Com estas informações, foi possível estimar a concentração de carboidratos não-disponíveis (**Tabela 9**).

Tabela 9: Cálculo estimado da concentração de carboidratos não-disponíveis da cebola e das rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos)

Amostras	Carboidratos não-disponíveis (%) ¹		
	Insolúveis	Solúveis	Total
Cebola (lío-filizada)	22,0 (AR=2,4; FAI=19,6)	30,6 (Frut=26,9; FAS=3,7)	52,6
Ração controle	12,3 (AR=2,4; FAI=9,7)	FAS= 0,2	12,3
Ração suplementada com cebola (10% de frutanos)	11,1 (AR=2,8; FAI=8,2)	11,7 (Frut=10,1; FAS=1,6)	22,7

¹Resultados obtidos pela soma das frações de fibra alimentar, amido resistente e frutanos da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos), utilizados no primeiro ensaio biológico.

Pelas análises químicas de fibra alimentar e amido resistente, pôde-se observar que a cebola era fonte de fibra alimentar insolúvel (19,6%) e de frutanos (26,9%) e continha pequena quantidade de AR (2,4%) (**Tabela 9**).

A ração controle continha 98% dos carboidratos não-disponíveis na FII, representada pelo AR (2,4%) e FAI (9,7%), devido à adição de celulose, única fonte de fibra insolúvel de baixa fermentabilidade.

A ração suplementada com cebola (10% de frutanos) continha metade dos carboidratos não-disponíveis na fração solúvel, na qual aproximadamente 87% eram de frutanos. A outra metade era de FII, composta por FAI (8,2%) e AR (2,8%), provenientes da cebola.

As frações indigeríveis da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos), utilizados no primeiro ensaio biológico, foram analisadas pelo método proposto por Saura-Calixto et al. (2000) (**Tabela 10**). Seus valores foram comparados com o cálculo estimado de

carboidratos não-disponíveis, que consistiu na soma das concentrações de AR, FAT (sem frutanos) e frutanos (**Tabela 9**).

Tabela 10: Concentrações das frações indigeríveis totais (FIT), insolúvel (FII) e solúvel (FIS) presentes na cebola e nas rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos)^{1,2}

Amostras	Fração indigerível (%)		
	Insolúvel	Solúvel	Total
Cebola (liofilizada)	23,9±0,10	31,0±0,15	54,9±0,12
Ração controle	13,8±0,16	0,4±0,11	14,2±0,19
Ração suplementada com cebola (10% de frutanos)	9,9±0,23	14,9±0,24	24,8±0,20

¹Resultados expressos em base integral como média ± DP; ²Foram determinados a FI da cebola e das rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos) utilizados no primeiro ensaio biológico.

O conteúdo de fibra alimentar pode ser analisado por várias metodologias. Na maioria delas, os valores de FA são subestimados ou superestimados e há diversas fontes de erro no procedimento (SAURACALIXTO, 2006; FILISETTI, 2006).

Os métodos mais utilizados são os enzimáticos-gravimétricos da AOAC (985.29 e 991.43), que englobam a lignina, cutina, taninos, produtos de Maillard, parte do amido resistente e outros compostos associados à fração fibra. Esses métodos não quantificam substâncias cujo peso molecular é menor que 12, devido à solubilidade em etanol 78%, subestimando o conteúdo de fibra alimentar (FILISETTI, 2006).

Além disso, a metodologia da AOAC é limitada, pois analisa apenas parte dos substratos que escapam da ação enzimática do intestino delgado

e não corresponde às condições fisiológicas (SAURA-CALIXTO; GOÑI, 2004; SAURA-CALIXTO, 2006).

Saura-Calixto et al. (2000) propuseram o conceito de FI, em substituição ao de FA, porque consideraram que a técnica de determinação de FI quantificaria, de forma mais completa e próxima das condições fisiológicas (*in vivo*), a quantidade de substratos não-disponíveis que chegariam ao cólon.

Comparando-se as concentrações dos carboidratos não-disponíveis da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos), obtidos pelo método de FI (**Tabela 10**), com os estimados pela composição química (**Tabela 9**), foi possível observar valores um pouco mais altos, aproximadamente 10%. Uma provável explicação seria a presença de outros compostos associados à FI, como proteínas resistentes, fenólicos e minerais.

5.3 Fermentação *in vitro* da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos)

Os métodos de fermentação *in vitro* têm sido utilizados para prever os possíveis efeitos fisiológicos dos produtos gerados pela fermentação colônica de carboidratos não-disponíveis (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

Basicamente, a fermentação *in vitro* envolve a incubação da FI com o inóculo, que pode ser fezes humanas ou conteúdo cecal de animais, em um meio nutritivo, o qual fornece nutrientes. Oferece informações prévias do comportamento fermentativo dos substratos e sua elaboração deve ser

rigorosamente controlada (TOPPING; CLIFTON, 2001; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

No presente estudo, foi feita a fermentação *in vitro* das frações indigeríveis (FI) da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos), utilizados no primeiro ensaio biológico, visando estimar seu possível perfil fermentativo *in vivo*.

As amostras de FI e lactulose (padrão), adicionadas de inóculo e meio de fermentação, foram incubadas a 37°C por 24h, em meio anaeróbico. Os parâmetros que indicam fermentabilidade foram avaliados: ácidos graxos de cadeia curta (AGCC); pH; pressão e resíduo não-fermentado (RNF).

A fermentabilidade expressa a extensão da degradação de um substrato pelas bactérias colônicas, geralmente em relação ao aumento da produção de AGCC *in vitro*. Fibras solúveis, como a pectina, são muito mais fermentáveis do que as insolúveis, como a celulose (BARRY et al., 1995; TOPPING; CLIFTON, 2001; DE FRANCISCO, 2005; SLAVIN, 2005).

O pH foi mensurado no início e depois do período de incubação (Δ pH). Após 24h de fermentação, foi avaliada a pressão e calculada a porcentagem de substrato remanescente, denominado resíduo não-fermentado (RNF).

Os resultados dos parâmetros de fermentação *in vitro* estão descritos nas **Tabelas 11 e 12**.

Tabela 11: Fermentabilidade *in vitro* da lactulose e das frações indigeríveis da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos)

Substrato	Parâmetros de fermentação				
	AGCC ¹	RNF ²	Δ pH ³	Pressão (psi) ⁴	Fermentabilidade (%)
Lac	3,7±0,39	8,8±0,71	0,7	12,5±1,73	91,2±0,77
Ceb	2,8±0,11	26,6±1,30	0,5	9,1±1,28	73,6±1,41
RC	1,8±0,14	60,3±0,80	0,3	4,5±0,50	40,0±0,66
RF	2,7±0,15	26,5±3,90	0,4	7,0±0,50	73,7±3,94

Resultados da fermentação *in vitro* das FI da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos), utilizados no primeiro ensaio biológico; Resultados expressos como média $\pm$ DP; ¹Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), acetato + propionato + butirato, mmol/g substrato; ²Resíduo não-fermentado (RNF) = 100 X (massa seca final de resíduo após a fermentação) / (massa seca inicial de amostra); ³ Δ pH = pH 0h – pH 24h; ⁴Pressão formada em 24h; Lac (Lactulose), Ceb (Cebola), RC (Ração controle), RF (Ração suplementada com cebola – 10% de frutanos).

Tabela 12: Proporção molar de AGCC produzidos na fermentação *in vitro* da lactulose e das frações indigeríveis da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos)

Substrato	Proporção molar ¹		
	Acetato	Propionato	Butirato
Lac	62,6±0,18	17,9±0,06	19,6±0,22
Ceb	68,3±0,56	13,5±0,18	18,2±0,63
RC	71,6±0,30	16,7±0,28	11,7±0,29
RF	63,3±1,13	18,9±1,26	17,8±0,34

Resultados da fermentação *in vitro* das FI da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos), utilizados no primeiro ensaio biológico; Resultados expressos como média $\pm$ DP; ¹Porcentagem de cada AGCC em relação à soma da produção de acetato, propionato e butirato; Lac (Lactulose), Ceb (Cebola), RC (Ração controle), RF (Ração suplementada com cebola – 10% de frutanos).

Foi feita análise descritiva dos dados da fermentação *in vitro* através de diagrama de dispersão, com objetivo de comparar os resultados das variáveis dos quatro substratos e verificar seu comportamento conjunto, duas a duas.

As **Figuras 7, 8, 9, 10 e 11** mostram os diagramas de dispersões dos valores de cada variável dos substratos (cebola e rações controle e suplementada com cebola – 10% de frutanos) e da lactulose (padrão). Houve cruzamento de seis variáveis, duas a duas: AGCC x fermentabilidade; RNF x fermentabilidade; pressão x fermentabilidade; pH 24h x fermentabilidade e Δ pH x fermentabilidade.

Figura 7: Diagrama de dispersão da quantidade de AGCC em relação à fermentabilidade.

Figura 8: Diagrama de dispersão do peso do resíduo não-fermentado (RNF) em relação à fermentabilidade.

Figura 9: Diagrama de dispersão da pressão em relação à fermentabilidade.

Figura 10: Diagrama de dispersão do pH 24h em relação à fermentabilidade (%).

Figura 11: Diagrama de dispersão do ΔpH em relação à fermentabilidade (%).

As **Figuras 7, 8, 9, 10 e 11** mostram que há indícios de que existe diferença significativa entre os resultados da fermentação *in vitro* da ração controle e suplementada com cebola (10% de frutanos), pois não houve intersecção de observações encontradas em todas as variáveis.

Pela análise descritiva, há evidências de que quanto maior a fermentabilidade do substrato maior a quantidade de AGCC, pressão e ΔpH e menor o pH 24h e o RNF. Pôde-se observar, também, que a fermentabilidade da cebola e ração suplementada com cebola (10% de frutanos) se comportaram de forma semelhante.

De acordo com todos os parâmetros avaliados, a FI da ração suplementada com cebola (10% de frutanos) evidenciou ser mais fermentável do que a ração controle, em função dos distintos componentes, concentrações e comportamentos fermentativos das frações indigeríveis de cada substrato.

Os diversos carboidratos não-disponíveis possuem diferentes cinéticas de fermentação, ou seja, possuem velocidades de degradação distintas de acordo com sua estrutura físico-química. Em geral, as fibras

solúveis são facilmente fermentáveis e as insolúveis sofrem pouca ou nenhuma fermentação (DE FRANCISCO, 2005; SLAVIN, 2005; GOÑI; LÓPEZ-OLIVEIRA, 2006; WONG et al., 2006).

A ração controle teve praticamente carboidratos não-disponíveis insolúveis na sua FI (FAI pouco fermentável). Já a cebola e a ração suplementada com cebola (10% de frutanos) tiveram mistura de FII e FIS. Esse perfil de carboidratos justifica a maior fermentabilidade tanto da cebola (73,6%) como da ração suplementada com cebola (10% de frutanos) (73,7%), quando comparadas com a ração controle (40%) **(Tabelas 10 e 11)**.

A **Tabela 11** mostra que após 24h de fermentação todos os valores de pH diminuíram: cebola, de 6,9 para 6,4 ($\Delta\text{pH} = 0,5$); ração suplementada com cebola (10% de frutanos), de 6,9 para 6,5 ($\Delta\text{pH} = 0,4$) e ração controle, de 6,9 para 6,6 ($\Delta\text{pH} = 0,3$).

Com esses dados, observou-se que a cebola foi o substrato que teve maior redução do seu pH, seguida pelas rações suplementada com cebola (10% de frutanos) e controle. Essa característica está positivamente relacionada com a produção de AGCC, uma vez que quanto maior o ΔpH , maior a produção dos ácidos voláteis (SMIRICKY-TJARDES et al., 2003) e menor o RNF.

O controle da pressão é o parâmetro que indica produção de gases pela fermentação (SMIRICKY-TJARDES et al., 2003). De todas as amostras, a cebola teve maior pressão, seguida pelas rações suplementada com cebola (frutanos 10%) e controle **(Tabela 11)**. Portanto, verificou-se que a

ração suplementada com cebola (10% de frutanos) produziu mais gases que a controle, indicando maior fermentação.

De acordo com a literatura, a fermentação *in vitro* de diversos tipos de alimentos ou isolados de fibra fornece diferentes quantidades e proporções de AGCC. A produção total varia entre 0,4-14,2mmol de AGCC por grama, valor dependente do tipo de substrato (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

Bourquin, Titgemeyer e Fahey (1993, 1996) realizaram a fermentação *in vitro* de várias fibras (goma xantana, goma guar, goma arábica, goma karaya, pectina, amido resistente, etc) e hortaliças (brócolis, couve-flor, pepino, cebola, etc). Utilizaram como inóculo fezes humanas e verificaram que houve diferença na produção e proporção molar dos AGCC entre os diferentes substratos analisados. Nesse mesmo estudo, a fermentação do resíduo da fibra alimentar total da cebola forneceu 6,44mmol de AGCC/g substrato seco e 77%, 12% e 11% de acetato, propionato e butirato, respectivamente.

No presente trabalho, a fermentação *in vitro* da fração indigerível da cebola, utilizando-se como inóculo o conteúdo cecal de ratos, forneceu $2,8 \pm 0,11$ mmol de AGCC/g substrato seco e 68,3%, 13,5% e 18,2% de acetato, propionato e butirato, respectivamente (**Tabela 11 e 12**).

A proporção molar e concentração de AGCC, obtidas pela técnica de fermentação *in vitro*, foram distintas das encontradas por Bourquin, Titgemeyer e Fahey (1993). Essas diferenças nos resultados podem ser devido ao tipo de inóculo utilizado, que oferece cepas e concentrações de bactérias específicas (**Tabelas 11 e 12**).

Segundo a literatura, as diferenças quantitativas e/ou qualitativas encontradas nos diversos trabalhos de fermentação *in vitro* podem ser decorrentes de inúmeros fatores, entre eles os diferentes métodos, tipos de inóculo e meio de fermentação utilizado (MONSMA; MARLETT, 1995; BARRY et al., 1995).

De acordo com a **Tabela 12**, a proporção molar de acetato foi majoritária, seguida pelo propionato e butirato em todos os substratos fermentados.

As maiores proporções molares de acetato foram da ração controle e cebola. Quanto ao propionato, a cebola apresentou os menores valores (13,5%) e a ração suplementada com cebola (10% de frutanos) os maiores (18,9%). Já o butirato, as maiores proporções molares foram da cebola (18,2%), seguidas pelas rações suplementada com cebola (10% de frutanos) (17,8%) e controle (11,7%).

Em síntese, com a fermentação *in vitro* foi possível verificar previamente o comportamento dos substratos em relação ao perfil de AGCC, pH, pressão, RNF e fermentabilidade. Sendo que, tanto a cebola como a ração suplementada com cebola (10% de frutanos) mostraram alta fermentabilidade para os diversos parâmetros avaliados.

5.4 Ensaio biológico

5.4.1 Parâmetros nutricionais do primeiro ensaio biológico

A **Figura 12** mostra o crescimento dos animais dos três grupos: grupo controle (*ad libitum*), pareado (consumo controlado) e frutanos 10%.

Figura 12: Ganho de peso dos animais do grupo controle (*ad libitum*), pareado e frutanos 10%, ao longo do período experimental.

O peso médio dos animais, ao final do experimento, foi $272,0 \pm 23,48\text{g}$; $271,6 \pm 37,40\text{g}$ e $272,1 \pm 27,76\text{g}$ e o consumo diário médio de ração foi $17,9 \pm 0,94\text{g}$; $18,2 \pm 2,98\text{g}$ e $18,5 \pm 1,86\text{g}$, para os grupos controle, pareado e frutanos 10%, respectivamente.

Em relação ao consumo de ração, pôde-se observar que os grupos controle, pareado e frutanos 10% tiveram comportamentos estatisticamente iguais ao longo do ensaio biológico ($p < 0,05$).

A **Figura 12** mostra que o peso corporal médio dos animais aumentou de maneira homogênea ao longo do tempo, para os três grupos. As médias e as variabilidades dos pesos foram próximas. Com esses resultados, o grupo pareado não foi incluído na discussão, sendo considerados somente os resultados dos grupos controle e frutanos 10%.

A **Tabela 13** mostra os parâmetros nutricionais dos grupos controle e frutanos 10%. A presença da cebola, como ingrediente da ração, não afetou de forma significativa ($p < 0,05$) o crescimento dos animais durante o ensaio

biológico, refletindo-se, desse modo, em um coeficiente de eficácia alimentar (CEA) médio semelhante ao do grupo controle.

Tabela 13: Parâmetros nutricionais dos grupos controle e frutanos 10% (primeiro ensaio biológico)¹

Parâmetros	Grupo	
	Controle	Frutanos 10%
Peso inicial (g)	154,6±16,67 ^a	152,6±16,69 ^a
Peso final (g)	272,0±23,48 ^a	272,1±27,76 ^a
Ganho de peso (g)	117,4±26,47 ^a	119,4±24,30 ^a
Consumo de ração (g/dia)	17,9±0,94 ^a	18,5±1,86 ^a
CEA ²	0,2±0,02 ^a	0,2±0,05 ^a

¹Resultados expressos como média ± DP, n= 14; ²CEA (coeficiente de eficácia alimentar) que corresponde à relação entre o ganho de peso e o consumo de ração. Letras distintas em uma mesma linha indicam diferenças significantes (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Com relação ao peso médio dos órgãos (baço, rins e fígado), não foram observadas diferenças significantes (p<0,05). Todos apresentaram aspectos macroscópicos normais, tanto de formato quanto de coloração (Tabela 14).

Tabela 14: Peso dos órgãos dos grupos controle e frutanos 10% (primeiro ensaio biológico)¹

Órgãos (g/100g)	Grupo	
	Controle	Frutanos 10%
Fígado	3,7±0,38 ^a	3,4±0,45 ^a
Baço	0,3±0,04 ^a	0,2±0,03 ^a
Rins	0,9±0,16 ^a	0,8±0,05 ^a

¹Resultados expressos como média ± DP, n= 14; letras distintas em uma mesma linha indicam diferenças significantes (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

5.4.2 Parâmetros nutricionais do segundo ensaio biológico

A **Figura 13** mostra o crescimento dos animais dos três grupos: grupo controle (*ad libitum*), pareado (consumo controlado) e frutanos 10%.

Figura 13: Ganho de peso dos animais do grupo controle (*ad libitum*), pareado e frutanos 10%, ao longo do período experimental.

O peso médio dos animais, ao final do experimento, foi $293,2 \pm 11,40\text{g}$; $294,3 \pm 15,63\text{g}$ e $294,8 \pm 20,23\text{g}$ e o consumo diário médio de ração foi $19,9 \pm 0,64\text{g}$; $19,4 \pm 0,97\text{g}$ e $19,6 \pm 1,71\text{g}$ para os grupos controle, pareado e frutanos 10%, respectivamente.

O consumo de ração, peso corporal, curva de crescimento e peso dos órgãos dos animais dos grupos controle e frutanos 10%, do segundo ensaio biológico, também tiveram comportamentos estatisticamente iguais ($p < 0,05$) durante o experimento, como mostram as **Tabelas 15 e 16**.

Tabela 15: Parâmetros nutricionais dos grupos controle e frutanos 10% (segundo ensaio biológico)¹

Parâmetros	Grupo	
	Controle	Frutanos 10%
Peso inicial (g)	140,6±7,50 ^a	139,5±5,55 ^a
Peso final (g)	293,2±11,40 ^a	294,8±20,23 ^a
Ganho de peso (g)	152,6±11,08 ^a	155,3±22,70 ^a
Consumo de ração (g/dia)	19,9±0,64 ^a	19,6±1,71 ^a
CEA ²	0,2±0,02 ^a	0,2±0,01 ^a

¹Resultados expressos como média ± DP, n= 6; ²CEA (coeficiente de eficácia alimentar) que corresponde à relação entre o ganho de peso e o consumo de ração. Letras distintas em uma mesma linha indicam diferenças significantes (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Tabela 16: Peso dos órgãos dos grupos controle e frutanos 10% (segundo ensaio biológico)¹

Órgãos (g/100g)	Grupo	
	Controle	Frutanos 10%
Fígado	3,6±0,27 ^a	3,4±0,50 ^a
Baço	0,3±0,01 ^a	0,3±0,05 ^a
Rins	0,9±0,10 ^a	0,9±0,07 ^a

¹Resultados expressos como média e DP, n= 6; letras distintas em uma mesma linha indicam diferenças significantes (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

5.5 Parâmetros de fermentação *in vivo* de carboidratos não-disponíveis

Em decorrência da beta configuração do carbono C₂ entre as moléculas de frutose, que formam a ligação β(2-1), os frutanos (inulina e FOS) são resistentes à hidrólise pelas enzimas no intestino delgado. Alcançam o intestino grosso, onde são fermentados pela microbiota, promovendo alterações fisiológicas (VAN LOO et al., 1999; ROBERFROID, 2002; CAERS, 2005; ROBERFROID, 2005; PAK, 2006).

Os frutanos são considerados fibra alimentar solúvel, pois aumentam o peso do bolo fecal pelo aumento da biomassa, devido ao estímulo da atividade metabólica e do crescimento das bactérias intestinais pela fermentação (VAN LOO et al., 1999; CHERBUT, 2002; CAERS, 2005; ROBERFROID, 2005; PAK, 2006).

A **Tabela 17** e as **Figuras 14, 16, 18 e 19** mostram o peso úmido das fezes, a umidade das fezes e do conteúdo cecal e o pH dos grupos controle e frutanos 10%, respectivamente.

Tabela 17: Parâmetros intestinais dos grupos controle e frutanos 10%

Parâmetros intestinais¹	Grupos	
	Controle	Frutanos 10%
Peso úmido das fezes (g) ²	23,7±2,94 ^a	43,5±11,95 ^b
Umidade das fezes (%)	22,2±4,60 ^a	51,2±6,60 ^b
Umidade do conteúdo cecal (%)	68,9±2,47 ^a	85,4±0,90 ^b
pH do ceco	6,9±0,12 ^a	6,0±0,29 ^b
<i>Bulking index</i>	1,0±0,24	

¹Valores expressos como média ± DP; n=8; ²Peso das fezes (g) durante 10 dias de coleta (do 14.º ao 23.º dia de experimento) dos grupos controle e frutanos 10%; letras distintas em uma mesma linha indicam diferenças significantes (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Figura 14: Peso úmido das fezes (g/animal) durante 10 dias de coleta (do 14.º ao 23.º dia de experimento) dos grupos controle e frutanos 10%, n=14; valores expressos como média $\pm$ DP; (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Figura 15: Peso seco das fezes (g/animal) durante 10 dias de coleta (do 14.º ao 23.º dia de experimento) dos grupos controle e frutanos 10%, n=14; valores expressos como média $\pm$ DP; (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Figura 16: Umidade das fezes (%) durante 10 dias de coleta (do 14.º ao 23.º dia de experimento) dos grupos controle e frutanos 10%, n=14; valores expressos como média $\pm$ DP; (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Como pôde ser observado, houve aumento significativo no peso e umidade das fezes ($p < 0,05$) no grupo frutanos 10%, em relação ao controle **(Figuras 14 e 16)**. Não foram observados distúrbios gastrintestinais (diarréia) em ambos os grupos.

Kleessen, Hartmann e Blaut (2001) também verificaram aumento significativo na quantidade de massa fecal excretada em animais alimentados com 5% de inulina ou FOS.

Com relação ao peso seco das fezes, não foram observadas diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os grupos controle e frutanos 10%. Dessa forma, concluiu-se que o aumento do peso fecal foi devido à umidade **(Figura 17)**.

Figura 17: Contribuição absoluta de peso seco e umidade em fezes dos grupos controle e frutanos 10%

Embora os valores do peso seco das fezes tenham sido semelhantes para ambos os grupos, a composição podia ser diferente. Em geral, o peso seco de fezes, provenientes de dietas com fibras solúveis, é composto, principalmente, por bactérias mortas, devido à fermentação. Já em dietas com fibras insolúveis, é constituído por resíduos não metabolizados pelo intestino grosso (ARMSTRONG et al., 1993).

O parâmetro utilizado para avaliar o efeito de uma fibra alimentar no peso das fezes foi o *bulking index* (BI). O BI é variável dependendo do tipo de fibra, uma vez que está correlacionado com a fermentabilidade, solubilidade e grau de polimerização do substrato (NYMAN, 2002).

O BI para os diversos tipos de fibras (pectina, gomas, frutanos, amido resistente, etc) varia de maneira significativa dependendo da dose fornecida, do tempo de experimento e do modelo utilizado (humanos ou

animais) (NYMAN, 2002). Roberfroid, Gibson e Delzenne (1993) verificaram, *in vivo*, que o consumo de 10% de inulina ou FOS provocou BI de 1,2 e 1,1, respectivamente.

O presente estudo mostrou que o grupo frutanos 10% teve BI médio de $1,0 \pm 0,24$, ou seja, cada 1g de frutanos ingerido aumentou, em média, 1g de fezes.

Outra característica dos carboidratos não-disponíveis é sua permanência no quimo do intestino delgado, interferindo na pressão osmótica e no fluxo de água para o lúmen intestinal. Portanto, a presença desses compostos no intestino contribui para aumentar a osmolaridade do meio (VAN LOO et al., 1999).

No presente estudo, verificou-se que o consumo de 10% de frutanos aumentou de maneira significativa ($p < 0,05$) a umidade do conteúdo cecal, devido ao acréscimo da osmolaridade provocado pelos frutanos, que deslocaram muita água do íleo para o ceco (**Figura 18**).

Figura 18: Umidade do conteúdo cecal (%) dos grupos controle e frutanos 10%, n=8; valores expressos como média $\pm$ DP; (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

O maior local de fermentação em espécies não-ruminantes é o ceco (LE BLAY et al., 1999). Portanto, esse compartimento do intestino grosso foi o principal foco de estudos para avaliação dos parâmetros fermentativos e histológicos, após o consumo de 10% de frutanos.

Os produtos mais importantes da fermentação colônica dos prebióticos (inulina e FOS) são os AGCC, os gases e a massa celular bacteriana (CUMMINGS; MACFARLANE, 2002; ROBERFROID, 2005; WONG et al., 2006).

A microbiota do intestino grosso converte os carboidratos não-disponíveis à AGCC por rotas metabólicas específicas. O aumento na produção de AGCC leva ao decréscimo do pH colônico, que pode estimular a absorção de minerais e o fluxo sangüíneo e inibir a proliferação de microrganismos patogênicos (KLEESSEN; HARTMANN; BLAUT, 2001; NYMAN, 2002; WONG et al., 2006; LAMBO-FODJE; OSTE; NYMAN, 2006).

Várias pesquisas *in vivo* verificaram que os frutanos, em concentrações e tempos de ensaio variados, diminuíram o pH colônico, considerado indicativo de fermentação (LEVRAT et al., 1991; YOUNES et al., 1993; ROLAND et al., 1995; CAMPBELL et al., 1997; LE BLAY, 1999; KLEESSEN; HARTMANN; BLAUT, 2001; VERGHESE et al., 2002; ZDUNCZYK; JUSKIEWCZ; ESTRELLA, 2006; LOBO; COLLI; FILISETTI, 2006; WONG et al., 2006; SCHOLTENS et al., 2006; SABBOH et al., 2006).

O presente estudo mostrou que houve redução significativa ($p < 0,05$) no pH cecal do grupo frutanos 10% em relação ao controle, passando de $6,9 \pm 0,12$ para $6,0 \pm 0,29$ (**Figura 19**).

Figura 19: pH do ceco dos grupos controle e frutanos 10%, n=8; valores expressos como média ± DP; (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Le Blay et al. (1999) realizaram ensaio com ratos, oferecendo 9% de FOS, e verificaram que o pH do ceco, durante as duas primeiras semanas, foi 7,5 e 5,6 para os grupos controle e suplementado com 9% de FOS, respectivamente.

Kleessen, Hartmann e Blaut (2001) também conduziram experimentos com ratos, mas ofereceram para cada grupo doses mais reduzidas de frutanos, contendo ou 5% de inulina ou FOS ou *mix* de inulina e FOS. Obtiveram, em média, pH cecal de 6,4 e 5,9 para os grupos controle e suplementado com frutanos, respectivamente.

Levrat, Rémésy e Demigné (1991) evidenciaram os efeitos de doses crescentes de inulina em alguns parâmetros fermentativos. Eles observaram que os frutanos diminuíram de maneira significativa o pH do ceco à medida que a concentração de inulina aumentava.

Vários autores, realizando ensaios com animais, verificaram também aumento significativo na produção de AGCC após o consumo de carboidratos não-disponíveis e fermentáveis (frutanos, amido resistente, pectinas, etc), em diversas proporções e durações de ensaio (YOUNES et al., 1993; LEVRAT; RÉMÉSY, DEMIGNÉ, 1991; CAMPBELL et al., 1997; SAKATA, 1987; BERGGREN et al., 1993; MORITA et al., 1998; LE BLAY et al., 1999; HENNINGSSON; BJOROH; NYMAN, 2002; LUPTON; KURTZ, 1993; KEY et al., 1996; KLEESSEN; HARTMANN; BLAUT, 2001; ROLAND et al., 1995; POULSEN et al., 2002; LE LEU, 2005; LAMBO-FODJE; OSTE; NYMAN, 2006).

Os resultados da análise dos AGCC no conteúdo cecal de ratos foram expressos em mg/g conteúdo cecal e $\mu\text{mol/g}$ conteúdo cecal, como mostra a **Tabela 18**.

Houve aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração dos AGCC totais (2,9 vezes), bem como aumento de acetato, propionato e butirato no grupo frutanos 10% comparado ao controle (**Figura 20 e Tabela 18**).

Com relação à proporção molar, o acetato foi o metabólito majoritário, seguido pelo butirato e propionato, para ambos os grupos experimentais. Verificou-se que a proporção molar de acetato do grupo controle foi maior que a do grupo frutanos 10% e a proporção de propionato do grupo frutanos 10% foi maior que o grupo controle. Em relação ao butirato, não foram encontradas diferenças significantes ($p < 0,05$) entre as proporções molares (**Figura 21 e Tabela 19**).

Todos esses dados corroboraram com os resultados observados na fermentação *in vitro*, que mostrou alta fermentabilidade.

Tabela 18: Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos *in vivo* no ceco dos grupos controle e frutanos 10%¹

AGCC	Controle		Frutanos 10%	
	mg/g conteúdo cecal	umol/g conteúdo cecal	mg/g conteúdo cecal	umol/g conteúdo cecal
AC	2,9±1,18 ^a	48,0±19,71 ^a	5,8±1,56 ^b	96,4±25,96 ^b
PROP	0,7±0,40 ^a	9,6±5,47 ^a	3,1±0,60 ^b	42,0±8,05 ^b
BUT	1,1±0,36 ^a	12,4±4,05 ^a	5,6±1,79 ^b	64,3±20,36 ^b
Total	4,7±1,57 ^a	70,1±24,27 ^a	14,6±2,99 ^b	202,8±41,40 ^b

¹n= 8; valores expressos como média ± DP; letras distintas em uma mesma linha indicam diferenças significantes (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student); AC (acetato); PROP (propionato); BUT (butirato).

Figura 20: Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (µmol/g) do conteúdo cecal dos grupos controle e frutanos 10%, n=8; valores expressos como média ± DP; (*) indica diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Figura 21: Proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (%) do conteúdo cecal dos grupos controle e frutanos 10%, n=8; valores expressos como média ± DP; (*) indica diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Tabela 19: Proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (%) produzidos no ceco dos grupos controle e frutanos 10%¹

Grupo	Proporção molar de AGCC (%)		
	Acetato	Propionato	Butirato
Controle	68±8,71 ^a	14±7,21 ^a	19±6,48 ^a
Frutanos 10%	47±8,08 ^b	21±2,63 ^b	32±7,93 ^a

¹n=8; valores expressos como média ± DP; letras distintas em uma mesma coluna indicam diferenças significantes (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Le Blay (1999) ofereceu 9% de FOS para ratos durante oito semanas e obteve aumento significativo de AGCC no grupo que recebeu frutanos, em relação ao controle.

Henningsson, Bjorch e Nyman (2002) estudaram *in vivo* a fermentação de diversos tipos de fibras. Ofereceram 10% de carboidratos não-disponíveis durante 13 dias e verificaram que houve aumento

significante na produção de AGCC no grupo que consumiu ração rica em substratos fermentativos.

Roland et al. (1995) realizaram estudo durante oito semanas com ratos *germ free*, com flora de fezes humanas nos animais, oferecendo dietas contendo 10% de fibras (inulina, aveia, farelo de trigo, etc). Os animais que consumiram apenas inulina (10%) produziram $55,8 \pm 2,69 \mu\text{mol}$ AGCC/g de conteúdo cecal e o perfil de AGCC foi 56:15:27 para acetato, propionato e butirato, respectivamente.

A quantidade e o padrão de AGCC na fermentação são dependentes do tipo de carboidrato disponível e, também, da microbiota residente (POULSEN et al., 2002; PAK, 2006; LAMBO-FODJE; OSTE; NYMAN, 2006). A fermentação dos frutanos é caracterizada por redução na produção de acetato e aumento na produção de propionato e butirato. Esse perfil de fermentação parece ser específico para frutanos (LEVRAT; RÉMÉSY; DEMIGNÉ, 1991; LAMBO-FODJE; OSTE; NYMAN, 2006).

Corroborando com o presente estudo, Campbell et al. (1997) demonstraram que 6% de FOS elevaram o *pool* de AGCC no ceco, em relação ao grupo controle. O AGCC majoritário foi o acetato, seguido pelo butirato e propionato. O butirato aumentou de maneira significativa no grupo que consumiu FOS.

Berggren et al. (1993) realizaram um estudo com ratos, utilizando 10 tipos de fibras. Analisaram o comportamento fermentativo de todos os substratos e a contribuição individual de cada AGCC mudou dependendo do tipo de fibra. A proporção de AGCC (acetato:propionato:butirato) foi

72:21:4, 79:13:7 e 61:13:22 para os grupos controle, pectina e *neosugar* (FOS), respectivamente.

As **Figuras 22, 23 e 24** mostram o diagrama de dispersão entre três variáveis, duas a duas: quantidade total de AGCC x pH do ceco, peso da parede do ceco x pH e peso da parede do ceco e quantidade de AGCC.

Figura 22: Diagrama de dispersão do pH do ceco em relação à quantidade total de AGCC dos grupos controle e frutanos 10%.

Figura 23: Diagrama de dispersão do pH em relação ao peso da parede do ceco dos grupos controle e frutanos 10%.

Figura 24: Diagrama de dispersão dos AGCC em relação ao peso da parede do ceco, dos grupos controle e frutanos 10%.

Pôde-se observar pelas **Figuras 22, 23 e 24** que quanto maior a concentração de AGCC, maior o peso da parede do ceco e menor o pH. Essa análise descritiva corroborou com a inferencial, pois os dados não se cruzaram, evidenciando diferença significativa entre os grupos controle e frutanos 10%. A **Figura 24** indica o efeito trófico dos AGCC, em virtude do aumento da parede do ceco promovido pela presença desses ácidos.

A **Tabela 20** mostra as proporções molares dos AGCC obtidas pela técnica de fermentação *in vitro* e *in vivo*.

Para comparação da proporção molar dos AGCC *in vitro* e *in vivo*, foi feita a fermentação *in vitro* das FI da cebola e das rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos) utilizados no primeiro ensaio biológico.

Tabela 20: Proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos pela fermentação *in vitro* e *in vivo*

Substrato	Proporção molar de AGCC <i>in vitro</i> (%) ¹		
	Acetato	Propionato	Butirato
RC	71,6±0,30	16,7±0,28	11,7±0,29
RF	63,3±1,13	18,9±1,26	17,8±0,34

Grupo	Proporção molar de AGCC <i>in vivo</i> (%) ¹		
	Acetato	Propionato	Butirato
Controle	68±8,71	14±7,21	19±6,48
Frutanos 10%	47±8,08	21±2,63	32±7,93

¹Proporção molar de cada AGCC em relação à soma da produção de acetato, propionato e butirato; resultados expressos como média ± DP; n=3 para fermentação *in vitro* e n=8 para fermentação *in vivo*; RC (Ração controle) e RF (Ração suplementada com cebola – 10% de frutanos) do primeiro ensaio biológico.

Comparando-se as proporções molares dos AGCC na fermentação *in vitro* com a *in vivo* (**Tabela 20**), nota-se que para os dois modelos o acetato foi novamente o AGCC majoritário. Com a adição de cebola, que forneceu frutanos a 10%, houve aumento das proporções molares do propionato e do butirato para ambos os modelos. Entretanto, o aumento na proporção molar de butirato na fermentação *in vivo* não foi significante ($p<0,05$).

Os resultados de AGCC em proporção molar são os melhores indicadores de mudanças no perfil de fermentação do que seus valores brutos quantificados. Isso porque mais de 95% desses ácidos são rapidamente absorvidos pelo cólon (MUIR et al., 2004; SCHEPPACH et al., 1995; NOAKES et al., 1996).

Em síntese, com a fermentação *in vivo* foi possível verificar que o consumo de cebola, que forneceu 10% de frutanos, alterou de maneira significativa alguns parâmetros fermentativos de carboidratos não-disponíveis. Corroborou com o modelo *in vitro*, pois também diminuiu o pH, alterou qualitativa e quantitativamente o perfil de AGCC e evidenciou que os frutanos são substratos fermentáveis e butirogênicos.

5.6 Análises macroscópicas e microscópicas do ceco e cólon

Os carboidratos não-disponíveis e fermentáveis exercem seus efeitos fisiológicos no intestino grosso por inúmeros mecanismos. Sabe-se que a nutrição parenteral e enteral sem fibras levam à atrofia da mucosa do intestino grosso. Quando se restitui dieta oral ou enteral com fibras, a atrofia é revertida, indicando que a presença de alimentos no cólon é obrigatória para manter a massa celular funcional (WASAN; GOODLAD, 1996; TAPPENDEN; McBURNEY, 1998; WONG; WRIGHT, 1999; SENGUPTA et al., 2002; WONG; GIBSON, 2003).

No intestino grosso os carboidratos não-disponíveis e fermentáveis exercem papel importante no desenvolvimento da mucosa e essa característica tem sido atribuída aos AGCC produzidos a partir da sua fermentação (SAKATA, 1995; ROBERFROID, 2005; WONG et al., 2006).

Diversos autores observaram aumento do peso do ceco após o consumo de frutanos ou de outros carboidratos não-disponíveis e fermentáveis (LEVRAT; RÉMÉSY; DEMIGNÉ, 1991; CAMPBELL et al., 1997; LE BLAY et al., 1999; PAJARI et al., 2000; KLEESSEN; HARTMANN; BLAUT, 2001; VERGHESE et al., 2002; DRZIKOVAL; DONGOWSKI; GEBHARDT,

2005; ZDUNCZYK; JUSKIEWCZ; ESTRELLA, 2006; LOBO; COLLI; FILISETTI, 2006; Lobo et al., 2007; SABBOH et al., 2006).

A diminuição do pH e o aumento do peso do ceco são parâmetros macroscópicos que indicam a produção de AGCC e a proliferação celular, respectivamente, mostrando indiretamente a fermentação dos carboidratos não-disponíveis no intestino grosso. A **Tabela 21** mostra os parâmetros intestinais no ceco dos grupos controle e frutanos 10%.

Tabela 21: Parâmetros intestinais no ceco dos grupos controle e frutanos 10%¹

Parâmetros intestinais (g/100g de animal) ¹	Grupo	
	Controle	Frutanos 10%
Peso total (parede + conteúdo cecal)	1,5±0,25 ^a	5,1±1,17 ^b
Peso da parede do ceco	0,3±0,03 ^a	0,8±0,06 ^b
Peso do conteúdo cecal	1,2±0,23 ^a	4,3±1,12 ^b

¹n=8; valores expressos como média ± DP; letras distintas em uma mesma linha indicam diferenças significantes (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Figura 25: Peso total, peso do conteúdo e peso da parede do ceco (g/100g animal) dos grupos controle e frutanos 10%, n=8; valores expressos como média ± DP; (*) indica diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

O peso total, conteúdo e parede do ceco do grupo frutanos 10% tiveram aumentos significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle (**Tabela 21** e **Figura 25**). O ceco do grupo frutanos 10% aumentou, aproximadamente, 2,5 vezes o seu tamanho e esse efeito trófico pode estar associado à fermentação. O aumento do metabolismo bacteriano, a redução do pH e o aumento da concentração dos AGCC, principalmente o butirato, estimulam a proliferação celular dos colonócitos normais (YOUNES et al., 1993; FOLINO; MCINTYRE; YOUNG, 1995; CAMPBELL et al., 1997; KLEESSEN; HARTMANN; BLAUT, 2001; NAITO et al., 2005; LE LEU, 2005; LOBO et al., 2007).

A **Figura 26** mostra o efeito trófico no ceco dos grupos controle e frutanos 10%.

Figura 26: Ceco de rato alimentado com ração controle (**foto A**) e suplementada com cebola (10% de frutanos) (**foto B**).

Há na literatura alguns trabalhos que analisaram o efeito trófico no intestino grosso após o consumo de frutanos e/ou outros carboidratos não-disponíveis e fermentáveis (SAKATA, 1987; SAKATA, 1995; FOLINO; MCINTYRE; YOUNG, 1995; KEY et al., 1996; HOWARD et al., 1995; WONG;

GIBSON, 2003; KLEESSEN; HARTMANN; BLAUT, 2003; McCULLOUGH et al., 1998; COMALADA et al., 2006; Lobo et al., 2007).

A análise morfométrica do intestino grosso é o parâmetro que indica se há efeito trófico. Essa característica é avaliada pelo tamanho e bifurcação das criptas (McCULLOUGH et al., 1998).

As **Figuras 27, 28, 29, 30, 31** e a **Tabela 22** mostram, microscopicamente, o efeito trófico no ceco através da morfometria e da proliferação celular.

Figura 27: Profundidade das criptas do ceco (células/hemi-cripta) (20x) dos grupos controle e frutanos 10%, n=6; valores expressos como média $\pm$ DP; (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Figura 28: Índice de bifurcação do ceco (%) (20x) dos grupos controle e frutanos 10%, n=6; valores expressos como média $\pm$ DP; (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Figura 29: Índice metafásico do ceco (%) (100x) dos grupos controle e frutanos 10%, n=6; valores expressos como média $\pm$ DP; (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student). Região da cripta: 60% - basal e 40% - apical.

Tabela 22: Parâmetros histológicos do ceco dos grupos controle e frutanos 10%¹

Parâmetros histológicos	Grupo	
	Controle	Frutanos 10%
Altura das criptas do ceco (número de células/hemi-cripta) (20x)	25,5±1,24 ^a	34,0±1,84 ^b
Índice de bifurcação do ceco (20x)	2,4±0,48 ^a	4,9±0,80 ^b
Índice metafásico do ceco (%) (100x)	5,6±0,75 ^a	7,1±1,38 ^b
Índice metafásico do ceco (%) no compartimento basal – 60% da cripta (100x)	5,5±0,90 ^a	7,0±1,38 ^b
Metáfases (%) no compartimento basal	98,05%	98,32%
Índice metafásico do ceco (%) no compartimento apical – 40% da cripta (100x)	0,1±0,02 ^a	0,1±0,09 ^a
Metáfases (%) no compartimento apical	1,95%	1,68%

¹valores expressos como média ± DP, n=6; letras distintas em uma mesma linha indicam diferenças significantes (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste “t” de Student).

Como mostra a **Tabela 22**, houve aumento significativo (p<0,05) na altura das criptas, no índice de bifurcação e no índice metafásico do ceco do grupo frutanos 10% em relação ao controle.

Figura 30: Índice metafásico médio (%) (n=6) em relação à posição da célula na cripta do ceco do grupo controle. (0 = base da cripta).

Figura 31: Índice metafásico médio (%) (n=6) em relação à posição da célula na cripta do ceco do grupo frutanos 10%. (0 = base da cripta).

Basicamente, a cebola contém FOS, que são frutanos de baixo peso molecular e altamente fermentáveis nas partes proximais do intestino grosso (VAN LOO, 1995; COXAM, 2005; ROBERFROID, 2005). Como o rato é ceco-fermentador e a ração oferecida para o grupo frutanos 10% continha

FOS, a fermentação *in vivo* e todos os seus efeitos metabólicos ocorreram, principalmente, nessa região.

A importância de estudar a localização da proliferação celular nas criptas é devido às características diferenciadas dos seus diversos compartimentos. As regiões basais das criptas são zonas proliferativas e as apicais são responsáveis pela diferenciação e morte celular (SCHEPPACH et al., 1995; GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006).

Se ocorrer proliferação celular exacerbada na região apical da cripta (40%) pode ocasionar crescimento maligno. No presente estudo, a realização do índice metafásico foi importante para caracterizar diferenças quanto à distribuição da proliferação celular nas porções basais (60%) e luminais (40%) das criptas do intestino grosso (ceco e cólon) e como se comportou após a adição de cebola, que forneceu 10% de frutanos.

A **Figura 29** e a **Tabela 22** mostram que o ceco dos grupos controle e frutanos 10% tiveram, aproximadamente, 98% das mitoses na região basal e 2% na região apical, próxima ao lúmen. Portanto, a proliferação celular esteve concentrada na base da cripta, onde se encontram colonócitos normais e células indiferenciadas. Esse comportamento foi encontrado, também, por Perrim et al. (2001).

As **Figuras 30** e **31** mostram as distribuições das metáfases ao longo das criptas do ceco. As criptas do ceco do grupo controle e frutanos 10% continham, em média, $23,5 \pm 1,87$ e $28,28 \pm 1,68$ posições, respectivamente. Corroborando com a **Figura 29**, a maioria das mitoses (metáfases) do ceco ocorreu na parte basal, entre as posições 4 a 10.

As **Figuras 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e 39** ilustram o efeito trófico dos frutanos no ceco, comparado com o controle.

Figura 32: Corte histológico da região do ceco do grupo controle. Foto demonstrativa das criptas. Coloração H&E. Objetiva 40x.

Figura 33: Corte histológico da região do ceco do grupo frutanos 10%. Foto demonstrativa das criptas. Coloração H&E. Objetiva 20x.

Figura 34: Corte histológico da região do ceco do grupo controle. A seta indica uma cripta em bifurcação. Coloração H&E. Objetiva 40x.

Figura 35: Corte histológico da região do ceco do grupo frutanos 10%. A seta indica uma cripta em bifurcação. Coloração H&E. Objetiva 40x.

Figura 36: Corte histológico da região do ceco do grupo controle. Coloração PAS. Objetiva 40x.

Figura 37: Corte histológico da região do ceco do grupo frutanos 10%. Coloração PAS. Objetiva 40x.

Figura 38: Corte histológico da região do ceco do grupo controle. Foto demonstrativa de criptas com células em metáfase. Coloração H&E. Objetiva 40x.

Figura 39: Corte histológico da região do ceco do grupo frutanos 10%. Foto demonstrativa de criptas com células em metáfase. Coloração H&E. Objetiva 40x.

A **Tabela 23** e as **Figuras 40, 41, 42, 43 e 44** mostram, microscopicamente, o efeito trófico no cólon através da morfometria e da proliferação celular.

Tabela 23: Parâmetros histológicos do cólon dos grupos controle e frutanos 10%¹

Parâmetros histológicos	Grupo	
	Controle	Frutanos 10%
Altura das criptas do cólon (número de células/hemi-cripta) (20x)	20,1±3,63 ^a	25,5±2,22 ^a
Índice de bifurcação do cólon (40x)	27,3±8,97 ^a	30,4±10,88 ^a
Índice metafásico do cólon (%) (100x)	4,7±0,79 ^a	4,1±0,60 ^a
Índice metafásico do cólon (%) no compartimento basal – 60% da cripta (100x)	3,9±0,59 ^a	3,5±0,50 ^a
Metáfases (%) no compartimento basal	82,98%	85,37%
Índice metafásico do cólon (%) no compartimento apical – 40% da cripta (100x)	0,8±0,56 ^a	0,6±0,45 ^a
Metáfases (%) no compartimento apical	17,02%	14,63%

¹valores expressos como média ± DP, n=6; letras distintas em uma mesma linha indicam diferenças significantes (p<0,05) em relação ao grupo controle (teste “t” de Student).

Figura 40: Profundidade das criptas do cólon (células/hemi-cripta) (20x) dos grupos controle e frutanos 10%, n=6; valores expressos como média $\pm$ DP; (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Figura 41: Índice de bifurcação do cólon (%) (40x) dos grupos controle e frutanos 10%, n=6; valores expressos como média $\pm$ DP; (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student).

Figura 42: Índice metafásico do cólon (%) (100x) dos grupos controle e frutanos 10%, n=6; valores expressos como média $\pm$ DP; (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste "t" de Student). Região da cripta: 60% - basal e 40% - apical.

Figura 43: Índice metafásico médio (%) (n=6) em relação à posição da célula na cripta do cólon do grupo controle (0 = base da cripta).

Figura 44: Índice metafásico médio (%) (n=6) em relação à posição da célula na cripta do cólon do grupo frutanos 10% (0 = base da cripta).

No cólon, não houve diferenças significantes ($p < 0,05$) na altura das criptas, no índice de bifurcação e índice metafásico dos grupos controle em relação ao frutanos 10%.

As criptas do cólon, para ambos os grupos, apresentaram o número de posição celular estatisticamente menor ($p < 0,05$) em relação ao do ceco. O cólon apresentou $21,0 \pm 3,10$ e $23,7 \pm 2,35$ posições no grupo controle e frutanos 10%, respectivamente. Estes valores não tiveram diferenças significantes ($p < 0,05$), mostrando que essa região do intestino grosso não apresentou efeito trófico após a ingestão de frutanos.

As **Figuras 43 e 44** mostram que as criptas do cólon dos grupos controle e frutanos 10% tiveram comportamentos semelhantes. As mitoses ocorreram predominantemente na região basal, entre as posições 7 a 11.

As **Figuras 45, 46, 47, 48, 49 e 50** ilustram o efeito trófico dos frutanos no cólon, comparado com o controle.

Figura 45: Corte histológico da região do cólon do grupo controle. Foto demonstrativa de uma cripta em bifurcação. Coloração H&E. Objetiva 40x.

Figura 46: Corte histológico da região do cólon do grupo frutanos 10%. A seta indica uma cripta em bifurcação. Coloração H&E. Objetiva 40x.

Figura 47: Corte histológico da região do cólon do grupo controle. Coloração PAS. Objetiva 40x.

Figura 48: Corte histológico da região do cólon do grupo frutanos 10%. Coloração PAS. Objetiva 40x.

Figura 49: Corte histológico da região do cólon do grupo controle. Foto demonstrativa de criptas com células em metáfase. Coloração H&E. Objetiva 40x.

Figura 50: Corte histológico da região do cólon do grupo frutanos 10%. Foto demonstrativa de criptas com células em metáfase. Coloração H&E. Objetiva 40x.

Analisando-se as **Tabelas 22 e 23** e as **Figuras 27, 28, 29, 30, 31, 40, 41, 42, 43 e 44**, notou-se que o ceco e cólon tiveram comportamentos distintos. Por meio da análise das modificações morfométricas e proliferativas para ambos os grupos, pôde-se perceber que o ceco do grupo frutanos 10% teve efeito trófico, comparado com o controle. Contudo, o cólon não obteve a mesma resposta.

Portanto, o comportamento distinto entre os dois compartimentos colônicos pode ser devido à fermentação dos frutanos da cebola ter ocorrido principalmente no ceco e ter chegado ao cólon pouco substrato fermentativo que fornecesse metabólitos capazes de estimular seu crescimento.

O consumo de frutanos e a microbiota podem, também, alterar a produção e o tipo de mucina no intestino grosso (KLEESSEN; HARTMANN; BLAUT, 2003). A camada de muco tem a função de proteção e lubrificação do epitélio colônico (DePLANCKE; GASKINS, 2001; KLEESSEN; HARTMANN; BLAUT, 2003). As mucinas são glicoproteínas que conferem viscosidade ao muco, secretadas pelas células caliciformes. Estas células podem ser originadas a partir de células indiferenciadas, situadas na região basal das criptas (SPECIAN; OLIVER, 1991).

As mucinas são classificadas em neutras e ácidas, sendo estas últimas divididas em sulfatadas (sulfomucinas) e não-sulfatadas (sialomucinas). As mucinas ácidas são expressas ao longo do tubo digestório, com predomínio no intestino grosso, e proporcionam maior capacidade de proteção contra a translocação bacteriana (DePLANCKE; GASKINS, 2001).

A fermentação dos frutanos diminui o pH do cólon, que pode inibir o crescimento de bactérias patogênicas. Por outro lado, o pronunciado decréscimo da acidez colônica, em resposta à intensa fermentação, pode ser prejudicial à mucosa intestinal (RÉMÉSY et al., 1993; DEMIGNÉ et al., 1995; BOVEE-OUDEHNOVEN et al., 2003). Como consequência à condição ácida, as células caliciformes são estimuladas a produzir muco (BOVEE-OUDEHNOVEN et al., 2003).

No presente estudo, houve indícios que o consumo de frutanos aumentou também o número de células caliciformes no ceco, como mostrado nas **Figuras 36 e 37**. No cólon, não ocorreu diferenças entre os grupos (**Figuras 47 e 48**).

Os resultados *in vivo* no intestino grosso (ceco e cólon) podem também ser explicados pelos resultados obtidos *in vitro*, através da análise da quantidade de substratos disponíveis para a fermentação.

A ração suplementada com cebola continha FOS (10%), fração indigerível solúvel (14,9%) e insolúvel (9,9%), fornecendo apenas 26,5% de resíduo não-fermentado. Contudo, na ração controle foi adicionado apenas celulose como fonte de fibra alimentar, que é insolúvel, de alto peso molecular e de baixa fermentabilidade, justificando um RNF de 60,3%. Portanto, havia pouco substrato fermentativo no cólon para ambos os grupos experimentais. No grupo frutanos 10% devido à metabolização dos FOS no ceco e no controle à grande quantidade de celulose, carboidrato não-disponível e pouco fermentado.

A proliferação celular no cólon, em ambos os grupos, teve comportamento diferente em comparação ao ceco. O grupo controle

apresentou 82,98% das mitoses na região basal e 17,02% na apical. No entanto, no grupo frutanos 10% teve 85,37% das mitoses ocorridas na parte basal e 14,63% na apical. Pôde-se perceber que o consumo de frutanos reduziu a ocorrência de mitoses na região apical da cripta do cólon, porém esta diminuição não foi significativa (**Figura 42**).

O efeito trófico no intestino grosso dos animais que consumiram frutanos foi evidente. Segundo McCullough et al. (1998) embora o processo ainda seja pouco conhecido, a produção de novas criptas através da bifurcação pode ser considerada uma maneira complementar para o controle da massa tecidual no intestino.

A alteração morfométrica e proliferativa do ceco e cólon do presente trabalho corroboraram com outros estudos similares (JOHNSON; GEE, 1986; SAKATA, 1987; FLEMING; KORUDA et al., 1988; KRIPKE et al., 1989; FITCH; VRIES, 1992; LUPTON; KURTZ, 1993; FRANKEL et al., 1994; FOLINO; MCINTYRE; YOUNG, 1995; HOWARD et al., 1995; HOWARD et al., 1995; KEY; McCLEAN; MATHERS, 1996; BASSON et al., 1996; ICHIKAWA; SAKATA, 1998; TAPPENDEN; McBURNEY, 1998; McCULLOUGH et al., 1998; GIBSON et al., 1999; PERRIN et al., 2001; SENGUPTA et al., 2002, WONG; GIBSON, 2003; KLEESSEN; HARTMANN; BLAUT, 2003; LE LEU et al., 2003; LE LEU, 2005; COMALADA et al., 2006; Lobo et al., 2007).

Essas mudanças tróficas no intestino grosso foram indicadas indiretamente pelo aumento do peso do ceco e formação de AGCC, principalmente butirato (KORUDA et al., 1988; KRIPKE et al., 1989; LUPTON; KURTZ, 1993; FRANKEL et al., 1994; FOLINO; MCINTYRE; YOUNG, 1995; MCINTYRE; YOUNG, 1995; LE LEU, 2005; Lobo et al., 2007).

No presente estudo, a proliferação celular aconteceu principalmente na porção basal da cripta. Alguns pesquisadores defendem que o estímulo à proliferação nessa região é fisiológico (SCHEPPACH et al., 1995).

Há inúmeros e inquestionáveis benefícios das fibras alimentares no intestino grosso (GUILLON; CHAMP, 2000; CHAMP et al., 2003; FILISETTI; LOBO, 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre o papel da fissão das criptas e o estímulo exacerbado à proliferação celular em colonócitos normais como resposta ao grande consumo de carboidratos não-disponíveis e fermentáveis (GOODLAD; ENGLYST, 2001).

A hipótese de que o aumento na ingestão de fibras diminui o risco de desenvolver câncer no intestino grosso é bem documentada na literatura, porém há outros estudos que não encontram tal correlação (BARON, 2005).

Por exemplo, alguns trabalhos epidemiológicos bem conduzidos não conseguiram concluir que a ingestão de fibras diminui o risco de desenvolver câncer de cólon (BEYER et al., 2003; FUCHS et al., 1999; PARK et al., 2005; BARON, 2005), enquanto outros encontraram correlação (BEYER et al., 2003; BINGHAM et al., 2003; BARON, 2005). Bingham et al. (2003) realizaram estudo observacional e prospectivo, mostrando que o aumento no consumo de fibras alimentares estava associado à redução de 25% no risco de neoplasias de cólon.

O ceco e o cólon são estruturas diferenciadas, porém fazem parte do intestino grosso. O presente trabalho mostrou que a contribuição, em porcentagem média, da proliferação celular no compartimento basal das criptas é maior no ceco (98,2%) do que no cólon (84,2%) (**Tabelas 22 e 23**).

McCullough et al. (1998) realizaram estudo com ratos e ofereceram dieta elementar sem fibras e acrescida de 30% de fibras alimentares solúveis, durante duas semanas. Eles analisaram a morfometria de vários tecidos, incluindo o cólon proximal. A análise morfométrica mostrou que houve aumento significativo no número de criptas bifurcadas no grupo que consumiu dieta elementar suplementada com fibras em relação ao controle.

Lupton e Kurtz (1993) realizaram estudo com ratos, verificando a relação entre a produção de AGCC, pH e morfometria celular. Utilizaram pectina como fonte de carboidrato não-disponível e fermentável. A dieta suplementada com pectina provocou aumento significativo na altura das criptas do ceco, passando de 24,7 células/hemi-cripta para 28,6 células/hemi-cripta, no grupo controle e suplementado com pectina, respectivamente.

Perrin et al. (2001) realizaram estudo com ratos adultos durante quatro semanas. Suplementaram a ração com 6% de FOS e verificaram a profundidade da cripta do ceco e do cólon. Apenas as criptas do ceco do grupo que consumiu frutanos aumentaram de maneira significativa em relação ao controle, passando de 143 μ m para 162 μ m.

Lobo et al. (2007) estudaram o efeito dos FOS (5% e 7,5%) do yacon sobre a morfometria do ceco de ratos. Observaram que aumentando a concentração de FOS a 0%, 5% e 7,5% houve impacto significativo ($p < 0,05$) na altura e bifurcação das criptas nos animais que consumiram 7,5% de FOS em relação ao grupo controle e 5% de FOS. Os dados indicaram que o consumo de 5% de FOS, durante 30 dias, não alterou os parâmetros morfométricos já citados.

Kleessen, Hartmann e Blaut (2003) observaram aumento significativo na camada de muco, quantidade de células caliciformes e de mucinas ácidas nas regiões do jejuno e cólon distal em resposta ao consumo de frutanos.

Com os resultados do presente estudo, ficou evidente que os frutanos provocaram mudanças no intestino grosso, principalmente no efeito trófico, devido à fermentação colônica e ao aumento do ácido butírico (butirato).

É importante estudar a fermentação e seus metabólitos finais para tentar correlacioná-los com os efeitos fisiológicos no cólon normal e patológico (neoplasias, colites, etc).

A implicação da presença de nutrientes no lúmen ("nutrição luminal") é relativamente pouco estudada e explorada. Muitos trabalhos só analisaram macroscopicamente o intestino grosso e poucos estudaram a sua morfometria e proliferação celular após o consumo de carboidratos não-disponíveis, principalmente os frutanos.

Devem ser conduzidos mais estudos com o objetivo de aprofundar o mecanismo da fermentação e suas implicações fisiológicas no intestino grosso, pois não há na literatura trabalhos que utilizam técnicas de biologia molecular para verificar o comportamento e a expressão gênica (*bcl-2*, *bax*, *caspases*, etc) dos colonócitos após o consumo de carboidratos não-disponíveis e fermentáveis, como os frutanos.

Esses novos dados seriam interessantes para estudar como o epitélio colônico responderia geneticamente à fermentação e ao consumo de carboidratos não-disponíveis e, também, poderiam fazer uma ligação entre a ingestão desses compostos e a proteção/promoção do câncer de cólon.

6 Considerações finais

- A fermentação *in vitro* forneceu informações do comportamento fermentativo das frações indigeríveis da cebola e rações controle e suplementada com cebola (10% de frutanos), quanto aos parâmetros de AGCC, pressão, pH e fermentabilidade.
- A incorporação de cebola na ração (10% de frutanos) alterou quantitativa (concentração) e qualitativamente (proporção molar) o perfil de AGCC na fermentação *in vitro*.
- A ração suplementada com cebola (10% de frutanos) teve alta produção de ácido butírico, tanto na fermentação *in vitro* quanto na *in vivo*.
- Os resultados obtidos na fermentação *in vitro* sinalizam para a importância desses métodos, a fim de se conhecer previamente o potencial fermentativo dos carboidratos não-disponíveis e as possíveis implicações fisiológicas dos metabólitos formados no processo.
- O grupo de animais que consumiu ração suplementada com cebola (frutanos 10%) teve mudanças significantes nos parâmetros de fermentação *in vivo* de carboidratos não-disponíveis, em relação ao controle. Apresentando aumento do peso úmido das fezes e conteúdo cecal, dos AGCC e do peso do ceco (conteúdo e parede) e diminuição do pH.
- Os animais que consumiram frutanos tiveram aumento significativo de AGCC no ceco, onde a produção foi 2,9 vezes maior em relação ao grupo controle. A proporção molar dos AGCC também se modificou, corroborando com os resultados da fermentação *in vitro*.
- Com relação ao pH no ceco, houve queda decorrente da produção de AGCC, mostrada também na fermentação *in vitro*.

- O consumo da cebola, fonte de frutanos, provocou mudanças macroscópicas no ceco, onde houve aumento de peso total, conteúdo cecal e parede, mostrando o efeito trófico possivelmente devido à fermentação;
- Sob o aspecto microscópico do ceco, os frutanos proporcionaram aumento significativo no tamanho das criptas, no número de criptas bifurcadas e no índice metafásico, em relação ao controle. Sendo que, aproximadamente, 98% das mitoses (metáfases) ocorreram na região basal da cripta, tanto no grupo controle como frutanos 10%. Esses resultados confirmaram o efeito trófico no ceco decorrente da presença de FOS da cebola, que são frutanos de baixo peso molecular, fermentados nas porções mais proximais do intestino grosso.
- O efeito trófico, observado no ceco do grupo frutanos 10%, possivelmente foi devido ao aumento significativo na concentração de butirato.
- O cólon, contudo, não obteve a mesma resposta, pois todos os parâmetros referentes à proliferação celular não apresentaram diferenças significantes em relação ao grupo controle.
- O estudo das fermentações *in vivo* e *in vitro* de frutanos evidenciou forte influência da presença de nutrientes no lúmen sobre o intestino grosso, mostrando que a presença de substratos nesse órgão promove mudanças importantes no lúmen, as quais podem ter repercussões fisiológicas para o hospedeiro.

7 Conclusões

A adição de cebola (*Allium cepa* L.) na ração, que forneceu 10% de frutanos, provocou mudanças significantes nos parâmetros fermentativos, tanto na fermentação *in vivo* (ratos) quanto na *in vitro* e na proliferação celular do ceco.

8 Referências

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. The definition of dietary fiber. **Report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of Directors**, 2001.

ANDERSEN, R.; SORENSEN, A. An enzymatic method for the determination of fructans in foods and food products: comparison of the results by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Eur Food Res Technol**, v. 210, p. 148-152, 1999.

ARAI, S.; OSAWA, T.; OHIGASHI, H.; YOSHIKAWA, M.; KAMINOGAWA, S.; WATANABE, M.; OGAWA, T.; OKUBO, K.; WATANABE, S.; NISHINO, H.; SHINOHARA, K.; ESASHI, T.; HIRAHARA, T. A mainstay of functional food science in Japan - history, present status, and future outlook. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 65, n. 1, p. 1-13, 2001.

ARMSTRONG, E.F.; EASTWOOD, M.A.; BRYDON, G. The influence of wheat bran and pectin on the distribution of water in rat caecal contents and feces. **Br J Nutr**, v. 69, p. 913-920, 1993.

ARMSTRONG, E.F.; EASTWOOD, M.A.; BRYDON, W.G. The influence of wheat bran and pectin on the distribution of water in rat caecal contents and feces. **Br J Nutr**, v. 69, p. 913-920, 1993.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 13th ed. Washington: AOAC; 1980.

BARON, J. A. Dietary fiber and colorectal cancer. An ongoing saga. **JAMA**, v. 294, p. 2904-2906, 2005.

BARRY, J.L.; HOEBLER, C.; MACFARLANE, G.T.; MACFARLANE, S.; MATHERS, J.C.; REED, K.A.; MORTENSEN, P.B.; NORDGAARD, I.; ROWLAND, I.R.; RUMNEY, C.J. Estimation of the fermentability of dietary fiber *in vitro*: a European interlaboratory study. **Br J Nutr**, v. 74, n.3, p. 303-322, 1995.

BASHIR, O.; FITZ-GERALD, A.J.; GOODLAD, R.A. Both suboptimal and elevated vitamin intake increase intestinal neoplasia and alter crypt fission in the Apc^{min/+} mouse. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 8, p. 1507-1515, 2004.

BASSON, M.D.; TUROWSKI, G.A.; RASHID, Z.; HONG, F.; MADRI, J.A. Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate. **Dig Dis Sci**, v. 41, n. 10, p. 1986-1993, 1996.

BAUER-MARINOVIC, M.; FLORIANI, S.; MULLER-SCHMEHLI, K.; GLATT, H. Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1-2 dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon. **Carcinogenesis**, no prelo, 2006.

BERGGREN, A.N.; BJORCK, I.M.E.; NYMAN, G.L. Short chain fatty acid content and pH in caecum of rats given various sources of carbohydrates. **J Sci Food Agric**, v. 63, p. 397-406, 1993.

BERGMEYER, H.U.; BERNET, E. Determination of glucose with oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U., **Methods of Enzymatic Analysis**, 2 ed., New York: Academic Press, 1205-1215, 1974.

BEYER, G.; GLEI, M.; HARTMANN, E.; HUGHES, R.; PERSIN, C.; BOHM, V.; BOHM, V.; ROWLAND, I.; SHUBERT, R.; JAHREIS, G.; POOL-ZOBEL, B.L. Butyrate is only one of several growth inhibitors produced

during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. **Br J Nutr**, v. 90, p. 1057-1070, 2003.

BEYLOT, M. Effects of inulin-type fructans on lipid metabolism in man and in animal models. **Br J Nutr**, v. 93, suppl. 1, p. 163S-168S, 2005.

BIGHAM, S.A.; DAY, N.E.; LUBEN, R.; FERRARI, P.; SLIMANI, N.; NORAT, T.; CLAVEL-CHAPELON, F.C.; KESSE, E.; NIETERS, A.; BOEING, H.; TJONNELAND, A.; OVERVAD, K.; MARTINEZ, C.; DORRONSORO, M.; GONZALEZ, C.A.; KEY, T.J.; TRICHOPOULOOU, A.; NASKA, A.; VINEIS, P.; TUMINO, R.; KROGH, V.; BUENO-DE-MESQUITA, H.B.; PEETERS, P.H.M.; BERGLUND, G.; HALLMANS, G.; LUND, E.; SKEIE, G.; KAAKS, R.; RIBOLI, E. Dietary fiber in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. **Lancet**, v. 361, p. 1496-1501, 2003.

BOUHNİK, Y.; RASKINE, L.; CHAMPION, K.; ANDRIEUX, C.; PENVEN, S.; JACOBS, H.; SIMONEAU, G. Prolonged administration of low-dose inulin stimulates the growth of bifidobacteria in humans. **Nutr Res**, v. 27, p. 187-193, 2007.

BOUHNİK, Y.; RASKINE, L.; SIMONEAU, G.; VICAUT, E.; NEUT, C.; FLOURIÉ, B.; BROUNS, F.; BORNET, F.R. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. **Am J Clin Nutr**, v. 80, p. 1658-1664, 2004.

BOULEY, S.S.C.; RUAULT-BOUTRON, M.C.; CUMMINGS, J.H.; FRANK, A.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M.C.; ROBERFROID, M.;

ROWLAND, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Br J Nutr**, v. 80, suppl. 1, p. 147S-171S, 1998.

BOURQUIN, L.D.; TITGEMEYER, E.C.; FAHEY, G.C. Fermentation of various dietary fiber sources by human fecal bacteria. **Nutr Res**, v. 16, p. 1119-1131, 1996.

BOURQUIN, L.D.; TITGEMEYER, E.C.; FAHEY, G.C. Vegetables fiber fermentation by human fecal bacteria: cell wall polysaccharides disappearance and short-chain fatty acid production during *in vitro* fermentation and water-holding capacity of unfermented residues. **J Nutr**, v. 123, p. 860-869, 1993.

BOVEE-OUDEHOF, I.M.J.; TEN BRUGGENCATE, S.J.M.; LETTINK-WISSINK, M.L.G.; VAN DER MEER, R. Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonization but stimulate translocation of salmonella in rats. **Gut**, v. 52, p. 1572-1578, 2003.

BUSCHE, R.; DITTMANN, J.; ZU-DUTTINGDORF, H.D.M.; GLOCHENTHOR, U.; VON-ENGELHARDT, W.; SALLMANN, H.P. Permeability properties of apical and basolateral membranes of the guinea pig caecal and colonic epithelia for short-chain fatty acids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1565, p. 55-63, 2002.

CAERS, W. Inulina e oligofrutose: fibras prebióticas e seus benefícios nutricionais. In: ILSI BRASIL – International Life Sciences Institute do Brasil. **Fibras, prebióticos e probióticos**. 1ª ed. São Paulo: ILSI BRASIL, 2005, p. 23-34.

CAMBRODÓN, I.G.; MARTIN-CARRÓN, N. Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. In: LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO F.;

PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. **Fibra dietética em iberoamérica: tecnologia y salud – obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. 1ª ed. São Paulo: Ed. Varela, 2001. cap. 24, p. 311-338.

CAMPBELL, J.M.; BAUER, L.L.; FAHEY, G.C.; HOGARTH, B.W.W.; HUNTER, D.E. Selected fructooligosaccharide (1-kestose, nystose and 1-F- β -fructofuranosylnystose) composition of foods and feeds. **J Agric Food Chem**, v. 45, p. 3076-3082, 1997.

CAMPBELL, J.M.; JR-FAHEY, G.C.; WOLF, B.W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microbiota in rats. **J Nutr**, v. 127, p. 130-136, 1997.

CAPITO, S.M.P. **Raiz tuberosa de yacon (Polymnia sonchifolia): caracterização química e métodos de determinação de frutanos (CG e CLAE-DPA)**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 30, p.268-282, 1999.

CHAMP, M.; LANGKILDE, A.M.; BROUNS, F.; KETTLITZ, B.; COLLET, Y.L.B. Advances in dietary fibre characterisation. 1. Definition of dietary fibre, physiological relevance, health benefits and analytical aspects. **Nutr Res**, v. 16, p. 71-82, 2003.

CHERBUT, C. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. **Br J Nutr**, v. 87, suppl. 2, p. 159S-162S, 2002.

COMALADA, M.; BAILON, E.E.; DE HARO, O.; LARA-VILLOSLADA, F.; XAUS, J.; ZARZUELO, A; GALVEZ, E.J. The effects of short chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 132, p. 487-497, 2006.

COOK, S.I.; SELLIN, J.H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 12, p. 499-507, 1998.

COUSSEMENT, P.A.A. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. **J Nutr**, v. 129, suppl. 7, 1412S-1417S, 1999.

COXAM, V. Inulin-type fructans and bone health: state of the art and perspectives in the management of osteoporosis. **Br J Nutr**, v. 93, suppl. 1, p. 111S-123S, 2005.

CUFF, M.A.; SHIRAZI-BEECHEY, S.P. The importance of butyrate transport to the regulation of gene expression in the colonic epithelium. **Biochem Soc Trans**, v. 32, n. 6, p. 1100-102, 2004.

CUMMINGS, J.H. **The large intestine in nutrition and disease**. Edited by the *Institut Danone*. 1997. Disponível em: <www.danonevitapole.com>. Acesso em: nov. de 2004.

CUMMINGS, J.H.; ENGLYST, H.N. Fermentation in the large intestine and the available substrates. **Am J Clin Nutr**, v. 45, p. 1243-1255, 1987.

CUMMINGS, J.H.; ENGLYST, H.N. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. **Am J Clin Nutr**, v. 65 suppl.1 , p. 938S-945S, 1995.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. Colonic microbiota: nutrition and health. **Nutrition**, v. 13, n. 5, p. 476-478, 1997.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **Br J Nutr**, v. 87, suppl. 2, p. 145S-151S, 2002.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. The control and consequence of bacterial fermentation in the human colon. **J Appl Bacteriol**, v. 70, p. 443-459, 1991.

CUMMINS, A.G.; JONES, B.J.; THOMPSON, F.M. Postnatal epithelial growth of the small intestine in the rat occurs by both crypt fission and crypt fission and crypt hyperplasia. **Dig Dis Sci**, v. 51, n. 4, p. 718-723, 2006.

DAVIE, J.R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **J Nutr**, v. 133, suppl. 1, p. 2485S-2493S, 2003.

DE CARVALHO M.A.; ZOIDAN, L.; DIETRICH, S. Growth and fructan content of plant of *Vermonia herbacia* (Asteraceae) regenerated from rhizophoris. **New Phytol**, v. 136, p. 153-161, 1997.

DE FRANCISCO, A. Propriedades funcionais das fibras dietéticas. In: ILSI BRASIL – International Life Sciences Institute do Brasil. **Fibras, prebióticos e probióticos**. 1ª ed. São Paulo: ILSI BRASIL, 2005, p. 35-58.

DELAQUIS, P.; MAZZA, G. Functional vegetable products. In: MAZZA, G. **Functional foods: Biochemical & processing aspects**. 1ª ed. Washington: Ed Technomic Publication, 1998, cap. 6, p. 193-233.

DELZENNE, N.; KOK, N. Biochemical basis of oligofructose induced hypolipidemia in animal models. **J Nutr**, v. 129, suppl. 1, p. 1467S-1407S, 1999.

DELZENNE, N.M.; DAUBIOUL, C.; NEYRINCK, A.; LASA, M.; TAPER, H.S. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. **Br J Nutr**, v. 87, suppl. 2, p. 255S-259S, 2002.

DEMIGNÉ, C.; LEVRAT, M.A.; YOUNES, H.; RÉMESY, C. Interactions between large intestine fermentation and dietary calcium. **Eur J Clin Nutr**, v. 49, suppl. 3, p. 235S-238S, 1995.

DEMIGNÉ, C.; MORAND, C.; LEVRAT, M.A.; BESSON, C.; MOUNDRAS, C.; RÉMESY, C. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. **Br J Nutr**, v. 74, p. 209-219, 1995.

DePLANCKE, B.; GASKINS, H.R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **Am J Clin Nutr**, v. 73 suppl 1, p. 1131S-1141S, 2001.

DIPLOCK, A.T.; AGGETT, P.J.; ASHWELL, M.; BORNET, F.; FERN, E.B.; ROBERFROID, M.B. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **Br J Nutr**, v. 81, suppl. 1, p. 5S-27S, 1999.

DRZIKOVAL, B.; DONGOWSKIL, G.; GEBHARDT, E. Dietary fibre-rich oat-based products affect serum lipids, microbiota, formation of short chain fatty acids and steroids in rats. **Br J Nutr**, v. 94, p. 1012-1025, 2005.

ERNST, M.K.; CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; GUDRUN, M. Characterization of fructan oligomers from species of the genus *allium* L. **J Plant Physiol**, v. 153, p. 53-60, 1998.

FAO (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION). Food Energy: Methods of analysis and conversion factors. Report of a technical workshop. Roma: FAO, 2003.

FILISSETTI, T.M.C.C. Fibra alimentar: Definição e métodos analíticos. In: LAJOLO, F.M., MENEZES, E.W. **Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos. Proyecto CYTED/CNPq XI.18. Composición, Estructura, Propiedades Biológicas de Carbohidratos y su Utilización en Alimentos.** 1ª ed. São Paulo: EDUSP, 2006. cap. 11, p. 255-286.

FILISSETTI, T.M.C.C.; LOBO, A.R. Fibra alimentar e seu efeito na biodisponibilidade de minerais. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes.** 2ª ed. São Paulo: MANOLE, 2005. cap. 7, p. 174-214.

FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C., LAJOLO, F.M. Fibra alimentar insolúvel, solúvel e total em alimentos brasileiros. **Rev Farm Bioq USP**, v. 27, n. 1, p. 83,99, 1991.

FLAMM, G.; GLINSMANN, W.; KRITCHEVSKY, D.; PROSKY, L.; ROBERFROID, M. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. **Cr Rev Food Sci Nutr**, v. 41, n. 5, p. 353-362, 2001.

FLEMING, S.E.; FITCH, M.D.; VRIES, S.D. The influence of dietary fiber on proliferation of intestinal mucosal cells in miniature swine may not be mediated primarily by fermentation. **J Nutr**, v. 122, p. 906-916, 1992.

FOLINO, M.; MCINTYRE, A.; YOUNG, G.P. Dietary fibers differ in their effects on large bowel epithelial proliferation and fecal fermentation-dependent events in rats. **J Nutr**, v. 125, p. 1521-1528, 1995.

FRANKEL, W.; LEW, J.; SU, B.; BAIN, A.; KLURFELD, D.; EINHORN, E.; MacDERMOTT, R.P.; ROMBEAU, J. Butyrate increases colonocytes protein synthesis in ulcerative colitis. **J Surg Res**, v. 57, n.1, p. 210-214, 1994.

FUCHS, C.S.; GIOVANNUCCI, E.; COLDITZ, G.A. HUNTER, D.J.; STAMPFER, M.J.; ROSNER, B.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. **N Eng J Med**, v. 340, p. 169-176, 1999.

FUKAI, K.; OHNO, S.; GOTO, K.; NANJO, F.; HARA, Y. Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Sci Plant Nutr**, 1997; v. 43, n. 1, p. 171-177.

FUKUSHIMA, M. Chemistry of short-chain fatty acids. In: CUMMINGS, J.H.; ROMBEAU, J.L.; SAKATA, T. **Physiological and clinical aspects of short chain fatty acids**. 1st Ed. Cambridge University Press, 1995, p. 15-34.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M.; ARABBI, P.R. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 5, p. 1124-1131, 2004.

GIBSON, G.R. Dietary modulation of the human gut microbiota using the prebiotics oligofructose and inulin. **J Nutr**, v. 129, suppl. 1, p. 1438S-1441S, 1999.

GIBSON, G.R.; BEATTY, E.R.; WANG, X.; CUMMINGS, J.H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v. 108, p. 975-982, 1995.

GIBSON, G.R.; McCARTNEY, A.L.; RASTALL, R.A. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. **Br J Nutr**, v. 93, suppl. 1, p. 31S-34S, 2005.

GIBSON, G.R.; PROBERT, H.M.; LOO, J.V.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutr Res Rev**, v. 17, p. 259-275, 2004.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **J Nutr**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G.R.; WILLIS, C.L.; VAN LOO, J. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria – implications for health. **Int Sugar J**, v. 96, n. 1150, p. 381-387, 1994.

GIBSON, P.R.; ROSELLA, O.; WILSON, A.J.; MARIADASON, J.M.; RICKARD, K.; BYRON, K.; BARKLA, D.H. Colonic epithelial cell activation and the paradoxal effects of butyrate. **Carcinogenesis**, v. 20, n.4, p. 539-544, 1999.

GOÑI, I. Biodisponibilidad de carbohidratos. In: MENEZES, E.W.; LAJOLO, F.M. **Avances sobre el uso y las propiedades de los carbohidratos de los alimentos regionales. Proyecto CYTED/CNPq XI.18. Composición, Estructura, Propiedades Biológicas de Carbohidratos y su Utilización en Alimentos.** 1ª ed. São Paulo: EDUSP, 2003, cap. 2, p. 21-26.

GOÑI, I.; LÓPEZ-OLIVA, E. Carbohidratos y salud gastrointestinal. In: LAJOLO, F. M., MENEZES, E.W. **Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos. Proyecto CYTED/CNPq XI.18. Composición,**

Estrutura, Propiedades Biológicas de Carbohidratos y su Utilización en Alimentos. 1ª. ed. São Paulo: EDUSP, 2006, cap. 11, p. 287-308.

GOODLAD, R.A.; ENGLYST, H. N. Redefining dietary fibre: potentially a recipe for disaster. **Lancet**, v. 358, n. 1, p. 1833-1834, 2001.

GRIFFITHS, G.; TRUEMAN, L.; CROWTHER, T.; THOMAS, B.; SMITH, B. Onions: A global benefit to health. **Phytother Res**, v. 16, p. 603-615, 2002.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, p. 512-519, 2003.

GUDIEL-URBANO, M., GONI, I. Effect of short-chain fructooligosaccharides and cellulose on cecal enzyme activities in rats. **Ann Nutr Metab**, v. 46, p. 254-258, 2002.

GUILLON, F.; CHAMP, M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. **Food Res Int**, v. 33, p. 233-245, 2000.

GUILLON, F.; RENARD, C.M.G.; HOSPERS, J.; THIBAT J-F; BARRY, L-L. Characterisation of residual fibres from fermentation of pea and apple fibres, by human faecal bacteria. **J Sci Food Agric**, v. 68, p. 521-529, 1995.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças.** 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

HASLER, C.M.; BLOCK, A.S.; THOMSON, C.A.; ENRIONE, E.; MANNING, C. Position of the American Dietetic Association: Functional foods. **J Am Diet Assoc**, v. 104, n. 5, p. 814-826, 2004.

HENNINGSSON, A.M.; BJORCH, I.M.E., NYMAN, E.M.G. Combinations of indigestible carbohydrates affect short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats. **J Nutr**, v. 132, p. 3098-3104, 2002.

HOEBREGS, H. Fructans in food and food products, ion-exchange chromatographic method: Collaborative study. **J AOAC Int**, v. 80, n. 5, p. 1029-1037, 1997.

HOWARD, M.D.; GORDON, D.T.; GARLAB, K.A.; KERLEY, M.S. Dietary fructooligosaccharide, xylooligosaccharide and gum arabic have variable effects on cecal and colonic microbiota and epithelial cell proliferation in mice and rats. **J Nutr**, v. 125, p. 2604-2609, 1995.

HOWARD, M.D.; GORDON, D.T.; PACE, L.W.; GARLEB, K.A.; KERLEY, M.S. Effects of dietary supplementation with fructooligosaccharides on colonic microbiota populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. **J Ped Gastroenterol Nutr**, v. 21, p. 297-303, 1995.

HUGHES, R.; ROWLAND, I.R. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 1, p. 43-47, 2001.

ICHIKAWA, H.; SAKATA, T. Stimulation of epithelial cell proliferation of isolated distal colon of rats by continuous colonic infusion of ammonia or short chain fatty acids is nonadditive. **J Nutr**, v. 128, p. 843-847, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ª ed. São Paulo: Inst. Adolfo Lutz, 1985. p. 21-25.

JAIME, L.; MARTIN-CABREJAS, M.A.; MOLLÁ, E, LÓPEZ-ANDRÉU, F.J.; ESTEBAN, R.M. Effect of Storage on Fructan and Fructooligosaccharide of Onion (*Allium cepa* L.). **J Agr Food Chem**, v. 49, p. 982-88, 2001.

JAIME, L.; MARTINEZ, F.; MARTIN-CARBREJAS, M.A; MOLLÁ, E.; LOPEZ-ANDRÉU, F.J. WALDRON, K.W.; ESTEBAN, K.W. **J Sci Food Agric**, v. 81, p. 177-182, 2000.

JEFFERY, E. Component interactions for efficacy of functional foods. **J Nutr**, v. 135, p. 1223-1225, 2005.

JIE, Z.; BANG-YAO, L.; MING-JIE, X.; HAI-WEI, L.; ZU-KANG, Z.; TING-SONG, W.; CRAIG, S.A.S. Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. **Am J Clin Nutr**, v. 72, p. 1503-1509, 2000.

JOHNSON, I.T. Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. **Food Chem Toxicol**, v. 40, p. 1171-1178, 2002.

JOHNSON, I.T.; GEE, J.M. Gastrointestinal adaptation in response to soluble non-available polysaccharides in the rat. **Br J Nutr**, v. 55, p. 497-505, 1986.

JONES, P. J. Clinical nutrition: 7. Functional foods more than just nutrition. **Can Med Assoc J**, v. 166, n. 12, p. 1555-1563, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1995.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **J Biosci**, v. 27, p. 703-714, 2002.

KEY, F.B.; McCLEAN, D.; MATHERS, J.C. Tissue hypertrophy and epithelial proliferation rate in the gut of rats fed on bread and haricot beans (*Phaseolus vulgaris*). **Br J Nutr**, v. 76, p. 273-286, 1996.

KIEN, C.L.; BROWN-SCHMITZ, M.; SOLLEY, T.; SUN, D.; FRANKEL, W.L. Increased colonic luminal synthesis of butyric acid is associated with lowered colonic cell proliferation in piglets. **J Nutr**, v. 136, p. 64-69, 2006.

KLEESSEN, B.; HARTMANN, L.; BLAUT, M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. **Br J Nutr**, v. 89, p.597-606, 2003.

KLEESSEN, B.; HARTMANN, L.; BLAUT, M. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. **Br J Nutr**, v. 86, p.291-300, 2001.

KORUDA, M. J.; ROLANDELLI, R.H.; SETTLE, R.G.; ZIMMARO, D.M.; ROMBEAU, J. L. Effect of parenteral nutrition supplemented with short-chain fatty acids on adaptation to massive small bowel resection. **Gastroenterology**, v. 95, n. 3, p. 715-720, 1988.

KRIPKE, S.A.; FOX, A.D.; BERMAN, J.M.; SETTLE, R.G.; ROMBEAU, J.L. Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short chain fatty acids. **JPEN (J Parenter Enteral Nutr)**, v. 13, n.2, p. 109-116, 1989.

L'HOMME, C.; PESCHET, J.L.; PUIGSERVER, A.; BIAGINI, A. Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high-

performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **J Chromatogr A**, v. 920, p. 291-297, 2001.

LAJOLO, F.M. Functional foods: Latin American perspectives. **Br J Nutr**, v. 88, suppl. 2, 145S-150S, 2002.

LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. **Fibra dietética en iberoamérica: tecnología y salud: Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. 1ª ed. São Paulo: Varela Editora; 2001.

LAMBO-FODJE, A.M.; OSTE, R.; NYMAN, M.E.G.L. Short chain fatty acid formation in the hindgut of rats fed native and fermented oat fibre concentrates. **Br J Nutr**, v. 96, p. 47-55, 2006.

LE BLAY, G.; MICHEL, C.; BLOTTIERE, H.M.; CHERBUT, C. Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. **J Nutr**, v. 129, p. 2231-2235, 1999.

LE LEU, R.K.; BROWN, I.L.; HU, Y.; BIRD, A.R.; JACKSON, M. A symbiotic combination of resistant starch and bifidobacterium lactis facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. **J Nutr**, v. 135, p. 996-1001, 2005.

LE LEU, R.K.; BROWN, I.L.; HU, Y.; YOUNG, G.P. Effects of resistant starch on genotoxin-induced apoptosis, colonic epithelium and luminal contents in rats. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 8, p. 1347-1352, 2003.

LEAL, K. Polidextrose: um novo conceito em fibras solúveis prebióticas. In: ILSI BRASIL – International Life Sciences Institute do Brasil.

Fibras, prebióticos e probióticos. 1ª ed. São Paulo: ILSI BRASIL, 2005, p.59-66.

LEE, S.C., PROSKY, L., VRIES, J.W. Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. **J AOAC Int**, v. 75, n.3, p. 395-416, 1992.

LEVRAT, M.A.; RÉMÉSY, C.; DEMIGNÉ, C. High propionic acid fermentation and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin. **J Nutr**, v. 121, p. 1730-1737, 1991.

LI, L.C. Protocols on line your lab's reference book. 2003. Disponível em: <www.protocol-online.org>. Acesso em: nov. 2005.

LOBO, A.R.; COLLI, C.; ALVARES, E.P.; FILISETTI, T.M.C.C. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. **Br J Nutr**, v. 97, p. 776-785, 2007.

LOBO, A.R.; COLLI, C.; FILISETTI, T.M.C.C. Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. **Nutr Res**, v. 26, p. 413-420, 2006.

LUPTON, J.R. Is fiber protective against colon cancer? Where the research is leading us. **Nutrition**, v. 16, p. 7-8, 2000.

LUPTON, J.R. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. **J Nutr**, v. 134, p. 479-482, 2004.

LUPTON, J.R.; KURTZ, P.P. Relationship of colonic luminal short chain fatty acids and pH to *in vivo* cell proliferation in rats. **J Nutr**, v. 123, p. 1522-1530, 1993.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, T. Regulation of short-chain fatty acid production. **Proc Nutr Soc**, v. 62, p. 67-72, 2003.

MAI, V.; MORRIS, J.G. Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. **J Nutr**, v. 134, p. 459-464, 2004.

MARTIN, L.J.M.; DUMON, H.J.W.; CHAMP, M.M.J. Production of short-chain fatty acids from resistant starch in a pig model. **J Sci Food Agric**, v. 77, p. 71-80, 1998.

MARTINS, A.A.; MUGLIA, V.F.; KJIWARA, J.K.; GARCIA, S.B. The relationship between myenteric neuronal denervation, smooth muscle thickening and epithelial in rat colon. **Res Exp Med**, v. 197, p. 1117-1124, 1997.

McCLEARY, B.V.; McNALLY, M.; ROSSITER, P. Measurement of resistant starch by enzymatic digestion in starch selected plant materials: Collaborative study. **J AOAC Int**, v. 85, n. 5, p. 1103-1111, 2002.

McCLEARY, B.V.; MONAGHAN, D.A. Measurement of resistant starch. **J AOAC Int**, v. 85, n. 3, p. 665-675, 2002.

McCULLOUGH, J.S.; RATCLIFFE, B.; MANDIR, N.; CARR, K.E.; GOODLAD, R.A. Dietary fibre and intestinal microflora: effects on intestinal morphometry and crypt branching. **Gut**, v. 42, p. 799-806, 1998.

MENEZES, E.W. Carboidratos – conceitos básicos: química e definições. In: ILSI BRASIL - International Life Sciences Institute do Brasil. Carboidratos. Série de publicações: alimentos com propriedades funcionais e/ou saúde. 1ª ed. São Paulo: ILSI BRASIL, 2007, in press.

MIEAN, K.H.; MOHAMED, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin) content of edible tropical plants. **J Agric Food Chem**, v 49, n. 6, p. 3106-3112, 2001.

MILNER, J. A. Functional foods: the US perspective. **Am J Clin Nutr**, v. 71 suppl. 1, p. 1654S-1659S, 2000.

MILNER, J.A. Functional foods and health promotion. **J Nutr**, v. 129 suppl. 1, p. 1395S-1397S, 1999.

MONSMA, D.J.; MARLETT, J.A. Rat cecal inocula produce different patterns of short-chain fatty acids than fecal inocula in *in vitro* fermentations. **J Nutr**, v. 125, n. 10, p. 2463-2470, 1995.

MORITA, T.; KASAOKA, S.; OH-HASHI, A.; IKAI, M.; NUMASAKI, Y.; KIRIYAMA, S. Resistant proteins alter cecal short-chain-fatty acid profiles in rats fed with high amylose cornstarch. **J Nutr**, v. 128, p. 1156-1164, 1998.

MOSHFEGH, A.J.; FRIDAY, J.E.; GOLDMAN, J.P.; AHUJA, J.K.C. Presence of inulin and oligofructose in the diets of americans. **J Nutr**, v. 129 suppl. 1, p. 1407S-1411S, 1999.

MOSHFEGH, A.J.; FRIDAY, J.E.; GOLDMAN, J.P.; CHUG AHUGA, J.K. Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. **J Nutr**, v. 129, suppl. 7, p. 1407S-1411S, 1999.

MUIR, J.P.; YEOW, E.G.; KEOGH, J.; PIZZEY, C.; BIRD, A.R., SHARPE, K.; O´DEA, K.; MACRAE, F.A. Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone. **Am J Clin Nutr**, v.79, n.6, p.1020-1028, 2004.

NAITO, Y.; TAKAGI, T.; KATADA, K.; UCHIYAMA, K.; KURODA, M.; KOKURA, S.; ICHIKAWA, H.; WATABE, J.; YOSHI, N.; OKANOUE, T.; YOSHIKAWA, T. Partially hydrolyzed guar gum down-regulates colonic inflammatory response in dextran sulfate sodium induced colitis in mice. **J Nutr Biochem**, 2005.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? **J Nutr**, v. 129, suppl., 1, p. 1402S-1406S, 1999.

NOAKES, M.; CLIFTON, P.M.; NESTEL, P.J.; LEU, R.; McINTOSH, G. Effect of high amylose starch and oat bran on metabolic variables and bowel function in subjects with hypertriglyceridemia. **Am J Clin Nutr**, v. 64, p. 944-951, 1996.

NYMAN, M. Fermentation and bulking capacity of indigestible carbohydrates: the case of inulin and oligofructose. **Br J Nutr**, v. 87, suppl. 2, p. 163S-168S, 2002.

OHAMA, H.; IKEDA, H.; MORIYAMA, H. Health foods and foods with health claims in Japan. **Toxicology**, v. 221, p. 95-111, 2006.

OHATA, A.; USAMI, M.; MIYOSHI, M. Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cell via lipooxygenase activation. **Nutrition**, v. 21, p. 838-847, 2005.

OLIVEIRA, H.R.; GAZZOLA, J. Absorção dos ácidos graxos. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. 1ª ed. São Paulo: Ed. Manole, 2002.

OSBORNE, D.R. **Análisis de los nutrientes de los alimentos**. 1ª ed. Zaragoza Acribia, 1986.

PAJARI, A.M.; OIKARINEN, S.; STEN, S.G.; MUTANEN, M. Diets enriched with cereal brans or inulin modulate protein kinase C activity and isozyme expression in rat colonic mucosa. **Br J Nutr**, v. 84, p. 635-643, 2000.

PAK, N. Actualización sobre los efectos fisiológicos de la inulina y fructooligosacaridos. In: MENEZES, E.W.; LAJOLO, F.M. **Avances sobre el uso y las propiedades de los carbohidratos de los alimentos regionales. Projeto CYTED XI. 18 Composición, estrutura, propriedades biológicas de carbohidratos y su utilización em alimentos.** 1ª ed. São Paulo: EDUSP, 2003.

PAK, N. Inulina y fructooligosacáridos: propiedades nutricionales y funcionales. In: LAJOLO, F. M., MENEZES, E.W. ed. **Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos. Proyecto CYTED/CNPq XI.18. Composición, Estructura, Propiedades Biológicas de Carbohidratos y su Utilización en Alimentos.** 1ª ed. São Paulo: EDUSP, 2006. cap. 14, p. 335-356.

PARK, H.S.; GOODLAD, R.A; AHNEN, D.J.; WINNETT, A.; SASIENI, P.; CHUNG, Y.L.; WRIGHT, N.A. Effects of epidermal growth factor and dimethylhydrazine on crypt size, cell proliferation, and crypt fission in the rat colon. **Am J Pathol**, v. 151, n. 3, 1997.

PARK, Y., HUNTER, D.J.; SPIEGELMAN, D.; BERGKVIST, L.; BERRINO, F.; BRANDT, P.A.V.D.; BURING, J.E.; COLDITZ, G.A.; FREUDENHEIM, J.L.; FUCHS, C.S.; GIOVANNUCCI, E.; GOLDBOHN, R. A.; GRAHAM, S.; HARNACK, L.; HARTMAN, A. M.; JACOBS JR, D.R.; KATO, I.; KROG, V.; LEITZMANN, M.F.; McCULLOUGH, M.L.; MILLER, A.B.; PIETINEN, P.;

ROHAN, T.E.; SCHATZKIN, A.; WILLET, W.C.; WOLK, A.; ZELENIUCH-JACQUOTE, A.; ZHANG, S.M.; SMITH-WARNER, S.A. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer. A pooled analysis of prospective cohort studies. **JAMA**, v. 294, p. 2849-2857, 2005.

PASCOAL, G.B.; FILISETTI, T.M.C.C. Determinação da composição centesimal e conteúdo de frutanos em alimentos consumidos na dieta brasileira. **Rev Farm Bioq USP**, v. 38, suppl. 1, p. 59, 2002.

PASCOAL, G.B.; LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W.; FILISETTI, T.M.C.C. Comparação dos teores de frutanos (inulina e frutooligossacarídeos) obtidos pelos métodos enzimico-espectrofotométricos e cromatografia líquida de alta eficiência, em alguns alimentos consumidos na dieta brasileira. **Rev Farm Bioq USP**, v. 40, suppl. 1, 2004.

PEDERSEN, A.; SANDSTROM, B.; VAN AMELSVOORT, J.M.M. The effect of ingestion of inulin on blood lipids and gastrointestinal symptoms in healthy females. **Br J Nutr**, v. 78, p. 215-222, 1997.

PERRIN, P.; PIERRE, F.; PATRY Y., CHAMP, M.; BERREUR, M., PRADAL, G.; BORNET, F.; MEFLAH, K.; MENANTEAU, J. Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. **Gut**, v. 48, p. 53-61, 2001.

POOL-ZOBEL, B.L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. **Br J Nutr**, v. 93, suppl. 1, p. 73S-90S, 2005.

POOL-ZOBEL, B.P.; VAN LOO, J.; ROWLAND, I.; ROBERFROID, M.B. Experimental evidences on the potencial of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. **Br J Nutr**, v. 87, suppl. 2, p. 273S-281S.

POTTEN, C.S. Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. **Am J Physiol**, v. 273, p. 253-257, 1997.

POTTEN, C.S.; WILSON, J.W.; BOOTH, C. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells*, v. 15, p. 82-93, 1997.

POULSEN, M.; MOLCK, A.M.; JACOBSEN, B.L. Different effects of short and long chained fructans on large intestinal physiology and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. **Nutr Cancer**, v. 42, n. 2, p. 194-205, 2002.

PRESTON-MARTINS, S.; PIKE, M.C.; ROSS, R.K.; JONES, P.A.; HENDERSON, B.E. Increased cell division as a cause of human cancer. **Cancer Res**, v. 50, n. 23, p. 7415-7421, 1990.

PROBERT, H.M.; APAJALAHTI, J.H.A.; RAUTONEM, N.; STOWELL, J.; GIBSON, G.R. Polydextrose, lactitol and fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 8, p. 4505-4511, 2004.

PROSKY, L. Inulin and oligofructose are part of the dietary fiber complex. **J AOAC Int**, v. 82, n. 2, 1999.

PROSKY, L.; HOEBREGS, H. Methods to determine food inulin and oligofructose. **J Nutr**, v. 129, suppl. 7, p.1418S-1423S, 1999.

PRYDE, S.E.; DUNCAN, S.H.; HOLD, G.L.; STEWART, C.S.; FLINT, H.J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS Microbiol Let**, v. 217, p. 133-139, 2002.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RÉMÉSY, C.; LEVRAT, M.A.; GAMET, L.; DEMIGNÉ, C. Cecal fermentations in rats fed with oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. **Am J Physiol**, v. 264, p. 855G-862G, 1993.

RENEHAN, A.G.; O'DWYER, S.T.; HABOUB, N.J.; POTTEN, C.S. Early cellular events in colorectal carcinogenesis. **Col Dis**, v. 4, p. 76-79, 2002.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The concept revisited. **J Nutr**, v. 137, p. 830S-837S, 2007.

ROBERFROID, M.B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **J Nutr**, v. 129 suppl. 1, p. 1398S-1401S, 1999.

ROBERFROID, M.B. Functional foods: concepts and applications to inulin and oligofructose. **Br J Nutr**, v. 87, suppl. 2, p. 139S-143S, 2002.

ROBERFROID, M.B. Introducing inulin-type fructans. **Br J Nutr**, v. 93, suppl. 1, p. 13S-25S, 2005.

ROBERFROID, M.B.; DELZENNE, N.M. Dietary fructans. **Ann Ver Nutr**, v. 18, p.117-143, 1998.

ROBERFROID, M.B.; GIBSON, G.R; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. **Nutr Rev**, v. 51, p. 137-146, 1993.

ROBERFROID, M.B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and Its Hydrolysis Products. **J Nutr**, v. 128, n. 1, p. 11-19, 1998.

ROLAND, N.; BAUDON-NUGON, L.; ANDRIEUX, C.; SZYLLIT, O. Comparative study of the fermentative characteristics of inulin and different types of fibre in rats inoculated with a human whole faecal flora. **Br J Nutr**, v. 74, p. 239-249, 1995.

SABBOH, H.; BESSON, C.; TRESSOL, J.C.; COUDRAY, C.; HORCAJADA, M.N.; COXAM, V.; RÉMÉSY, C.; DEMIGNÉ, C. Organic potassium salts or fibers effects on mineral balance and digestive fermentations in rats adapted to an acidogenic diet. **Eur J Nutr**, v. 45, p. 342-348, 2006.

SAKATA, T. Effects of short-chain fatty acids on the proliferation of gut epithelial cells in vivo. In: CUMMINGS, J.H.; ROMBEAU, J.L.; SAKATA, T. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, p. 289-305.

SAKATA, T. Stimulatory effect of short chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. **Br J Nutr**, v. 58, p. 95-103, 1987.

SALUNKHE, D.K.; KADAM, S.S. **Handbook of vegetable science and technology: production, composition, storage and processing**. 1^a ed. New York: Marcel Dekker, 1998, 721 p.

SAURA-CALIXTO, F. Evolución del concepto de fibra. In: LAJOLO, F. M., MENEZES, E.W. **Carbohidratos en alimentos regionales**

iberoamericanos. Proyecto CYTED/CNPq XI.18. Composición, Estructura, Propiedades Biológicas de Carbohidratos y su Utilización en Alimentos. 1ª ed. São Paulo: EDUSP, 2006, cap. 10, p. 237-253.

SAURA-CALIXTO, F.; GARCÍA-ALONSO, A.; GOÑI, I.; BRAVO, L. *In vitro* determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. **J Agric Food Chem**, v. 48, n. 8, p. 3342-3347, 2000.

SAURA-CALIXTO, F.; GARCÍA-ALONSO, A.; GOÑI, I.; BRAVO, L. *In vitro* determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. **J Agric Food Chem**, v. 48, n. 8, p. 3342-3347, 2000.

SAURA-CALIXTO, F.D.; GOÑI, I. The intake of dietary indigestible fraction in the Spanish diet shows the limitations of dietary fibre data for nutritional studies. **Eur J Clin Nutr**, v. 58, p. 1078-1082, 2004.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J Nutr**, v. 130, suppl. 1, p. 2073S-2085S, 2000.

SCHAFER, K. Analysis of short chain fatty acids from different intestinal samples by capillary gas chromatography. **Chromatographia**, v. 40, n. 9/10, p.550-556, 1995.

SCHEPPACH, W.; BARTRAM, H.P.; RICHTER, F. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. **Eur J Cancer**, v. 31a, n. 7/8, p. 1077-1080, 1995.

SCHOLTENS, P.A.M.J.; ALLES, M.S.; WILLEMSSEN, L.E.M.; BRAAK, C. V.D.; BINDELS, J.G.; BOEHM, G.; GOVERS, M.J.A.P. Dietary fructo-

oligosaccharides in healthy adults do not negatively affect faecal cytotoxicity: a randomise, double-blind, placebo-controlled crossover trial.

Br J Nutr, v. 95, p. 1143-1149, 2006.

SENGUPTA, S.; TANG, C.L.; WONG, C.S.M.; TJANDRA, J.J.; GIBSON, P.R. Colonic epithelial atrophy induced by a fibre-free diet in rats is reversed by minimal amounts of luminal butyrate, but only in the short term. **ANZ J Surg**, v. 72, p. 871-876, 2002.

SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Determination of B-carotene and lutein available from green leafy vegetables by an *in vitro* digestion and colonic fermentation method. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 8, p. 2936-2940, 2005.

SLAVIN, J.L. Dietary fiber and body weight. **Nutrition**, v. 21, p. 411-418, 2005.

SMIRICKY-TJARDES, M.R.; FLICKINGER, E.A.; GRIESHP, C.M.; BAUER, L.L.; MURPHY, M.R.; FAHEY, G.C. Jr. FAHEY. *In vitro* fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora. **J Anim Sci**, v. 81, p. 2505-2514, 2003.

SMITH J.G.; YOKOYAMA, W.H.; GERMAN, B. Butiric acid from the diet: actions at the level of gene expression. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 38, n. 4, p. 259-297, 1998.

SOUCI, S.W.; FACHMANN, W.; KRAUT, H. **Food composition and nutrition tables**. 5^a ed. London: CRC Press; 1994.

SPECIAN, R.D.; OLIVER, M.G. Functional biology of intestinal goblet cells. **Am J Physiol**, v. 260, p. C183-C193, 1991.

TANWAR, B.; SOOD, D.R. Fructan metabolism in developing bulbs of red and white onions (*Allium cepa*). **Indian J Agric Sci**, v. 66, n. 4, p. 224-226, 1996.

TAPPENDEN, K; McBURNEY, M. Systemic short chain fatty acids rapidly alter gastrointestinal structure, function, and expression of early response genes. **Dig Dis Sci**, v. 43, n. 7, p. 1526-1536, 1998.

TOPPING, D.L.; CLIFTON P.M. Short-Chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiol Rev**, v. 81, n. 3, p. 1031-1060, 2001.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE (USDA). **Nutrient Database for Standard Reference**. Disponível em: <www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>. Acesso em nov. 2006.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – USP. Versão 4.0**. No ar desde 1998. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela>>. Acesso em: Dez. de 2003.

VAN LOO, J.; COUSSEMENT, P.; LEENHEER, L.D.; HOEBREGS, H.; SMITS G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. **Crit Ver Food Sci Nutr**, v. 35, n. 6, p. 525-552, 1995.

VAN LOO, J.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; ENGLYST H.; FRANCK, A.; HOPKINGS, M.; KOK, N.; MACFARLANE, G.; NEWTON, D.; QUIGLEY, M.; ROBERFROID, M.; VAN VLIET, T.; VAN DEN HEUVEL, E. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides, a consensus report from the

ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). **Br J Nutr**, v. 81, p. 121-132, 1999.

VELAZQUEZ, O.C.; SATE, R.W.; BRAIN, A.M.; FISHER, J.; ROMBEAU, J.L. Deoxycholate inhibits *in vivo* butyrate-mediated BrDU labeling of the colonic crypt. **J Surg Res**, v. 69, p. 344-358, 1997.

VERGHESE, M.; RAO, D.R.; CHAWAN, C.B.; SHACKELFOR, L. Dietary inulin suppresses azoxymethane-induced preneoplastic aberrant crypt foci in mature fisher 344 rats. **J Nutr**, v. 132, p. 2804-2808, 2002.

WANG, X.; BROWN, I.L.; KHALED, D.; MAHONEY, M.C.; EVANS, A.J.; CONWAY, P.L. Manipulation of colonic bacteria and volatile fatty acid production by dietary high amylose maize (amylomaize) starch granules. **J Appl Microbiol**, v. 93, p. 390-397, 2002.

WASAN, H.S.; GOODLAD, R.A. Fibre-supplemented foods may damage your health. *Lancet*, v. 348, p. 319-320, 1996.

WATZL, B.; GIRRBACH, S.; ROLLER, M. Inulin, oligofructose and immunomodulation. **Br J Nutr**, v. 93, suppl.1, p. 49S-55S, 2005.

WHELAN, K.; JUDD, P.A.; PREEDY, V.R.; SIMMERING, R.; JANN, A.; TAYLOR, M.A. Fructooligosaccharides and fiber partially prevent the alterations in fecal microbiota and short-chain fatty acid concentrations caused by standard enteral formula in healthy humans. **J Nutr**, v. 135, p. 1896-1902, 2005.

WHIGHT, N.A.; APPLETON, D.R. The metaphase arrest technique. **Cell Tissue Kinet**, v. 13, p. 643-663, 1980.

WILLIAMS, C.M.; JACKSON, K.G. Inulin and oligofructose: effects on lipid metabolism from human studies. **Br J Nutr**, v. 87 suppl. 2, p. 261S-264S, 2002.

WONG, C.S.M.; GIBSON, P.R. The trophic effect of dietary fibre is not associated with a change in total crypt number in the distal colon of rats. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 2, p. 343-348, 2003.

WONG, J.M.W.; SOUZA, R.; KENDALL, C.W.C.; EMAM, A.; JENKINGS, D.J.A. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **J Clin Gastroenterol**, v. 40, p. 235-243, 2006.

WONG, W.M.; WRIGHT, N.A. Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. **J Clin Pathol**, v. 52, p. 321-333, 1999.

WONG, W.M.; WRIGHT, N.A. Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. **J Clin Pathol**, v. 52, p. 321-333, 1999.

WRICK, K.L. Consumer issues and expectations for functional foods. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 35, p. 167-173, 1995.

WRIGHT, N.A. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. **Int J Exp Path**, v. 81, p. 117-143, 2000.

YOKOMIZO, Y.; DRAETTA, I.S.; DA SILVA, S.D.; COSTA, Y.C.; CAMPOS, R.B.; GARCIA, J.L. Composição química de diferentes variedades de cebola (*Allium cepa* L.) e sua caracterização. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 8, p. 501-17, 1977.

YOUNES, H.; LEVRAT, M.A.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Relationship between fermentations and calcium in the cecum of rats fed digestible or resistant starch. **Ann Nutr Metabol**, v. 37, p. 311-319, 1993.

YOUNES, H.; RÉMÉSY, C.; BEHR, S.; DEMIGNÉ, C. Fermentable carbohydrate exerts a urea-lowering effect in normal and nephrectomized rats. **Am J Physiol**, v. 272, p. 515-521, 1997.

ZDUNCZYK, Z.; JUSKIEWCZ, J.; ESTRELLA, I. Cecal parameters of rats fed diets containing grapefruit polyphenols and inulin as single supplements or in combination. **Nutrition**, v. 22, no prelo, 2006.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Efeitos dos frutanos, provenientes da cebola (Allium cepa L.), em alguns parâmetros relacionados com a fermentação de carboidratos não digeríveis: estudo in vivo e in vitro” (Protocolo nº64), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Grazieli Benedetti Pascoal e do orientador(a) Elizabete Wenzel de Menezes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 04/04/2005.

São Paulo, 05 de abril de 2005.

*Prof.^a Associada Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA*