

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL

GISELLI HELENA LIMA CARDENETTE

Produtos derivados de banana verde
(*Musa spp.*) e sua influência na tolerância à
glicose e na fermentação colônica

São Paulo

2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Produtos derivados de banana verde (*Musa spp.*) e sua influência na tolerância à glicose
e na fermentação colônica**

GISELLI HELENA LIMA CARDENETTE

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Elizabete Wenzel de Menezes

São Paulo

2006

GISELLI HELENA LIMA CARDENETTE

**Produtos derivados de banana verde (*Musa* spp.) e sua influência na tolerância à glicose
e na fermentação colônica**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Nutrição
Experimental.

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Elizabete Wenzel de Menezes

São Paulo

2006

GISELLI HELENA LIMA CARDENETTE

“Produtos derivados de banana verde (*Musa* spp.) e sua influência na tolerância
à glicose e na fermentação colônica”

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elizabete Wenzel de Menezes
Orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, _____ de _____

À minha amada família por tudo em todas as horas. Todos vocês são minha estrutura. Tudo o que eu tenho devo a Deus e a vocês!

“Atentei para todas as obras que fazem debaixo do sol, e eis que tudo era vaidade e correr atrás do vento. Apliquei o coração a conhecer a sabedoria e a saber o que é loucura e o que é estultícia; e vim saber que também isto é correr atrás do vento. Porque na muita sabedoria há muito enfado; e quem aumenta ciência aumenta tristeza... Considerei todas as obras que fizeram as minhas mãos, como também o trabalho que eu, com fadigas, havia feito; e eis que tudo era vaidade e correr atrás do vento... Pois, tanto do sábio como do estulto, a memória não durará para sempre; pois, passados alguns dias, tudo cai no esquecimento. Ah! Morre o sábio, e da mesma sorte, o estulto!... Porque há homem cujo trabalho é feito com sabedoria, ciência e destreza; contudo, deixará o seu ganho como porção a quem por ele não se esforçou; também isto é vaidade e grande mal. Pois que tem o homem de todo o seu trabalho e da fadiga do seu coração, em que ele anda trabalhando debaixo do sol?... Porque todos os seus dias são dores... até de noite não descansa o seu coração; também isto é vaidade. Nada há nada melhor para o homem do que comer, beber e fazer que a sua alma goze o bem do seu trabalho. No entanto, vi também que isto vem da mão de Deus... porque Deus dá sabedoria, conhecimento e prazer ao homem que lhe agrada...”

Eclesiastes 1:14, 17,18; 2:11, 16, 21-24, 26

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus familiares, por tornarem possível a realização de mais este sonho em minha vida.

À Profª. Dra. Elizabete Wenzel de Menezes, orientadora do presente trabalho, pelo constante incentivo e por todas as oportunidades de crescimento acadêmico e pessoal.

A todos do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos (FCF/USP). Às minhas “irmãs” Juliana Godoy, Juliana F. dos Santos e Grazieli Pascoal - os méritos deste trabalho são de vocês também; em especial às “irmãs” Milana Dan e Eliana Giuntini pela dedicação e amizade em todas as horas. Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto, modelo de professor para mim – boa sorte nesse seu início de jornada!

Ao Professor Titular Franco Maria Lajolo pelo apoio científico e financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado direto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

A todos os funcionários, professores e estudantes do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) por tornarem possível a realização do curso de doutorado direto. Em especial aos amigos José Donato Júnior e Alexandre Lobo pelo apoio pessoal e científico.

Aos funcionários do Biotério da FCF-IQ/USP, em especial ao “super” Wagner, por todo apoio e pela amizade desenvolvida durante os experimentos.

Ao Prof. Dr. Ângelo Carpinelli – Laboratório de Fisiologia da Secreção de Insulina do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) – por disponibilizar a estrutura de seu laboratório e pelos enriquecedores conselhos; meus agradecimentos à Marlene também.

À Profa. Dra. Isabel Goñi - Departamento de Nutrición I, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid – pela orientação em estágio e por disponibilizar sua estrutura e pessoal – meus agradecimentos ao José e à Maria Helena também.

Ao Prof. Dr. Antônio Roberto Chacra – Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – pela atenção e pelos conselhos disponibilizados.

À Roche Diagnostics pelas doações de material essencial para a realização desta pesquisa.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) por disponibilizar pessoal e equipamentos para realização de análises.

À Profa. Eliana Parisi - Laboratório de Biologia dos Epitélios Digestivos do Departamento de Histologia e Embriologia (ICB/USP) – pela orientação quanto à coleta de tecidos para histologia e por disponibilizar a estrutura de seu laboratório e pessoal - meus agradecimentos ao Júnior também.

À Profa. Dra. Carmem Tadini - Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP (EP/USP) – por fornecer pessoal e estrutura para elaboração de produtos a serem estudados; meus agradecimentos ao Ivan também.

À Associação de Bananicultores do Vale do Ribeira e ao Comércio de Frutas Jaguaré, pelas bananas doadas.

À Márcia S. Cardenette, minha sogra, pela ajuda inestimável na conclusão deste trabalho – seu neto também agradece! Hector, obrigado por se comportar na minha barriga!

Ao *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo*, Projeto CYTED XI.18 “Composição, Estrutura e Propriedades Biológicas de Carboidratos para sua Utilização em Alimentos Funcionais” e ao Projeto 106PI0297 “Bases Científicas e Tecnológicas para Produção de Alimentos Funcionais a partir de plátano/banana verde” pela possibilidade de intercâmbio científico e de realização de estágio na Universidade Complutense de Madri.

RESUMO

Crescente ênfase vem sendo dada ao estudo e desenvolvimento de alimentos ricos em carboidratos não-disponíveis em virtude de seus benefícios já comprovados. O presente trabalho visou caracterizar carboidratos da banana verde e avaliar efeitos fisiológicos de seus carboidratos não-disponíveis sobre a tolerância à glicose, entre outros parâmetros relacionados a ela ou à saúde em geral. A massa de banana verde (MBV) (banana verde cozida com casca) e o amido de banana verde (ABV) (amido isolado) foram os principais produtos estudados. Foram realizados ensaios de curta duração em humanos e em ratos, e de média duração somente em ratos. Para a caracterização dos produtos e rações utilizados, foram avaliados principalmente os teores de amido resistente (AR), fibra alimentar (FA), fração indigerível (FI) e o perfil da fermentação *in vitro*. Os efeitos fisiológicos dos produtos e rações foram avaliados por curvas glicêmicas, teste de tolerância à glicose (TTG), perfil lipídico e de fermentabilidade *in vivo*. Os produtos de banana verde e as rações elaboradas com os mesmos apresentaram alto teor de carboidratos não-disponíveis, diferentes em quantidade e qualidade, mas com alta fermentabilidade, sinalizada pelo aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e diminuição de pH na fermentação colônica *in vitro* ou *in vivo*. A ingestão de MBV ou ABV como primeira dieta, em ensaios de curta duração com ratos, afetou a glicemia pós-prandial de uma segunda dieta padrão, o que não foi observado com rações contendo tais produtos em menor proporção. Por outro lado, em 28 dias as rações contendo MBV ou ABV causaram menor secreção de insulina em ilhotas pancreáticas, o que possibilita poupar as células β . Os resultados indicam que os produtos estudados têm grande potencial para serem utilizados na elaboração de alimentos destinados à prevenção de determinadas doenças crônicas não-transmissíveis, como diabetes tipo 2.

Palavras-chave: carboidratos não-disponíveis, amido resistente, fermentação colônica, glicemia.

ABSTRACT

The study of unavailable carbohydrates has been of great concern due to their proven benefits to health. This work aimed to characterize carbohydrates of unripe bananas, as well as to evaluate physiological effects of their unavailable carbohydrates over glucose tolerance, among other parameters related to it or to individuals' health in general. The unripe banana mass (MBV) (unripe banana cooked with peel) and the unripe banana starch (ABV) (isolated starch from the fruit *in natura*) were the main studied products. Short term assays were carried out with humans and rats, while medium term ones were realized with rats. In order to characterize the products and diets used in this work, several parameters were evaluated, such as quantifications of resistant starch (RS), dietary fiber (DF), indigestible fraction (IF) and the study of the *in vitro* fermentation profile. The physiological effects of the products and diets were evaluated through glycemic curves, glucose tolerance test (GTT), and lipidic and fermentative characteristics. The unripe banana products, as well as the diets elaborated with them, presented high amount of unavailable carbohydrates, in different quantity and quality, but all of them with high fermentative rates, signalized by an increase in short chain fatty acids (SFCA) production and decrease in pH on colonic fermentation carried out *in vivo* or *in vitro*. In the short term assays, the MBV and ABV intakes affected the postprandial glycemic response to a following diet in rats. Similar effect was not noticed in medium term assays after the intake of diets containing unripe banana products in lower proportions for 28 days. On the other hand, in this medium term assays, rats diets containing MBV or ABV lead to lower insulin secretion in isolated pancreatic islets, which may preserve β cells function. The results of this work point that the unripe banana products have great potential to be applied in special food elaboration aiming the prevention of some non-transmissible chronic diseases.

Key words: unavailable carbohydrates, glycemic response, resistant starch, colonic fermentation, glycemia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Diagrama de fluxo para a obtenção e purificação do amido de plátano verde em nível de planta piloto.....53
- Figura 2** - Comparação entre índices glicêmicos (IG) de diferentes produtos - ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA) ou com antibiótico (RCA).....111

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Curvas de reposta glicêmica ao pão e à banana madura (BM) como primeiras refeições – ensaio com humanos.....97
- Gráfico 2** - Curvas de reposta glicêmica ao pão e à massa de banana verde (MBV) como primeiras refeições – ensaio com humanos.....97
- Gráfico 3** - Curvas de reposta glicêmica ao pão e ao amido de banana verde (ABV) como primeiras refeições – ensaio com humanos.....98
- Gráfico 4** - Curvas de reposta glicêmica à banana madura (BM), à massa de banana verde (MBV) e ao amido de banana verde (ABV) como primeiras refeições – ensaio com humanos.....98
- Gráfico 5** - Curvas de resposta glicêmica ao pão, como segunda refeição, após pão ou amido de banana verde (ABV) como primeira refeição - ensaio com humanos.....102
- Gráfico 6** - Curvas de resposta glicêmica ao pão, como segunda refeição, após pão ou massa de banana verde (MBV) como primeira refeição - ensaio com humanos.....103
- Gráfico 7** - Curvas de resposta glicêmicas ao pão e à massa de banana verde (MBV) como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA).....105
- Gráfico 8** - Curvas de resposta glicêmica ao pão e ao amido de banana verde laboratorial (ABV-L) como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA).....105
- Gráfico 9** - Curvas de resposta glicêmica ao pão e à massa de banana verde (MBV) como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados com antibiótico (RCA).....106

Gráfico 10 - Curvas de resposta glicêmica ao pão e ao amido de banana verde (ABV-L) como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados com antibiótico (RCA).....	107
Gráfico 11 - Curvas de resposta glicêmica ao pão (a), à massa de banana verde (MBV) (b) e ao amido de banana verde laboratorial (ABV-L) (b) como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA) ou com antibiótico (RCA).....	108
Gráfico 12 - Curvas de resposta glicêmica a diferentes produtos como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA).....	109
Gráfico 13 - Curvas de resposta glicêmica a diferentes produtos como primeiras dietas - ensaio com ratos tratados com antibiótico (RCA).....	109
Gráfico 14 - Curvas de resposta glicêmica ao pão como segunda dieta, após pão ou amido de banana verde (ABV-L) como primeira dieta - ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA).....	112
Gráfico 15 - Curvas de resposta glicêmica ao pão como segunda dieta, após pão ou amido de banana verde (ABV-L) como primeira dieta - ensaio com ratos tratados com antibiótico (RCA).....	113
Gráfico 16 - Curvas de resposta glicêmica ao pão como segunda dieta, após pão ou massa de banana verde (MBV) como primeira dieta - ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA).....	113
Gráfico 17 - Curvas de resposta glicêmica ao pão como segunda dieta, após pão ou massa de banana verde (MBV) como primeira dieta - ensaio com ratos tratados com antibiótico (RCA).....	114

Gráfico 18 - Correlação entre as respostas glicêmicas à massa de banana verde (MBV) em ratos e humanos em 30, 60, 90 e 120 minutos de glicemia pós-prandial.....	116
Gráfico 19 - Curva de crescimento dos ratos.....	122
Gráfico 20 - Consumo diário de ração.....	123
Gráfico 21 - Umidade de pool de fezes dos primeiros quatro dias de cada semana.....	124
Gráfico 22 - Peso médio de fezes secas diárias em cada semana.....	125
Gráfico 23 - Evolução das curvas glicêmicas em resposta ao pão branco administrado por sonda gástrica ao longo do ensaio.....	126
Gráfico 24 - Curvas de resposta glicêmica do teste de tolerância à glicose (TTG).....	129
Gráfico 25 - Curvas de resposta insulínica do teste de tolerância à glicose (TTG).....	129
Gráfico 26 - pH do conteúdo cecal de ratos alimentados com diferentes rações por 28 dias.....	132
Gráfico 27 - Umidade do conteúdo cecal de ratos alimentados com diferentes rações por 28 dias.....	133
Gráfico 28 - Conteúdo cecal seco de ratos alimentados com diferentes rações por 28 dias..	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Componentes das rações.....	55
Tabela 2 -	Idade e índice de massa corporal (IMC) dos voluntários selecionados.....	68
Tabela 3 -	Classificação dos grupos e sua primeira dieta em ensaio de curta duração com ratos.....	72
Tabela 4 -	Principais intervenções em cada etapa do ensaio de média duração com ratos.....	75
Tabela 5 -	Quantificação de amido resistente (AR), amido disponível (AD) e amido total (AT) de banana verde crua.....	82
Tabela 6 -	Quantificação de amido resistente (AR), amido disponível (AD) e amido total (AT) de amido de banana verde (ABV) e amido de banana verde laboratorial (ABV-L).....	84
Tabela 7 -	Quantificação de amido resistente (AR), amido disponível (AD) e amido total (AT) de massa de banana verde (MBV) obtida por diferentes formas de cocção e armazenamento.....	85
Tabela 8 -	Proporção de amido resistente (AR) e amido disponível (AD) em banana verde e seus produtos.....	87
Tabela 9 -	Umidade da massa de banana verde (MBV) e do amido de banana verde (ABV).....	88
Tabela 10 -	Quantificação de frações de amido e fibra alimentar de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde (ABV).....	88
Tabela 11 -	Quantificação de fração indigerível (FI) solúvel, insolúvel e total de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde (ABV).....	89
Tabela 12 -	Cálculo teórico do teor de carboidratos não-disponíveis de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde (ABV).....	89

Tabela 13 - Fermentabilidade <i>in vitro</i> de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde (ABV) calculada por diferentes parâmetros.....	92
Tabela 14 - Perfil dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos na fermentação <i>in vitro</i> de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde (ABV).....	93
Tabela 15 - Perfil de fermentação <i>in vitro</i> da massa de banana verde (MBV) realizada em diferentes laboratórios.....	94
Tabela 16 - Fermentabilidade <i>in vitro</i> da massa de banana verde (MBV) calculada por análise em diferentes laboratórios.....	95
Tabela 17 - Resposta glicêmica a diferentes produtos como primeiras refeições – ensaio com humanos.....	96
Tabela 18 - Índice glicêmico (IG) de diferentes produtos - ensaio com humanos.....	100
Tabela 19 - Comparação entre respostas glicêmicas ao pão como segunda refeição, após pão ou amido de banana verde (ABV) como primeira refeição – ensaio com humanos.....	101
Tabela 20 - Comparação entre respostas glicêmicas ao pão como segunda refeição, após pão ou massa de banana verde (MBV) como primeira refeição – ensaio com humanos.....	103
Tabela 21 - Comparação das áreas abaixo da curva (AAC) de resposta glicêmica a pão como segunda dieta após primeira dieta com diferentes produtos – ensaio com humanos....	103
Tabela 22 - Resposta glicêmica a diferentes produtos como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA).....	105
Tabela 23 - Resposta glicêmica a diferentes produtos como primeiras dietas - ensaio com ratos tratados com antibiótico (RCA).....	106
Tabela 24 - Índice glicêmico (IG) de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde laboratorial (ABV-L) - ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA) ou com antibiótico (RCA).....	110
Tabela 25 - Respostas glicêmicas ao pão como segunda dieta, após pão, massa de banana verde (MBV) ou amido de banana verde (ABV-L) como primeira dieta – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA) ou com antibiótico (RCA).....	112

Tabela 26 - Comparação das áreas abaixo da curva (AAC) de resposta glicêmica ao pão como segunda dieta após primeira dieta com diferentes produtos – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA) e com antibiótico (RCA).....	114
Tabela 27 - Teor das frações de amido e fibra alimentar (FA) das rações.....	117
Tabela 28 - Cálculo teórico do teor de carboidratos não-disponíveis das rações.....	118
Tabela 29 - Teores das frações indigeríveis (FI) presentes nas rações.....	118
Tabela 30 - Composição centesimal das rações.....	119
Tabela 31 - Fermentabilidade <i>in vitro</i> das rações.....	120
Tabela 32 - Perfil de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos na fermentação <i>in vitro</i> das rações.....	120
Tabela 33 - Peso médio dos ratos.....	122
Tabela 34 - Comparação das áreas abaixo da curva (AAC) de resposta glicêmica a pão como segunda dieta após primeira dieta com diferentes produtos – ensaio de média duração com ratos.....	126
Tabela 35 - Áreas glicêmicas (AG), insulínicas (AI) e sua relação AG/AI no teste de tolerância à glicose (TTG).....	128
Tabela 36 - Peso de diferentes partes do ceco de ratos alimentados com diferentes rações por 28 dias.....	131
Tabela 37 - Proporção molar dos principais ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em relação ao total produzido no ceco de animais alimentados com diferentes rações por 28 dias.....	135
Tabela 38 - Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos no ceco de animais alimentados com diferentes rações por 28 dias.....	135
Tabela 39 - Aumento da produção de insulina em ilhotas de Langerhans isoladas em resposta a soluções de glicose 5,6mM (referência 100%) e 16,7mM.....	137

Tabela 40 - Perfil lipídico dos ratos em jejum de 8 horas.....138

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
1.1	Resposta glicêmica.....	27
1.2	Carboidratos e síndrome metabólica.....	30
1.3	Índice glicêmico (IG).....	31
1.4	“Efeito segunda refeição”	34
1.5	Fermentação colônica.....	35
1.6	Amido resistente (AR).....	41
1.7	Banana : economia e nutrição.....	44
1.8	Contextualização do presente trabalho.....	47
2	OBJETIVOS.....	49
2.1	Objetivos gerais.....	49
2.2	Objetivos específicos.....	49
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1	Banana (<i>Musa spp.</i>) e seus produtos	51
3.1.1	Banana madura (BM).....	51
3.1.2	Banana verde em pasta.....	51
3.1.3	Banana verde fatiada.....	51
3.1.4	Massa de banana verde (MBV).....	51
3.1.5	Amido de banana verde laboratorial (ABV-L).....	52

3.1.6	Amido de banana verde (ABV).....	53
3.2	Rações.....	54
3.2.1	Ração comercial do Biotério da FCF/IQ-USP.....	54
3.2.2	Ração controle (R-Controle).....	54
3.2.3	Ração experimental MBV (R-MBV).....	54
3.2.4	Ração experimental ABV (R-ABV).....	54
3.3	Outros alimentos.....	55
3.3.1	Pão branco.....	55
3.3.2	Feijão.....	56
3.4	Análises químicas e bioquímicas.....	56
3.4.1	Quantificação de amido resistente (AR).....	56
3.4.2	Amido disponível (AD).....	57
3.4.3	Amido total (AT).....	58
3.4.4	Quantificação de fibra alimentar (FA).....	58
3.4.5	Quantificação de fração indigerível (FI).....	58
3.4.6	Isolamento de fração indigerível (FI).....	60
3.4.7	Fermentação <i>in vitro</i>	60
3.4.8	Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).....	62
3.4.9	Quantificação de glicose plasmática.....	63
3.4.10	Quantificação de insulina plasmática.....	64
3.4.11	Quantificação de lipídios plasmáticos.....	64

3.4.12	Determinação de índice glicêmico (IG).....	64
3.5	Análise estatística.....	65
4	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	67
4.1	Ensaio de curta duração com humanos.....	67
4.1.1	Determinação de índice glicêmico (IG).....	68
4.1.2	Estudo do “efeito segunda refeição”.....	69
4.2	Ensaio de curta duração com animais.....	70
4.2.1	Fase de adaptação.....	70
4.2.2	Fase experimental.....	71
4.2.3	Determinação de índice glicêmico (IG).....	72
4.2.4	Estudo do “efeito segunda dieta”.....	73
4.3	Ensaio de média duração com animais.....	73
4.3.1	Parâmetros avaliados periodicamente.....	74
4.3.2	Estudo do “efeito segunda dieta”.....	75
4.3.3	Teste de tolerância à glicose (TTG).....	76
4.3.4	Avaliação de secreção de insulina em ilhotas de Langerhans isoladas.....	77
4.3.5	Perfil lipídico.....	78
4.3.6	Coleta de tecido cecal.....	78
4.3.7	Fermentação <i>in vivo</i>	78
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
5.1	Quantificação das frações de amido dos produtos de banana verde.....	82

5.2	Perfil de carboidratos da massa de banana verde (MBV) e do amido de banana verde (ABV).....	87
5.3	Perfil da fermentação <i>in vitro</i> da massa de banana verde (MBV) e do amido de banana verde (ABV).....	90
5.3.1	Comparação interlaboratorial.....	94
5.4	Ensaio de curta duração com humanos.....	96
5.4.1	Caracterização de carboidratos dos produtos ingeridos por humanos.....	96
5.4.2	Resposta glicêmica de humanos a uma primeira refeição.....	96
5.4.3	Índice glicêmico em humanos.....	99
5.4.4	“Efeito segunda refeição” em humanos.....	101
5.5	Ensaio de curta duração com animais.....	104
5.5.1	Resposta glicêmica de ratos a uma primeira dieta.....	104
5.5.2	Índice glicêmico (IG) em ratos.....	110
5.5.3	“Efeito segunda dieta” em ratos.....	111
5.6	Correlação de resultados obtidos nos ensaios de curta duração com humanos e com animais.....	115
5.7	Caracterização química das rações utilizadas no ensaio de média duração em animais.....	116
5.7.1	Análise da composição das rações.....	116
5.8	Perfil da fermentação <i>in vitro</i> das rações preparadas para ensaio de média duração com ratos.....	119
5.9	Ensaio de média duração com animais.....	121
5.9.1	Peso dos ratos.....	121

5.9.2	Consumo de ração.....	123
5.9.3	Fezes: peso e umidade.....	124
5.9.4	“Efeito segunda dieta”	126
5.9.5	Teste de tolerância à glicose (TTG).....	128
5.9.6	Fermentação <i>in vivo</i> e características cecais.....	130
5.9.7	Secreção de insulina em ilhotas de Langerhans isoladas.....	136
5.9.8	Perfil lipídico.....	137
6	CONCLUSÃO.....	141
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC	Área abaixo da curva
ABV	Amido de banana verde (plátano)
ABV-L	Amido de banana verde laboratorial (nanica)
AD	Amido disponível
AG	Área glicêmica
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AI	Área insulínica
AR	Amido resistente
AR1	Amido resistente tipo 1: amido fisicamente inacessível
AR2	Amido resistente tipo 2: grânulos de amido resistentes
AR3	Amido resistente tipo 3: amido retrogradado
AR4	Amido resistente tipo 4: amido quimicamente modificado
AT	Amido total
BM	Banana madura (nanica)
b.s.	Base seca
b.i.	Base integral
DP	Desvio padrão
EP	Escola Politécnica
FA	Fibra alimentar

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (Continuação)

FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FI	Fração indigerível
G-ABV	Grupo de ratos alimentados com R-ABV
G-Controle	Grupo de ratos alimentado com R-Controle
G-MBV	Grupo de ratos alimentados com R-MBV
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IG	Índice glicêmico
MBV	Massa de banana (nanica) verde
R-ABV	Ração com amido de banana verde
R-Controle	Ração controle AIN93-G
R-MBV	Ração com massa de banana verde
RCA	Ratos tratados com antibiótico
RSA	Ratos tratados sem antibiótico
SEM	Erro padrão da média
TTG	Teste de tolerância à glicose
USP	Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As recentes mudanças nos hábitos de alimentação e atividade física têm resultado em alterações nos mecanismos reguladores do metabolismo humano, sendo evidenciado um crescente desequilíbrio entre a ingestão energética e o gasto de energia relacionado com a atividade física. Paralelamente, um significativo número de doenças crônicas não-transmissíveis está diretamente relacionado com estas mudanças de comportamento (SARIS et al., 1998; WHO/FAO, 2003).

Hábitos alimentares podem ser modificados para exercerem impacto positivo na prevenção e tratamento destas doenças. Diversas hipóteses têm sido propostas nos últimos anos. Em particular, tem sido sugerido que o estado de hiperglicemia, observado após a ingestão de certos regimes alimentares, pode constituir um fator de risco para o desenvolvimento de diversas alterações metabólicas. Este é o caso de pacientes com controle glicêmico não eficiente, como ocorre no diabetes mellitus, e também pode ser verdadeiro para indivíduos saudáveis. Dessa forma, acredita-se ser conveniente reduzir a amplitude e a duração da hiperglicemia pós-prandial (SARIS et al., 1998; DANONE VITAPOLE/FAO, 2001).

Cada vez mais, tem sido necessária e pesquisada a introdução de mudanças habituais simples no estilo de vida que possam ser adotadas pela população em geral e que tenham efeito significativo na correção de fatores metabólicos que contribuem para a tolerância à glicose desajustada e diabetes (BRYNES et al., 2005).

Existem tabelas de composição de alimentos direcionadas para diabéticos as quais, em sua maioria, ainda se baseiam nas características químicas dos alimentos. Entretanto, tem sido mostrado que muitas vezes tais características não são suficientes para prever a resposta fisiológica a estes alimentos (JENKINS et al., 1981).

1.1 Resposta glicêmica

Em indivíduos saudáveis, a concentração normal de glicose no sangue é habitualmente entre 80-90mg/100ml pela manhã, após jejum de 10h. A glicemia se eleva no estado pós-prandial e após 3 a 4 horas da ingestão de alimentos é cerca de 90mg/100ml. O aumento na 2ª hora nunca ultrapassa 140mg/100ml, nos indivíduos normais. Portanto, duas horas após a ingestão de carboidratos, por mecanismo de *feedback*, ocorre rápido retorno da concentração de glicose sangüínea aos níveis basais. À medida que os tecidos metabolizam a glicose, sua concentração sangüínea diminui e as células α liberam glucagon, que estimula a degradação do glicogênio e liberação de glicose do fígado. Tal efeito pode às vezes ser observado já no final das duas horas posteriores à refeição causando uma leve elevação da curva de resposta glicêmica (GUYTON; HALL, 2000).

O controle do nível de glicemia é importante por diversas razões. O excessivo aumento da concentração de glicose no sangue, normalmente quando ultrapassa o limite de transporte máximo (TM), provoca diurese osmótica levando à perda de glicose na urina, podendo resultar em depleção de líquidos e eletrólitos do corpo. Além disso, o aumento da glicemia e a hiperlipidemia em longo prazo pode causar lesões em tecidos e vasos sangüíneos incluindo infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência renal crônica e cegueira (GUYTON; HALL, 2000).

Por outro lado, quando a alimentação não fornece glicose suficiente para o organismo, a gliconeogênese hepática produz a quantidade necessária de glicose para manter ao menos o nível de glicemia de jejum em valores normais por alguns dias.

Em jejum prolongado, quando a secreção de insulina é mínima, a degradação de gordura e a clivagem do glicogênio já são acentuadas. A lipase hormônio-sensível é fortemente ativada provocando hidrólise de triacilgliceróis e, conseqüentemente, liberação de grande quantidade de ácidos graxos e glicerol no sangue circulante. Em poucos minutos a

concentração plasmática de ácidos graxos livres aumenta e estes passam a ser o principal substrato para quase todos os tecidos do corpo (GUYTON; HALL, 2000).

Após 12 horas de jejum, a liberação de ácidos graxos se intensifica no tecido adiposo, a captação de glicose pelos músculos é diminuída e estes passam a degradar ácidos graxos para a produção de energia.

A resposta glicêmica a uma refeição é determinada tanto por características pessoais (sensibilidade à insulina, atividade das células β pancreáticas, motilidade gastrointestinal, atividade física, metabolismo decorrente de refeições anteriores e outro parâmetros diariamente variáveis) como por características da refeição (volume, forma/aparência, fonte biológica e digestibilidade do amido, quantidade de carboidratos totais, açúcares, proteínas, lipídios, fibra, antinutrientes e acidez).

Os carboidratos da dieta são constituintes majoritários que influenciam no controle da glicemia. Entretanto, o impacto da dieta de carboidratos no metabolismo da glicose depende não somente da quantidade consumida, como se acreditava no passado, mas de uma série de propriedades específicas dos alimentos que podem modificar os efeitos metabólicos. Entre estas propriedades dos carboidratos estão a velocidade de absorção, tipo de monômeros absorvidos, extensão da absorção, extensão e velocidade da fermentação colônica e local e produtos da fermentação colônica. Estas importantes propriedades dos alimentos, fontes de carboidratos, que alteram o metabolismo da glicose e resultam em reduzidas respostas glicêmicas podem ser utilizadas na produção de alimentos funcionais com reduzida resposta glicêmica pós-prandial, isto é com baixo índice glicêmico (SARIS et al., 1998; FOLKS; FULLER; GIBSON, 1999).

Tratamentos físico-químicos podem ter impacto significativo no perfil de digestibilidade do amido. A quantidade de amido que chega ao cólon e a resposta glicêmica pós-prandial de um alimento fonte de carboidratos são altamente influenciadas pelos meios de

processamento além de outras características do alimento (MUIR et al., 1995; GRANFELDT; ELIASSON; BJÖRCK, 2000).

A razão entre mono-, di- e polissacarídeos não é de importância nos efeitos sobre a glicemia pós-prandial uma vez que a atividade da α -amilase e das dissacaridasas no duodeno são suficientes para hidrolisar o amido e dissacarídeos em minutos. O conteúdo de proteína e lipídios, embora possa influenciar nos valores de glicose pós-prandial, tem menor significado clínico devido à pequena magnitude destes efeitos. De maior importância, são os fatores contidos nos alimentos capazes de interferir no processo de digestão e absorção dos carboidratos no intestino e assim reduzir a resposta glicêmica aos alimentos ricos em carboidratos. Entre estes fatores podemos citar: quantidade de carboidratos; natureza dos monossacarídeos (glicose, frutose, galactose); natureza do amido (amilose/amilopectina); interação amido-nutrientes; presença de amido resistente; grau de gelatinização e retrogradação do amido; tamanho da partícula; estrutura da parede celular e outros componentes dos alimentos (lipídios, proteína, fibra alimentar, antinutrientes e ácidos orgânicos) (FAO/WHO, 1998; MENEZES; LAJOLO, 2006).

A partir das observações de que os carboidratos de diferentes fontes são digeridos e absorvidos de forma diferenciada, a velocidade de digestão pode ser considerada um relevante critério para a avaliação do aproveitamento dos carboidratos (FAO/WHO, 1998). Nesse sentido, Englyst et al. (2003), classificaram os carboidratos em carboidratos de lenta digestão e carboidratos de rápida digestão.

Os carboidratos de lenta digestão proporcionam aumento de glicose e insulina plasmática moderado após refeição com elevada quantidade de carboidrato e permitem a prolongada entrada de glicose na corrente sanguínea (DANONE VITAPOLE/FAO, 2001) e têm mostrado eficácia no controle da saciedade, da resistência à insulina e dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídios (MENEZES; LAJOLO, 2006). Além disso, outros

aspectos qualitativos dos carboidratos, como o conteúdo de fibra alimentar, são apontados como protetores contra doenças cardiovasculares (PEREIRA et al., 2004).

1.2 Carboidratos e síndrome metabólica

A síndrome metabólica é caracterizada pela associação de fatores de risco cardio-metabólicos. Tais fatores incluem a obesidade, resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertensão e dislipidemia. O fator de risco dominante para esta síndrome parece ser a obesidade abdominal e a resistência à insulina. Pessoas com síndrome metabólica se encontram em elevado risco de desenvolver doença coronária e diabetes tipo 2 (BERGE et al., 2005).

O diabetes mellitus é definido como um estado de deficiência de produção ou falta de ação da insulina gerando diminuição da utilização periférica da glicose (glicólise) e aumento da glicogenólise e da gliconeogênese (produção hepática). O diabetes tipo 2 envolve defeitos na secreção de insulina que podem ser provenientes da diminuição de sua secreção pelas células β , em consequência da evolução de tais defeitos ao longo de 5 a 10 anos em humanos (CHACRA; DIB, 2003).

O tratamento do diabetes tipo 2 é recomendado principalmente através de manuseio alimentar e implementação de atividade física. No caso de medicamentos, os principais são os sensibilizadores e os estimuladores de insulina. Os sensibilizadores atuam aumentando a sensibilidade dos tecidos periféricos, principalmente hepático, enquanto os estimuladores aumentam a liberação de insulina endógena. Ao recorrer a medicamentos, é dada preferência ao tratamento através de sensibilizadores, pois os estimuladores, apesar de melhorarem a tolerância à glicose, são criticados pelo risco de levarem as células β à exaustão (CHACRA; DIB, 2003).

A prevenção do diabetes tipo 2 ainda é um dos maiores desafios da saúde pública no século XXI. Estudos mostram que programas de exercícios físicos e dietas controladas não somente são eficazes em retardar ou prevenir a doença, mas também apresentam melhor custo-eficiência que qualquer droga para seu tratamento (DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH GROUP, 2002).

Estudos clínicos, laboratoriais e de observação já propõem que a glicemia pós-prandial deveria ser minimizada mesmo em casos de concentração de glicose de jejum em níveis normais (DECODE STUDY GROUP, 1999; HEINE et al., 2004). A relação entre o risco de doenças cardiovasculares com a glicemia é mais forte em relação à glicemia pós-prandial de 1 e/ou 2 horas do que em relação à glicemia de jejum, seja em sujeitos tolerantes ou intolerantes à glicose (DECODE STUDY GROUP, 1999). Neste contexto, estudos quanto à quantidade e qualidade dos carboidratos de dietas vêm sendo realizados visando a preservação da função das células β (BRAND-MILLER, 2004).

1.3 Índice glicêmico (IG)

A observação de que alimentos ricos em determinados carboidratos produzem menor resposta glicêmica pós-prandial que outros, gerou o conceito de que a seleção adequada de alimentos pode representar uma boa estratégia para a prevenção e tratamento de determinadas doenças crônicas não-transmissíveis.

Como é impossível determinar diretamente as características nutricionais dos carboidratos que são de lenta ou de rápida digestão foram criados marcadores apropriados como o índice glicêmico (IG), carga glicêmica (CG), entre outros. Estes marcadores facilitam a seleção de alimentos de acordo com o tipo de carboidratos presentes e a resposta glicêmica produzida.

Define-se índice glicêmico (IG) como a medida do aumento potencial da glicose sanguínea produzida por alimentos fontes de carboidratos; este permite a classificação dos alimentos baseada na resposta glicêmica pós-prandial em relação a um alimento referência (pão branco ou glicose) (JENKINS et al., 1981; FAO/WHO, 1998; BROUNS et al. 2005). Esse índice mostra como cada alimento comporta-se em termos de velocidade de digestão e absorção e permite comparar a resposta glicêmica produzida pelos alimentos quando consumidos após diferentes tratamentos, como por exemplo, condições diversas de preparo e armazenamento (CARUSO; MENEZES, 2000; CARRERA; LAJOLO; MENEZES, 2004; MENEZES; LAJOLO, 2006).

A carga glicêmica (CG), conceito proposto em 1997 (SALMERON et al., 1997), mede o impacto glicêmico da dieta e é calculada pela multiplicação do IG do alimento pela quantidade de carboidrato disponível contido na porção consumida deste alimento.

Muitos estudos têm mostrado que a seleção dos alimentos de acordo com o IG tem impacto significativo sobre numerosos aspectos da fisiologia e metabolismo humano, podendo contribuir para a prevenção e controle de obesidade, diabetes, síndrome de resistência à insulina, doenças coronarianas, bem como podendo influenciar no desempenho físico e mental (FAO/WHO, 1998; WHO/FAO, 2003).

A dieta com baixo IG e baixa CG tem efeitos benéficos sobre vários aspectos metabólicos e fisiológicos envolvidos nas doenças crônicas não-transmissíveis (FAO/WHO, 1998; AUGUSTIN et al., 2002; BRAND-MILLER, 2003; LUDWIG, 2003) e grande parte destes efeitos pode ser extrapolado para as dietas com carboidratos de lenta digestão, uma vez que os alimentos de baixo IG contêm elevado conteúdo desta fração. Algumas formas de amido são pouco digeridas pelo organismo humano, outras, inclusive, não são digeridas no intestino delgado (caso do amido resistente) podendo ser fermentadas no intestino grosso.

O IG e a CG são considerados indicadores da taxa de absorção de carboidratos e, logo, podem ser marcadores da demanda de insulina (JENKINS et al., 1981; FRANCESCHI et al., 2001). Tais indicadores têm sido associados ao câncer cólon-retal, de seio, de ovário, de endométrio e, recentemente, com câncer gástrico (AUGUSTIN et al., 2002; AUGUSTIN et al., 2004).

Está bastante documentado que dietas com alimentos de reduzido IG aumentam o controle metabólico em pacientes diabéticos e diminuem a resistência à insulina (AUGUSTIN et al., 2002; BRAND-MILLER, 2003). Outros estudos mostram que essas dietas têm efeito benéfico no metabolismo de lipídios e outros fatores de risco de doenças cardiovasculares (BJÖRCK; 1996; FROST et al., 1996). Em relação à obesidade, o consumo de alimentos de baixo IG proporciona maior período de saciedade comparado ao proporcionado por alimentos de alto IG, podendo representar importante ferramenta em regimes de controle de peso (ROBERTS, 2000; DANONE VITAPOLE/FAO, 2001; WHO/FAO, 2003).

Jenkins et al., (1981) mostraram que grandes diferenças nos valores de IG podem ser vistas não somente entre diferentes grupos de alimentos, mas também entre alimentos de um mesmo grupo, como no caso do grupo dos cereais, onde o pão integral exibe um IG = 72% enquanto o macarrão integral apresenta IG = 48%.

Os principais carboidratos que não são digeridos no organismo (fibra alimentar ou polissacarídeos não-amido, amido resistente e oligossacarídeos) não são os determinantes da produção de reduzidos IGs *per se*. Entretanto, muitos alimentos que causam tal efeito são ricas fontes destes carboidratos. Os possíveis efeitos dos carboidratos não-disponíveis no metabolismo da glicose podem estar relacionados com diferentes eventos que ocorrem no trato gastrointestinal superior. Entre os quais, pode ser mencionada a redução da motilidade intestinal e/ou absorção dos carboidratos devido às propriedades viscosas dos componentes da fibra alimentar ou a redução da velocidade de digestão e/ou absorção dos carboidratos

decorrente da encapsulação do substrato por parede celular. Por outro lado, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos na fermentação colônica dos carboidratos não-disponíveis estão relacionados com efeitos sistêmicos no metabolismo da glicose e dos lipídios (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991). Assim, tem sido mencionado que a fermentação dos carboidratos leva a uma diminuição dos níveis de glicemia de jejum e aumenta a tolerância à glicose pela supressão dos níveis de ácidos graxos não esterificados e da produção de glicose hepática (THORBURN; MUIR; PROIETTO, 1993).

1.4 “Efeito segunda refeição”

A hiperglicemia está relacionada com a resistência à insulina uma vez que a primeira aumenta demasiadamente a produção de insulina nas células β . A secreção elevada e constante deste hormônio diminui a capacidade de resposta das células β tornando-as menos sensíveis a maiores aumentos de glicose sangüínea. O pâncreas detecta alta glicemia constantemente, produzindo alta taxa de insulina na mesma frequência (GUYTON; HALL, 2000). Este mecanismo pode deixar de ser eficiente uma vez que o número de receptores de insulina é limitado e, sob novo aumento de glicemia, sua capacidade pode estar esgotada. Estes efeitos se acentuam com o tempo podendo levar a resistência à insulina e ao diabetes tipo 2. Este, geralmente se desenvolve após os 40 anos de idade (CHACRA; DIB, 2003).

Brynes et al. (2005), realizaram experimentos em humanos quantificando por 24h a glicemia basal e a glicemia após 7 a 10 dias de ingestão de dietas de baixo IG. Foi relatado que as concentrações de glicose sangüínea foram reduzidas em 5% ao longo do dia e 16% à noite, sugerindo que o consumo freqüente de dietas de baixo IG melhora a sensibilidade à insulina hepática, diminuindo a liberação de glicose hepática efetivamente. Anteriormente, o grupo também havia mostrado que pacientes com diabetes tipo 2 tratados com insulina

tiveram 30% de redução na área da curva glicêmica de 24h pós-prandial após ingerirem dietas de baixo IG por uma semana (BRYNES et al., 2003).

O efeito cumulativo de dietas com reduzido IG, além de diminuir a liberação de insulina na fase aguda pós-prandial, pode estimular a produção colônica de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), uma vez que são freqüentemente fontes de carboidratos de lenta digestão ou que não são digeridos. Frost et al. (1998), mostraram que três semanas de dieta de baixo IG causaram um aumento na sensibilidade à insulina em mulheres com risco de doenças coronárias. Dietas de alto IG não somente produzem maiores flutuações na glicemia e insulinemia pós-prandiais, mas também estimulam a produção de vários hormônios contra-regulatórios como epinefrina e norepinefrina que podem diminuir agudamente a sensibilidade à insulina (WOLEVER, 1990).

A produção de AGCC, pela fermentação de certos compostos de lenta digestão/absorção, pode explicar os benefícios observados na glicemia de jejum e na tolerância à glicose no desjejum quando precedido de uma refeição noturna com reduzido IG (THORBURN; MUIR; PROIETTO, 1993). Alguns trabalhos afirmam que maior tolerância à glicose pode ser observada já na segunda refeição de um mesmo dia se no desjejum forem ingeridas determinadas refeições de baixo IG (LILJEBERG; AKERBERG; BJÖRCK, 1999). Tal mecanismo é chamado “efeito segunda refeição” (LILJEBERG; BJÖRCK, 2000).

1.5 Fermentação Colônica

A fermentação colônica consiste basicamente na degradação anaeróbia por bactérias microbianas de componentes da dieta e outros componentes endógenos que não são digeridos por enzimas intestinais nem absorvidos no trato gastrintestinal superior. Entre os principais fatores que determinam o processo fermentativo podem ser citadas a quantidade e estrutura

dos substratos disponíveis, a quantidade e as espécies de bactérias colônicas e o tempo de contato entre as bactérias e o substrato (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

Em relação ao substrato, este é constituído da chamada “fração indigerível” (FI) da dieta, bem como uma porção considerável de mucina, células epiteliais, enzimas e outros produtos de origem endógena (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991). A fração indigerível é composta, em sua maior parte, de amido resistente, fibra alimentar, proteína resistente, oligossacarídeos, lipídios, polifenóis e outros componentes associados (SAURA-CALIXTO et al., 2000; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

Um conceito relacionado com a fração indigerível é o conceito de prebióticos. Em 1995, os prebióticos foram definidos como ingredientes não-digeríveis de alimentos que afetam benéficamente o hospedeiro por estimulação seletiva de crescimento e/ou atividade de uma ou um número limitado de bactérias no cólon, melhorando a saúde do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Gibson (2004), um dos próprios autores da primeira definição de prebióticos, propôs uma definição mais rígida para a caracterização de ingredientes ou componentes alimentares como prebiótico. Segundo proposto, para ser um prebiótico deve haver demonstração científica de que o componente ou ingrediente alimentar resiste aos processos de digestão, absorção e adsorção do hospedeiro, que seja fermentado pela microflora colonizando o trato gastrointestinal e estimule o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias dentro do trato gastrointestinal. Além disso, as demonstrações finais devem ser realizadas *in vivo*, seja em animais ou humanos.

Existem dois tipos principais de fermentação colônica: a sacarolítica e a proteolítica. A atividade sacarolítica é mais favorável do que a proteolítica devido ao tipo de metabólitos e produtos finais formados. Os principais produtos finais da fermentação sacarolítica são os AGCC (GIBSON, 2004). A concentração total de AGCC no intestino grosso varia entre 20-150mM/L e 83-95% deles são constituídos por acetato, propionato e butirato

(NORDGAARD; MORTESEN, 1995; TOPPING; CLIFTON, 2001). Os ácidos graxos de cadeia ramificada, isobutírico, 2-metil-butírico e isovalérico resultam fundamentalmente da fermentação proteolítica (MACFARLANE et al, 1992). Todos os AGCC contribuem para as necessidades energéticas diárias do hospedeiro e estimulam o fluxo sanguíneo colônico, bem como a utilização de fluidos e eletrólitos (TOPPING; CLIFTON, 2001; GIBSON, 2004).

Quanto à flora bacteriana colônica, esta pode variar conforme diversas condições do hospedeiro desde o nascimento. No adulto, a flora bacteriana é influenciada pela alimentação, pelo código genético, pelo meio em que a pessoa vive, pelo uso de antibióticos, por stress, por infecções, pela idade, pelo clima, pelo trânsito intestinal e por doenças em outros órgãos como o fígado ou rim.

O microsistema da flora intestinal é composto de microorganismos benéficos, patogênicos e neutros. A flora intestinal é, portanto, formada de 90% de microorganismos anaeróbicos, bacteróides e bifidobactérias. As bifidobactérias produzem vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂, ácido nicotínico, ácido fólico e biotina. Além disso, têm efeito protetor sobre o fígado, ao evitar o predomínio de organismos patogênicos, produtores de substâncias tóxicas. Com isso, diminuem o trabalho do fígado de purificar as substâncias absorvidas pelo intestino delgado. No intestino grosso, as bifidobactérias fermentam os carboidratos que não foram digeridos no intestino delgado e formam gases (hidrogênio, dióxido de carbono, oxigênio, amônia, metano), produzem ácido lático e ácidos graxos de cadeias curta (AGCC) (GUYTON; HALL, 2000; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001; TOPPING; CLIFTON, 2001).

Alguns alimentos podem contribuir para a mudança ou para o controle das características da flora bacteriana. FULLER (1989) definiu como probióticos os suplementos alimentares que contêm microorganismos vivos que, suplementados constantemente na dieta, afetam benéficamente o organismo animal, atuando no equilíbrio de sua microbiota intestinal.

Havenaar e Huis In't Veld (1992) consideraram que os probióticos são culturas únicas ou mistas de microrganismos que, administrados a animais ou humanos, produzem efeitos benéficos no hospedeiro por incremento das propriedades da microbiota nativa. Esses autores restringiram o uso desse termo a produtos que contenham microrganismos viáveis que promovem a saúde de humanos ou animais, e que exercem seus efeitos no trato digestório, no trato respiratório superior ou no trato urogenital.

Schrezenmeir e De Vrese (2001), por sua vez, propuseram que o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização de um sistema do hospedeiro, e que produzem efeitos benéficos à saúde.

Os AGCC, principais produtos da fermentação colônica, são ácidos relativamente fracos ($pK_a \sim 4,8$) e o aumento de sua produção reduz o pH do meio. O pH no cólon proximal costuma ser maior do que no ceco e cólon distal. No ceco e cólon distal a concentração dos AGCC é maior por haver alta concentração da microbiota, conseqüência da maior disponibilidade de substratos (TOPPING; CLIFTON, 2001). O pH é reduzido de forma inversamente proporcional aos níveis de microbiota e AGCC, sendo 5,4-5,9 no cólon transversal e aumentando gradualmente a 6,6-6,9 no cólon distal (NORDGAARD; MORTENSEN, 1995).

No pH normal do cólon humano (5,5-7,5), 50% dos AGCC se encontram em forma dissociada. Embora os AGCC sejam o produto majoritário em $pH > 6,0$, ácido láctico é produzido em $pH < 6,0$ e succinato é produzido em $pH < 5,0$, mas são encontrados em quantidades muito menores do que o acetato, propionato e butirato em qualquer pH (TOPPING; CLIFTON, 2001).

Alguns efeitos dos AGCC talvez sejam decorrentes mais da diminuição do pH intracolôn-retal do que de alguma ação de um AGCC específico. Em pH = 6, os ácidos biliares encontram-se protonados e insolúveis não sendo assim absorvidos pelos colonócitos (RAFTER et al., 1986). Em pH mais baixo ainda, acontece inibição da conversão de ácidos biliares primários a secundários por bactérias (MACDONALD et al., 1978; NAGENGAST et al., 1988), diminuindo assim seu potencial carcinogênico.

A quantificação dos AGCC produzidos na fermentação colônica pode ser feita de diversas formas, entretanto algumas são criticadas. Nos experimentos em humanos geralmente é utilizada a quantificação de AGCC nas fezes, entretanto, menos de 5% dos AGCC produzidos estão presentes nas fezes, devido à grande absorção dentro do cólon. Mesmo assim, este é um método pouco invasivo e, apesar de não fornecer valores absolutos confiáveis, pode indicar a proporção dos AGCC produzidos, uma vez que estes são absorvidos em taxas semelhantes ao longo do intestino grosso. A quantificação mais prejudicada neste método é a de butirato, por estar presente geralmente em menor proporção que acetato e propionato, podendo até mesmo não ser identificado (TOPPING; CLIFTON, 2001).

Em humanos, também é possível realizar medidas de fermentação em indivíduos ileostomizados, por intubação de voluntários (ENGLYST; CUMMINGS, 1985; LIVESEY et al., 1995) ou mesmo por métodos indiretos como *breath tests* ou medida de flatulências (FLOURIÉ et al., 1988; CHRISTL et al., 1992).

A medida de produção evolutiva de gases na respiração (*breath H₂ evolution*) também tem sido utilizada, mas proporciona valores extremamente limitados uma vez que produção de gás não é indicativo da produção de AGCC. Além disto, alguns indivíduos não produzem H₂, tornando a relação entre evolução da produção de gás e de AGCC algo impossível (GELISSEN; ALLGOOD; EASTWOOD, 1994). Alguns estudos mostram que o consumo de

determinados carboidratos fermentáveis reduz ou não modifica a produção de H₂ na respiração, apesar das evidências de maior produção de AGCC *in vitro* (BOUHNİK et al, 1997; FLICK; PERMAN, 1989).

A quantificação de AGCC no sangue venoso é difícil pela pequena quantidade destes no sangue. Geralmente apenas acetato é eficientemente quantificado, entretanto, propionato e butirato são de igual ou até maior importância metabólica (TOPPING; CLIFTON, 2001).

A estimativa da quantidade de AGCC no trato digestório deve ser criteriosa. Os AGCC são absorvidos tão rapidamente pelo epitélio colônico que seus efeitos benéficos na verdade só agem *in situ*. Seria de grande valia a determinação da localização exata da fermentação do amido, uma vez que assim se poderia interferir na sua velocidade de digestão ou de fermentação em porções distais específicas do trato digestório.

Como a quantificação da fermentação colônica *in vivo* em humanos é difícil, modelos em animais têm sido muito usados. Os roedores parecem ter menor valor que cães e porcos para tais modelos. A fisiologia e trânsito gastrintestinais mais próximos dos humanos, características da fermentação e alimentação também similar à nossa, fazem do porco um animal mais recomendado para tais estudos (TOPPING; ILLMAN; TAYLOR, 1985; VAREL, 1987). Por outro lado, a microflora de porcos parece ter uma menor disposição à produção de butirato comparado à de humanos (TOPPING; ILLMAN; TAYLOR, 1985) e a quantidade de bactérias no intestino grosso de porcos pode ser aumentada diversas vezes por fatores que incluem idade, dieta e diferenças genéticas (VAREL, 1987). Logo, porcos são bons modelos animais para investigação do destino, mas não quantificação dos AGCC, e mesmo assim várias características do animal devem ser rigorosamente controladas.

Diversas peculiaridades fisiológicas e metabólicas dos ratos têm sido criticadas para uso dos mesmos em estudos de fermentação colônica (TOPPING; ILLMAN; TAYLOR, 1985; TOPPING et al., 1993). Ainda assim, a fermentação *in vivo* é bastante avaliada em ratos

(MARTIN; DUMON; CHAMP, 1998) devido às menores limitações de espaço necessário para a pesquisa, ao pequeno porte dos animais, baixo custo relativo e ampla disponibilidade (TOPPING; CLIFTON, 2001).

A fermentação *in vitro* envolve basicamente incubação de fração indigerível com inóculo fecal ou cecal e pode prover valiosas informações, desde que diversas precauções sejam tomadas, principalmente para diminuir a variabilidade dos doadores do inóculo (TOPPING; CLIFTON, 2001). O meio tamponante, o tamanho e a origem do inóculo, o tempo de fermentação e o tipo de amido geralmente são bem diferentes nos diversos modelos propostos (BARRY et al., 1995; ENGLYST; HAY; MACFARLANE, 1987; MORTENSEN; HOLTUNG; RASMUSSEN, 1988; WYATT; HORN, 1988). Diferenças tanto quantitativas quanto qualitativas também já foram encontradas dependendo de onde a fermentação aconteceu, na flora cecal ou fecal (cecal > fecal) (MONSMA; MARLETT, 1995).

1.6 Amido resistente (AR)

O amido resistente (AR) é definido como amido e produtos da hidrólise do amido que não são absorvidos no intestino delgado (ASP et al., 1994). Este amido pode ocorrer por várias razões, como a origem biológica, a estrutura química, aquecimento e resfriamento do alimento, modificação química, mastigação, entre outras. O AR tem sido identificado como o principal substrato para a microflora intestinal humana e parece ter uma participação no organismo humano semelhante à da fibra alimentar. A ingestão de AR na Europa e América Latina é reduzida (ao redor de 3-6g/dia) se comparada ao consumo de outros continentes como a Ásia (8-19g/dia) (MENEZES; GIUNTINI; LAJOLO, 2001; CAMBRODÓN, 2001). Entretanto, existe considerável potencial para o aumento da ingestão deste nutriente através de

alimentos e produtos alimentícios com elevado teor de amido resistente (MENEZES; LAJOLO, 2000).

De acordo com Champ et al., (2003), o termo amido resistente (AR) engloba basicamente 4 tipos de amido:

- AR1: amido fisicamente inacessível; encontrado em grãos e sementes parcialmente triturados devido à presença de paredes celulares rígidas; o cocção e a preparação do alimento são de grande importância para o conteúdo deste tipo de amido;

- AR2: grânulos de amido resistentes à hidrólise enzimática; presente na batata crua e banana verde;

- AR3: amido retrogradado, ou seja, com cadeias de amido recristalinizadas após gelatinização sem secagem posterior imediata; formado em alimentos processados (pão e *corn flakes*) e em alimentos cozidos e resfriados (batata cozida) (CUMMINGS; ENGLYST, 1995; BJÖRCK, 1996; ROSIN; LAJOLO; MENEZES, 2002); a fração linear do amido, a amilose, é facilmente retrogradada, enquanto a amilopectina requer um tempo muito mais longo para que o processo ocorra;

- AR4: amido quimicamente modificado, incluindo éteres e ésteres de amido bem como “amidos de ligação cruzada”.

Dependendo da quantidade de cada um destes tipos de AR no alimento, os carboidratos serão aproveitados de forma variada.

Embora o AR seja analiticamente quantificado na fração insolúvel dos carboidratos, este composto se comporta fisiologicamente como fibra solúvel (HARALAMPU, 2000), representando uma fonte de carboidratos não-disponíveis para a microflora colônica. Os AGCC (acetato, propionato, butirato), decorrentes da fermentação dos carboidratos não-disponíveis, estão relacionados com inúmeros efeitos benéficos sobre o metabolismo e manutenção da saúde (BJÖRCK, 1996). Logo, o AR tem menos efeito sobre o volume fecal

do que polissacarídeos não-amido, principalmente se comparado com a fibra insolúvel, mas dados epidemiológicos sugerem que o primeiro tem um papel mais importante na proteção contra o câncer cólon-retal, possivelmente via butirato (TOPPING; CLIFTON, 2001; NOAKES et al., 1996; MUIR et al., 2004)

O conteúdo de AR na dieta influencia também no aproveitamento energético do alimento uma vez que este não é digerido no intestino delgado (LIVESEY, 1990). Entretanto, a atividade da microflora colônica e a produção de AGCC no intestino grosso são capazes de minimizar perdas de energia (CUMMINGS; ENGLYST, 1987). A diminuição da disponibilidade energética tem importantes implicações no tratamento de doenças como obesidade e diabetes tipo 2. Outras possíveis conseqüências do AR atingir o intestino grosso como fração indigerível são o aumento do bolo fecal (CUMMINGS et al., 1992; SHETTY; KURPAD, 1986) e mudanças no pH fecal (FLOURIE et al., 1986). Tais efeitos possuem grandes implicações sobre disfunções como constipação, diverticulites, hemorróidas e mesmo câncer de cólon (MUIR et al., 1995).

Há diversas formas de como o conteúdo de AR dos alimentos pode influenciar na resposta glicêmica e no metabolismo da glicose. Inicialmente, somente a fração disponível do amido tem potencial para aumentar a resposta glicêmica pós-prandial. Assim, alimentos que contêm elevado teor de AR possuem menores quantidades de amido disponível em relação ao amido total, e são ingredientes interessantes para a elaboração de produtos alimentícios visando atenuar o aumento da resposta glicêmica ao alimento.

O AR, que não é digerido, tem a capacidade de prolongar o período de saciedade (RABEN et al., 1994; BJÖRCK, 1996).

Outra influência no metabolismo em geral está relacionada com os AGCC, produzidos durante a fermentação do AR, que podem aumentar a tolerância à glicose na refeição posterior.

Os resultados de estudos do efeito do AR sobre os lipídios séricos em humanos são conflitantes. Alguns apontam um decréscimo no colesterol sérico total e nos triacilgliceróis, enquanto outros mostram um aumento na concentração de colesterol sérico total (REISER et al., 1989; BEHALL et al., 1989; BEHALL; HOWE, 1995; FROST et al., 1999).

A fermentação *in vitro* do AR tem mostrado que este causa aumento na proporção de butirato (ENGLYST; MACFARLANE, 1986; MACFARLANE; ENGLYST, 1986; WEAVER et al., 1992) e diminuição da excreção fecal de ácidos biliares secundários (VAN MUNSTER; NAGENGAST, 1993; HYLLA et al., 1998).

As bactérias colônicas humanas fermentam o amido resistente (AR) e os polissacarídeos não-amido produzindo principalmente ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (acetato, propionato e butirato). A fermentação de alguns tipos específicos de AR favorece ainda mais alguns de seus efeitos no cólon (ANNISON; TOPPING, 1994; BERGGREN et al., 1995; WANG et al., 1999; WEAVER et al., 1992).

A velocidade de fermentação do AR é variável de acordo com o tipo de AR (1, 2, 3 ou 4). Alguns tipos desaparecem em um total de 24h de fermentação *in vitro* e produzem altas concentrações de nC4. Outros são mais resistentes à fermentação bacteriana não chegando a fermentação total em até 24h (MARTIN; DUMON; CHAMP, 1998). Topping et al. (1997) sugerem que o RS2 é mais rapidamente fermentado quando comparado com outros tipos de AR.

1.7 Banana: economia e nutrição

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de banana, com uma produção de 6,47 milhões de toneladas por ano – cerca de 9,5% da produção mundial (EMBRAPA, 2005). A banana é cultivada de Norte a Sul do Brasil, tendo grande expressão econômica e elevado alcance social. É uma cultura bastante versátil, capaz de ser cultivada em diferentes

ambientes, produz o ano todo e é mantenedora da fertilidade do solo, o que a torna interessante para produção por pequenos produtores, que utilizam a banana como um recurso adicional. As regiões Nordeste e Sudeste do Brasil respondem por 67% da produção nacional.

O setor de bananicultura gera hoje mais de 500 mil empregos diretos no país. Muito apreciada no Brasil e no mundo, a banana é a quarta cultura agrícola mais importante do planeta, atrás apenas do arroz, do trigo e do milho. Além disso, tem ainda enorme importância social, pois é uma fonte barata de energia, minerais e vitaminas.

Embora seja uma das principais frutas brasileiras exportadas, a banana está longe de liderar as exportações para os países mais desenvolvidos, que possuem os mercados mais exigentes do mundo. Segundo a FAO (2002), sua participação no mercado externo ainda é pouco significativa, apenas 0,1 milhões de toneladas é exportada, ou seja 1% do total. O produto nacional, de modo geral, é desqualificado para os mercados europeus e norte-americanos, pois não atende às exigências dos mesmos, principalmente em relação às qualidades organolépticas da banana (MATTHIESEN; BOTEON, 2003).

Este contexto é decorrente, principalmente, da defasagem nas normas de qualidade e a falta de compatibilidade com os padrões básicos vigentes nos mercados compradores da fruta *in natura*.

Além das quantidades exportadas mínimas, o desperdício das bananas no Brasil é alto, devido às perdas pós-colheita e ao descarte de banana, chegando a 40% da produção. Isto porque a fruta não se enquadra em padrões de aceitabilidade também do consumidor brasileiro. Além do mais, grande parte da colheita nacional se perde antes de chegar ao consumidor final, o que representa um significativo desperdício.

Por outro lado, a banana verde é mais facilmente transportada e seu armazenamento pode ser feito por mais tempo do que o da banana já madura. Por estes motivos, a banana

verde vem sendo considerada um produto ideal para ser industrializado, além de apresentar elevado teor amido (60-80%) fonte de AR e com reduzida concentração de açúcares.

Cordenunsi et al., (2000) verificaram que as farinhas de banana verde de 8 cultivares, apresentam consideráveis teores de amido resistente, variando entre 25 e 33%. Estes teores mostram que a banana verde é uma fonte alternativa nacional para a ingestão de AR, bem como uma matéria prima potencial para a elaboração de produtos alimentícios com amido de reduzida digestibilidade.

O amido resistente tipo 2, presente na banana verde, apresenta uma reduzida susceptibilidade à amilase tanto *in vitro* quanto *in vivo* em ratos e humanos (ASP et al., 1994; FAISANT et al., 1995). Faisant et al., (1995) verificaram, por técnica de intubação em indivíduos saudáveis, que o amido da banana verde é pouco digerido no intestino delgado. Semelhantes resultados foram observados por Englyst et al., (1996) empregando técnicas *in vitro* e *in vivo* com indivíduos ileostomizados.

A aplicação de AR da banana verde na elaboração de produtos é de interesse, tanto para a indústria de alimentos, como para o consumidor (WARING, 1998, LAJOLO et al., 2001). O AR pode ser utilizado como fonte de fibra alimentar, uma vez que apresenta efeitos fisiológicos semelhantes aos da fibra e devido ao seu reduzido valor energético, pode ser empregado como complemento na formulação de produtos com reduzido teor de lipídios e/ou açúcares. Ao mesmo tempo, o AR possui propriedades funcionais específicas, particularmente, sua reduzida capacidade de absorver água (ao contrário da fibra solúvel) permite que este ingrediente funcional seja empregado sem grandes modificações e ajustes na formulação de produtos e sua coloração branca, tamanho pequeno de partículas e *flavor* brando possibilitam a formulação de produtos com maior palatabilidade que os elaborados com fibra alimentar.

1.8 Contextualização do presente trabalho

O Projeto de Cooperação Internacional CYTED/CNPq XI.18 “Composição, Estrutura, Propriedades Biológicas de Carboidratos e sua Utilização em Alimentos” e o Projeto 106PI0297 “Bases Científicas e Tecnológicas para Produção de Alimentos Funcionais a partir de plátano/banana verde” (2006-2009) têm estimulado o estudo de fontes regionais potenciais de carboidratos. A banana tem sido uma das frutas amplamente estudadas nestes projetos, através de pesquisas sobre informações químicas, estrutural, tecnológicas e fisiológicas.

Neste contexto, o presente estudo contou com o apoio destes dois projetos de cooperação internacional no sentido de possibilitar a troca de informações científicas, produtos e métodos analíticos com outros grupos de pesquisa Ibero-americanos. Foi estudado o efeito de bananas em diferentes estados de maturação e sob diferentes processamentos sobre efeitos fisiológicos relacionados com o controle da tolerância à glicose, considerando a fermentação de tais produtos como uma das alternativas para elucidar tal controle.

Um dos produtos de banana aqui estudados (amido de banana verde) foi elaborado e fornecido pelo Instituto Politécnico Nacional, Yauatepec, Morelos (México), visando ampliar as pesquisas conjuntas entre os integrantes destes projetos. A maioria das bananas obtidas para a realização do presente trabalho também foi fornecida por entidades envolvidas neste projeto (Associação de Bananicultores do Vale do Ribeira – SP). Além disso, um dos métodos analíticos (fermentação *in vitro*) foi implantado no laboratório de pesquisa local (Laboratório de Química Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, FCF/USP) graças a um estágio no *Departamento de Nutrición da Universidad Complutense de Madrid* (Espanha), o que também foi patrocinado pelo primeiro projeto.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Estudar os carboidratos não-disponíveis na banana verde e sua relação com a tolerância à glicose a curto e médio prazo.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o conteúdo de amido resistente e outros carboidratos não-disponíveis em produtos derivados de banana e plátano verificando o efeito da manipulação e do processamento sobre o teor de amido resistente.

Avaliar a resposta glicêmica de banana madura e produtos de banana verde.

Avaliar o “efeito segunda refeição” de produtos de banana verde, em animais (ratos) e humanos.

Avaliar o efeito de rações com alto teor de carboidratos não-disponíveis, provenientes de banana verde, sobre parâmetros relacionados à tolerância à glicose, em ensaios de média duração com animais (ratos).

Avaliar o perfil da fermentação *in vitro* e *in vivo* de produtos de banana verde.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Banana (*Musa spp.*) e seus produtos

3.1.1 Banana madura (BM)

Banana nanica (*Musa spp. cv. Nanica*) *in natura*, madura (casca totalmente amarela), descascada.

As bananas foram fornecidas pelo Comércio de Frutas Jaguaré do CEAGESP.

3.1.2 Banana verde em pasta

Banana nanica (*Musa spp. cv. Nanica*) verde, descascada, homogeneizada com solução de ácido ascórbico 1% (100mL/100g banana) ou somente em água, seca em estufa ventilada (60°C) e triturada.

As bananas foram fornecidas pelo Comércio de Frutas Jaguaré do CEAGESP.

3.1.3 Banana verde fatiada

Banana nanica (*Musa spp. cv. Nanica*) verde, descascada, fatiada em solução de ácido ascórbico 1% (100mL/100g banana) ou somente em água, seca em estufa ventilada (60°C) e triturada.

As bananas foram fornecidas pelo Comércio de Frutas Jaguaré do CEAGESP.

3.1.4 Massa de banana verde (MBV)

Bananas nanicas (*Musa spp. cv. Nanica*) verdes foram lavadas com água, sabão e hipoclorito. Em seguida, as bananas foram cozidas por 8 minutos com condições variáveis a fim de verificar o efeito do processamento sobre algumas características nutricionais. As condições variadas foram:

- em autoclave (60L) sem pressão ou em “panela doméstica” com pressão (4,5L);
- com casca ou sem casca;
- imersas em água ou somente em contato com vapor.

Após o cozimento, as frutas foram descascadas, homogeneizadas, algumas utilizadas em seguida e outras armazenadas a 4°C por 16h para verificação do efeito de tal armazenamento sobre o teor de amido resistente. A massa foi então seca em estufa ventilada (60°C) e triturada.

As bananas foram fornecidas pela Associação de Bananicultores do Vale do Ribeira (SP).

3.1.4.1 Produção de massa de banana verde (MBV) em grande escala

A MBV foi obtida em grande escala com a colaboração do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP (EP/USP) e da Associação de Bananicultores do Vale do Ribeira.

As bananas foram lavadas com água, sabão e hipoclorito em tanques industriais e em seguida foram cozidas, ainda com casca, em autoclave sem pressão, imersas em água (100°C), por aproximadamente 8 minutos. Em seguida, as bananas foram manualmente descascadas, trituradas em moinho industrial e secas em estufa ventilada a 60°C. Após a secagem, a MBV foi novamente triturada em moinho com peneira de baixa granulometria.

3.1.5 Amido de banana verde laboratorial (ABV-L)

Bananas nanicas (*Musa* spp. cv. Nanica) verdes (tipo I) foram descascadas e homogeneizadas com solução gelada (4°C) de ácido ascórbico 1%. O homogeneizado foi filtrado a vácuo sob tela de Nylon e reservado a 4°C/16h para decantação do amido. O sobrenadante foi descartado e o amido foi seco a vácuo em *speedvac*. O isolamento foi

realizado pelo Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, FCF/USP.

As bananas foram fornecidas pelo Comércio de Frutas Jaguaré do CEAGESP.

3.1.6 Amido de banana verde (ABV)

Amido de plátano (*Musa paradisíaca* L.) verde isolado em escala piloto, segundo o método descrito por Flores-Gorosquera et al., (2004) (Figura1). O isolamento do amido foi realizado pelo Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos, México.

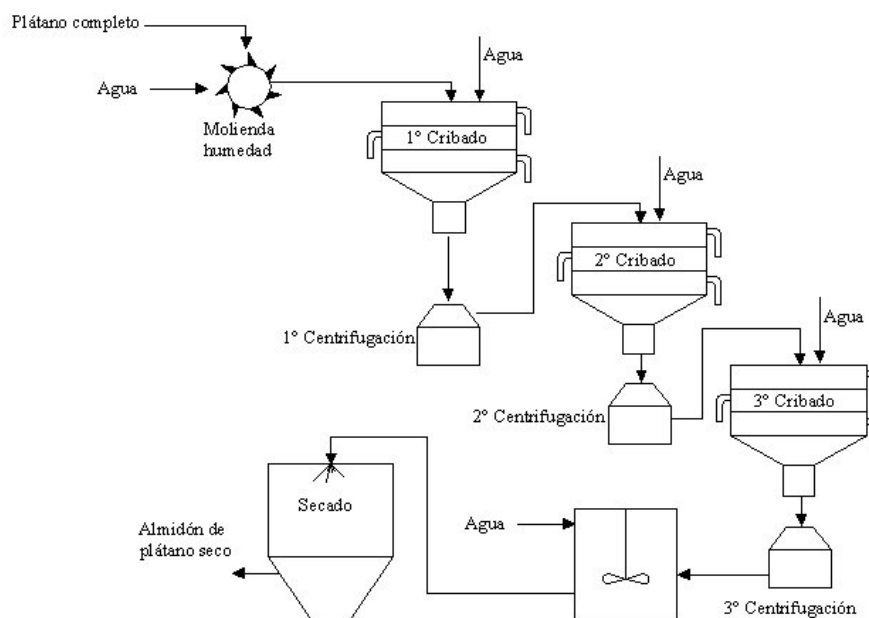


Figura 1 - Diagrama de fluxo para a obtenção e purificação do amido de plátano verde em nível de planta piloto
Fonte: FLORES -GOROSQUERA et al. (2004).

As bananas utilizadas para o isolamento do amido no México foram obtidas no comércio local de tal país, sendo que na região o subgrupo plátano é o mesmo denominado “terra” no Brasil (PACHECO-DELAHAYE; TESTA, 2005). O produto final foi fornecido para uso neste trabalho como parte do Projeto de Cooperação Internacional CYTED/CNPq XI.18.

3.2 Rações

3.2.1 Ração comercial do Biotério da FCF/IQ-USP

Ração comercial Nuvital[®] descontaminada por irradiação gama.

3.2.2 Ração controle (R-Controle)

Ração elaborada pela empresa Rhoster Ind. e Com. Ltda. de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* para dietas AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY Jr, 1993) (Tabela 1).

3.2.3 Ração experimental MBV (R-MBV)

Ração elaborada pela empresa Rhoster Ind. e Com. Ltda. de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* para dietas AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY Jr, 1993), com o amido de milho substituído por massa de banana verde (MBV) produzida em grande escala (item 3.1.4.1) (Tabela 1).

3.2.4 Ração experimental ABV (R-ABV)

Ração elaborada pela empresa Rhoster Ind. e Com. Ltda. de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* para dietas AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY Jr, 1993), com parte do amido de milho substituído por amido de banana verde (ABV) (item 3.1.6) (Tabela 1).

As rações foram preparadas e utilizadas dentro do prazo de validade, que é de aproximadamente três meses a 4°C ou seis meses a -20°C (REEVES; NIELSEN; FAHEY Jr, 1993).

Tabela 1 - Componentes das rações

Ingredientes (g/kg ração)	R-Controle	R-MBV	R-ABV
Caseína ¹	200,0	200,0	200,0
Óleo de soja	70,0	70,0	70,0
L-cisteína	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina ²	2,5	2,5	2,5
Mistura vitamínica ³	10,0	10,0	10,0
Mistura mineral ⁴	35,0	35,0	35,0
<i>Carboidratos</i>			
Sacarose	100,0	100,0	100,0
Amido de milho	529,5	-	362,8
MBV (para AR = 5% da ração)	-	579,5	-
ABV (para AR = 10% da ração)	-	-	166,7
<i>Fibra alimentar</i>			
Celulose microcristalina ⁵	50,0	-	50,0
Fibra inerente à MBV	-	100,0	-

¹ Contendo no mínimo 85% de proteína; ² 41,1% de colina; ³ AIN-93-VX; ⁴ AIN-93G-MX;

⁵ Solka-Floc, 200 FCC, FS&D, St. Louis, MO (90 a 95% de celulose, 5 a 10% de hemicelulose e 5% de umidade). RControle = ração controle AIN93-G; RMBV = ração com massa de banana verde; R-ABV = ração com amido de banana verde.

3.3 Outros alimentos

3.3.1 Pão branco

O pão branco foi utilizado para determinações estudos de resposta glicêmica *in vivo*. O alimento foi obtido no comércio local (padaria fixa), onde é denominado “pão francês”.

Para sua utilização em ensaios com animais, o pão foi seco em estufa ventilada (60°C), triturado, tamisado (60 mesh) e diluído em água (100mg/mL) para administração por sonda gástrica.

3.3.2 Feijão

O feijão utilizado como padrão de análises de amido resistente foi o feijão carioca, marca Camil. O feijão foi cozido sem pressão, em água, por tempo suficiente para consumo, isto é, por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, foi seco em estufa ventilada (60°C), triturado e tamisado (60 mesh).

3.4 Análises químicas e bioquímicas

3.4.1 Quantificação de amido resistente (AR)

O amido resistente foi quantificado baseado no método AOAC 2002.02 (McCLEARY; MONAGHAN, 2002; McCLARY; McNALLY; ROSSITER, 2002), com adaptações. Todas as amostras a serem analisadas foram secas e tamisadas (60 mesh).

Triplicatas de 100mg de amostra foram analisadas em tubos de plástico (50mL) graduados, de fundo cônico, com tampa. As amostras foram pré-lavadas duas vezes com 8mL de etanol 80% (v/v), centrifugadas (3000rpm) por 10 minutos e os sobrenadantes foram reservados em balões volumétricos de 50mL fechados e refrigerados a 4°C para posterior quantificação de amido disponível. Aos 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), a-amilase (300U/mL, sigma A-3176) e pepsina (500U/mL, Sigma P-7012). Os tubos contendo os resíduos em solução foram agitados, tampados e incubados a 37°C por 16h sob agitação.

Após a incubação, foram adicionados 8mL de etanol 99% e os tubos foram agitados e centrifugados (3000rpm) por 10 minutos, sem tampa. A lavagem com etanol 99% se repetiu mais uma vez e então os sobrenadantes foram combinados com os já reservados em balões refrigerados a 4°C para quantificação de amido disponível.

Com os tubos contendo resíduos parcialmente submersos em banho de gelo, com barras de agitação e sob agitação magnética, foram adicionados 3mL de KOH 2M e deixados sob agitação. Após 20 minutos, foram adicionados 10mL de tampão NaAc/HAc 1,2M (pH = 3,8), as barras de agitação foram removidas e a agitação magnética cessada. O pH foi rapidamente verificado e, se necessário, ajustado com solução de NaOH ou HCl para pH = 4,75. Imediatamente foram adicionados 0,1mL de amiloglicosidase (3200U/mL de tampão NaAc/HAc, pH = 4,75), os tubos foram agitados, tampados e incubados em banho sob agitação a 50°C por 30 minutos.

Após a incubação, os tubos tiveram o volume de solução completado a 20mL com água Milli-Q e então foram centrifugados (3000rpm) por 10 minutos. No sobrenadante foi determinado o teor de glicose livre pelo método enzimático glicoseoxidase/peroxidase/ABTS (BERGMEYER; BERNET, 1974). Para amostras contendo teor de AR superior a 10%, após a incubação a 50°C, a solução contendo resíduo foi diluída a 100mL com água Milli-Q e 20mL desta solução diluída foram então centrifugados e analisados como descrito para as outras amostras.

O feijão carioca (item 3.3.2) foi utilizado como padrão das análises.

3.4.2 Amido disponível (AD)

O amido disponível foi quantificado baseado no método AOAC 2002.02 (McCLEARY; MONAGHAN, 2002; McCLARY; McNALLY; ROSSITER, 2002), com adaptações.

Os balões contendo sobrenadantes reservados a 4°C, obtidos como mencionado no item 3.4.1, tiveram seu volume completado a 50mL com água Milli-Q. No sobrenadante foi determinado o teor de glicose livre pelo método enzimático glicoseoxidase/peroxidase/ABTS (BERGMEYER; BERNET, 1974). Para amostras contendo teor de AD superior a 20%, o

volume do balão foi completado a 100mL com água Milli-Q e o restante da determinação de glicose foi seguido como descrito anteriormente.

O feijão carioca (item 3.3.2) foi utilizado como padrão das análises.

3.4.3 Amido total (AT)

O amido total foi quantificado baseado no método AOAC 2002.02 (McCLEARY; MONAGHAN, 2002; McCLEARY; McNALLY; ROSSITER, 2002), ou seja, foi calculado como sendo a soma dos teores de AR e AD de cada réplica.

3.4.4 Quantificação de fibra alimentar (FA)

As amostras utilizadas foram previamente secas, tamisadas (60 mesh) e desengorduradas. Os conteúdos de fibra solúvel, insolúvel e total foram determinados pelo método enzimico-gravimétrico AOAC 991.43 (LEE; PROSKY; DEVRIES, 1992) com modificações propostas por McCleary e Rossiter (2004).

O método é baseado na determinação do resíduo resultante da eliminação do amido e da proteína de amostras previamente desengorduradas, através de hidrólise alcalina, hidrólise enzimática e posterior precipitação das fibras solúveis na presença de etanol 78%. As modificações no método se referem a um pré-tratamento das amostras com DMSO em banho a 100°C por 30 minutos para eliminar interferências do conteúdo de amido resistente possivelmente envolvido na matriz da fibra.

3.4.5 Quantificação de fração indigerível (FI)

A fração indigerível das amostras foi determinada baseada nos métodos propostos por Saura-Calixto et al. (2000) e Serrano, Goñi e Saura-Calixto (2005), com modificações. As amostras utilizadas foram previamente secas, tamisadas (60 mesh) e desengorduradas.

Em tubos de ensaio de 30mL, previamente secos e tarados, foram pesados 300mg de amostra, em triplicatas. Foram adicionados 8mL de tampão KCl/HCl 0,1M (pH = 1,5) para homogeneização das amostras em homogeneizador (Brinkmann, Polytron) e em seguida 0,2mL de pepsina (65000U/mL tampão KCl/HCl 0,1M, pH = 1,5). Os tubos foram tampados, agitados e incubados em banho-agitação a 40°C por 60 minutos.

Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 4M (aproximadamente 150µL). Em seguida, foram adicionados 8mL de tampão trismaleato/NaOH 0,1M (pH = 7,0) contendo 5mg de pancreatina (Sigma P-1750), 14mg de lipase (Sigma L-3126), 35mg de extrato de bile de porco (Sigma B-8631) e 120mg de α -amilase (Sigma A3176). Os tubos foram tampados, agitados e incubados em banho sob agitação a 37°C por 16 horas.

Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e centrifugadas (3000rpm) 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 e centrifugados novamente, sendo este ciclo repetido por duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados e os resíduos reservados.

Fração indigerível insolúvel – para a quantificação da FI insolúvel, os tubos de vidro identificados contendo os resíduos foram colocados em estufa a 105°C por 18h. Quando retirados, foram reservados em dessecadores e pesados assim que atingiram a temperatura ambiente. Os teores de FI insolúvel foram calculados gravimetricamente.

Fração indigerível solúvel – para a quantificação da FI solúvel, o pH dos sobrenadantes foi ajustado para 4,75 com HCl 1M. Em seguida foi adicionado 1mL de amiloglicosidase (12mg/mL tampão NaAc/HAc 1,2M, pH = 4,75), os tubos foram tampados, agitados e incubados em banho sob agitação a 60°C por 45 minutos. Após a incubação, as soluções foram dialisadas 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 o período de 48h de diálise. Os dialisados foram então transferidos para frascos de vidro de boca larga de 50mL previamente secos e tarados. Os frascos contendo os dialisados foram colocados em estufa a 105°C por 36h. Quando retirados, foram reservados em dessecadores e pesados assim que atingiram a temperatura ambiente. Os teores de FI solúvel foram calculados gravimetricamente.

Fração indigerível total – a FI total foi calculada pela soma de FI insolúvel e FI solúvel de cada réplica.

Farinha de centeio integral foi utilizada como padrão.

3.4.6 Isolamento de fração indigerível (FI)

A fração indigerível foi isolada baseada na quantificação da FI descrita no item 3.4.5, com modificações. A quantidade de amostra inicial a ser isolada foi equivalente à necessária para obtenção de 0,8g de FI e as soluções e enzimas adicionadas foram aumentadas proporcionalmente. A FI foi obtida de forma total, combinando-se os resíduos finais de FI insolúvel e os dialisados com FI solúvel, antes de serem secos em estufa. A secagem então foi feita a vácuo em *speedvac*. A FI seca foi então congelada a - 20°C até sua utilização.

3.4.7 Fermentação *in vitro*

Para avaliar o processo de fermentação *in vitro* o método foi baseado nas propostas de Cambrodón e Martín-Carrón (2001) e Serrano, Goñi e Saura-Calixto (2005), com modificações.

As amostras utilizadas foram sempre frações indigeríveis (FI) isoladas de acordo com a descrição feita no item 3.4.6.

Foram preparadas seis réplicas de 100mg de fração indigerível de cada amostra em frascos de vidro de 50mL secos e tarados. Uma triplicata das amostras foi preparada para ser indicativa de 0h de fermentação e a outra triplicata para indicar 24h de fermentação. Brancos de fermentação (frascos sem amostra) e padrão (Lactulose – Sigma L-7877) também foram incluídos. As frações indigeríveis contidas nos frascos de fermentação foram hidratadas com 8mL de meio de fermentação (MF) ativado e anaeróbio. Os frascos foram tampados com septos de borracha, agulhas de entrada e saída de gás foram pinçadas nos septos com válvulas de três vias nas pontas e CO₂ foi borbuhlado por 1 minuto em cada frasco para certificação de que o meio estava anaeróbio. As válvulas foram fechadas e os frascos armazenados a 4°C por 16h.

No dia seguinte, os frascos de fermentação foram retirados da geladeira até que estivessem em temperatura ambiente. Foi preparado um inóculo com o conteúdo cecal de ratos Wistar machos, aproximadamente 300g de peso corpóreo, diluído (100g/L) em MF ativado e anaeróbio. O inóculo foi misturado em um homogeneizador de amostras Tipo 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 borbuhlado CO₂ por aproximadamente 1 minuto em cada frasco para garantir meio anaeróbio. Os frascos 24h tiveram as agulhas removidas dos septos que então foram revestidos com Parafilm[®] para evitar vazamentos de gases formados, e foram incubados a 37°C sob leve agitação por 24h.

Frascos 0h – os frascos foram destampados, foram adicionados 5mL de água Milli-Q, o pH foi verificado e em seguida foram adicionados mais 3mL de água (para lavar eletrodo) e 3mL de NaOH 1M, para parar a fermentação. Os frascos foram então 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 do

resíduo não fermentado (RNF) por gravimetria. Os sobrenadantes foram completados a 25mL com água Milli-Q e congelados para futura análise de AGCC.

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

3.4.8 Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Os AGCC produzidos por fermentações, tanto *in vitro* como *in vivo*, 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 5,00 mM.

Em tubos de microcentrífuga, foram preparados 0,5mL de solução contendo AGCC, 0,4mL de solução de PI e 0,1mL de HClO₄ em concentração tal que mantivesse o pH de todas as amostras ácido e semelhante. Os tubos de microcentrífuga foram centrifugados (12.000rpm) a 4°C por 15 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para *vials* adaptáveis em bandeja de injeção automática.

Ao contrário da fermentação *in vitro*, onde a solução obtida no final (sobrenadante contendo AGCC) é bem límpida, na fermentação *in vivo* é necessária uma etapa de

purificação do conteúdo cecal dos ratos (contendo os AGCC) para a obtenção de uma solução também suficientemente límpida para ser analisada em CG.

3.4.8.1 Purificação do conteúdo cecal para quantificação de AGCC obtidos *in vivo*

Foram pesados aproximadamente 500mg de conteúdo cecal, em duplicata, de cada rato e colocados em tubos de microcentrífuga previamente tarados contendo 750 μ L de solução HgCl₂ 1% (p/v) e 105 μ L de solução H₃PO₄ 5%. As amostras em solução foram homogeneizadas em Vortex e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para serem então armazenar a - 20°C até quantificação de AGCC. Para serem analisadas, as amostras foram descongeladas lentamente, homogeneizadas novamente em Vortex por 5 minutos e transferidas quantitativamente para tubos de centrífuga de 25ml com 6ml de água *Milli-Q*. A solução foi centrifugada a 10000rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi removido com agulha e seringa de 5ml. O sobrenadante foi filtrado com membrana de porosidade 0,8 μ m (Minisarts, Sartorius) para quantificação de AGCC em CG (Shäfer, 1994, com modificações).

3.4.9 Quantificação de glicose plasmática

A concentração de glicose sanguínea foi determinada pelo aparelho Accu-Check Advantage, Roche Diagnostics® (glicosímetro para diabéticos) ou pelo kit colorimétrico Labtest Diagnóstica SA (BROUNS et al., 2005). Foram tomadas alíquotas de sangue por punção da cauda, por canulação da jugular externa do animal (ratos) ou por punção da artéria abdominal.

3.4.10 Quantificação de insulina plasmática

A concentração de insulina sanguínea foi determinada por radioimunoensaio (*Rat Insulin RIA Kit, Linco Research Inc.*) no plasma que, após obtido, foi congelado a - 20°C e armazenado até a análise.

3.4.11 Quantificação de lipídios plasmáticos

O conteúdo sanguíneo de colesterol total, triglicéridos e HDL-colesterol foram quantificados empregando-se kits Labtest Diagnóstica S.A. no soro que, após obtido, foi congelado a -20°C e armazenado até a análise.

3.4.12 Determinação de índice glicêmico (IG)

O IG foi determinado de acordo com o método proposto pela FAO/WHO (1998) e por Wolever et al. (2003), com modificações. Para cada curva glicêmica individual de animal ou voluntário, a área incremental sob a curva foi calculada geometricamente, aplicando-se a regra trapezoidal e ignorando-se as áreas abaixo da linha do jejum. O valor da área total do pão foi determinado e considerado como referência (100%), e os valores das áreas calculadas para cada outro produto ou alimento foram expressos como porcentagem em relação à área do alimento referência (pão).

O conceito de índice glicêmico (IG) é aplicado à resposta glicêmica a 50g carboidratos disponíveis administrados, justamente para avaliar a disponibilidade destes (JENKINS et al., 1981; BROUNS et al., 2005).

No presente trabalho, a quantidade de alimento ou produto administrado se refere a uma porção deste que contenha 50g (para humanos) ou 2mg/g de peso corporal (para ratos) de amido total (AT). Esta modificação foi necessária por dois motivos: primeiro, em função do alto teor de fração indigerível (FI) nos produtos de banana verde estudados (amidos isolados e

massa de banana verde); segundo, para possibilitar a comparação entre as respostas glicêmicas aos produtos de banana verde e ao pão. Entretanto, os valores de IG obtidos para estes produtos não servem para comparação com resultados de bancos de dados de IG.

No caso da banana madura, onde o teor de amido total é representado pelo amido disponível, o cálculo da porção ingerida por humanos se refere à soma do amido total e dos açúcares solúveis. Dessa forma, o resultado obtido para o IG da banana madura, no presente trabalho, pode ser comparado com valores de outros bancos de dados, uma vez que a quantidade e qualidade dos carboidratos ingeridos foram as mesmas propostas pela definição de IG.

3.5 Análise estatística

Os dados analisados são paramétricos e, portanto, foram expressos como média \pm DP (desvio padrão) ou média \pm SEM (erro padrão da média). Os testes de correlação realizados foram feitos assumindo-se que $0,99 > |r| > 0,75$ indica correlação forte, $0,75 > |r| > 0,5$ indica uma correlação fraca e $|r| < 0,5$ indica correlação nula.

Para comparações de dois grupos experimentais foi utilizado o teste “t” de Student não pareado. Para comparações entre 3 grupos ou mais foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA). Como testes *post-hoc* foi utilizado o teste Tukey.

Na análise estatística dos dados do ensaio de média duração em ratos, as comparações foram feitas de cada grupo experimental com o grupo controle e não entre os grupos experimentais.

Quando o nível de significância (p) adotado foi $p < 0,01$, a diferença foi considerada muito significativa. Quando $0,01 < p < 0,05$, a diferença foi considerada significativa. E quando $0,05 < p < 0,10$, foi considerado que a diferença apresentou tendência à significância.

Como recurso para as análises foi utilizado o programa Statistica 5.0, StatSoft®.

4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Todos os experimentos *in vivo*, tanto com humanos quanto com ratos, foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) (Anexos A, B e C).

4.1 Ensaios de curta duração com humanos

Os ensaios foram realizados com indivíduos adultos e saudáveis. As características individuais relativas a sexo, idade, peso, estatura, índice de massa corporal (IMC) e as informações prestadas pelos mesmos (quanto ao desconhecimento de serem portadores de quaisquer doenças até a data do estudo e a informação de não estarem fazendo uso de quaisquer medicamentos) foram utilizadas na seleção dos indivíduos para participação no estudo. Para a inclusão no estudo, os indivíduos deveriam estar dentro da faixa de índice de massa corporal (IMC) de 18,5 - 24,9kg/m², classificados como eutróficos segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997) e não possuírem diagnóstico prévio de Diabetes Mellitus. Dos 27 homens e mulheres que se apresentaram, 23 voluntários foram selecionados e em cada experimento houve a participação de 9 a 14 indivíduos do grupo selecionado. Os dados dos candidatos selecionados estão na Tabela 2.

Antes dos experimentos, os indivíduos foram convocados para uma reunião preliminar para receberem todos os esclarecimentos necessários a respeito do estudo e orientações quanto às formalidades para a execução de estudos com humanos. Após esclarecimentos, assinaram o termo de consentimento de participação no estudo e preencheram a ficha cadastral de voluntário. Os voluntários compareceram ao Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos (FCF/USP) uma vez por semana, em dias e horários previamente fixados, em jejum de 8 a 10 horas (WOLEVER, 1990).

Tabela 2- Idade e índice de massa corporal (IMC) dos voluntários selecionados

Voluntários (n)	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)
23	29,8 ± 6,0	21,5 ± 1,9

IMC = peso/altura². Resultados em média ± DP.

O cronograma seguido e os alimentos ingeridos no ensaio com humanos foram os seguintes:

Semana 1 e 2 – 1^a refeição: pão (referência de IG); 2^a refeição: pão (referência de “efeito segunda refeição”).

Semana 3 – 1^a refeição: ABV (para determinação de IG); 2^a refeição: pão (para avaliação de “efeito segunda refeição”).

Semana 4 – 1^a refeição: MBV (para determinação de IG); 2^a refeição: pão (para avaliação de “efeito segunda refeição”).

Semana 5 – 1^a refeição: banana nanica madura (para determinação de IG).

Todos os produtos e alimentos foram administrados com até 200mL de água ou suco *diet*. A quantidade ingerida foi equivalente a 50g de carboidratos totais. Para maiores informações sobre os alimentos e produtos utilizados neste ensaio, vide itens 3.1.1 (BM), 3.1.4.1 (MBV), 3.1.6 (ABV) e 3.3.1 (pão).

4.1.1 Determinação de índice glicêmico (IG)

A cada comparecimento semanal dos voluntários, foi tomada a glicemia de jejum (tempo 0) e um produto ou alimento foi ingerido (contendo aproximadamente 50g de carboidrato total) como primeira refeição. Os indivíduos tiveram 10 minutos para ingerir cada alimento. Todos os voluntários ingeriram as quantidades totais oferecidas de todos os

alimentos no tempo determinado. A partir da ingestão foram tomadas amostras de sangue capilar aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, de acordo com o tempo proposto por Wolever et al (1991), para a elaboração das curvas glicêmicas de primeira refeição. A ingestão do pão foi realizada duas vezes, em diferentes semanas, para servir como referência (100%).

Com os valores de glicemia obtidos com as primeiras refeições, foram elaboradas tabelas de resposta glicêmica e curvas glicêmicas individuais e da média do grupo. Foram determinados os IGs de MBV, ABV e banana nanica madura (BM). Os resultados foram expressos como média \pm SEM.

4.1.2 Estudo do “efeito segunda refeição”

O efeito aqui investigado, chamado “efeito segunda refeição” (RABEN et al, 1994; LILJEBERG; AKERBERG; BJÖRCK, 1999; LILJEBERG; BJÖRCK, 2000), refere-se à possibilidade de uma primeira refeição de reduzido índice glicêmico (IG) influenciar na resposta glicêmica a uma refeição subsequente de IG elevado e conhecido, no presente caso, tal refeição consistiu de pão branco.

Para a avaliação do “efeito segunda refeição” de ABV e MBV, após quatro horas do início da primeira refeição (desjejum com ABV ou MBV), os voluntários receberam a segunda refeição constituída por alimento de elevado IG: pão. Juntamente com as refeições, contendo aproximadamente 50g de carboidrato total, os voluntários puderam ingerir até 200ml de água mineral natural. Novamente foram coletadas amostras de sangue aos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos a partir da ingestão da segunda refeição.

Com os valores de glicemia obtidos com as primeiras e segundas refeições, foram elaboradas tabelas de resposta glicêmica e curvas glicêmicas individuais e da média do grupo. A resposta glicêmica ao “pão após pão” foi considerada como referência nas comparações,

para assim avaliar se os produtos ingeridos como primeira refeição foram eficientes em diminuir a resposta glicêmica à segunda refeição.

Foi avaliado o “efeito segunda refeição” de MBV e ABV. Os resultados foram expressos como média \pm SEM.

4.2 Ensaio de curta duração com animais

Para tal ensaio de curta duração, foram utilizados ratos da linhagem “Wistar”, machos, obtidos a partir de colônias mantidas no Biotério da FCF/IQ - USP. Foram utilizados 80 ratos com peso ao redor de 120g. O experimento foi constituído de duas fases: adaptação e experimental.

4.2.1 Fase de adaptação

Os animais foram divididos em dois grupos de 40 ratos, de acordo com o tratamento dado a cada um na fase de adaptação (5 dias). Os grupos foram classificados da seguinte forma:

- RSA = 40 ratos alimentados com ração comercial do biotério;
- RCA = outros 40 ratos alimentados com ração comercial do biotério acrescida de antibiótico.

A ração comercial do biotério foi triturada e, no caso do grupo RCA, acrescida de antibiótico 0,7g de bacitracina e sulfato de neomicina, 2:1 Nebacetin[®] por 100g de ração. Segundo Björck e Asp (1991), as concentrações de antibiótico adicionadas às rações dos RCA eliminam de 70-90% da atividade da flora bacteriana. Os animais receberam este tratamento por cinco dias com a finalidade de garantir a eliminação da flora bacteriana.

4.2.2 Fase experimental

Após a fase de adaptação, os animais foram pesados e os 30 animais de pesos mais semelhantes de cada grupo (RSA ou RCA) foram selecionados. Estes, foram novamente divididos, desta vez em 6 grupos de acordo com o tratamento na fase de adaptação (com ou sem antibiótico) e com a primeira dieta a ser administrada para avaliação de resposta glicêmica (pão, MBV e ABV-L). Os grupos (10 animais/grupo) foram:

- (1) RSA (ratos sem antibiótico) + pão - ratos tratados sem antibióticos na fase de adaptação, aos quais foi administrado pão como primeira e segunda dietas nos dias de experimento;
- (2) RCA (ratos com antibiótico) + pão - ratos tratados com antibióticos na fase de adaptação, aos quais foi administrado pão como primeira e segunda dietas nos dias de experimento;
- (3) RCA (ratos sem antibiótico) + MBV - ratos tratados sem antibióticos na fase de adaptação, aos quais foi administrada massa de banana verde (MBV) como primeira dieta e pão como segunda nos dias de experimento;
- (4) RSA (ratos com antibiótico) + MBV - ratos tratados com antibióticos na fase de adaptação, aos quais foi administrada massa de banana verde (MBV) como primeira dieta e pão como segunda nos dias de experimento;
- (5) RSA (ratos sem antibiótico) + ABV-L - ratos tratados sem antibióticos na fase de adaptação, aos quais foi administrada amido de banana verde (ABV) como primeira dieta e pão como segunda nos dias de experimento;
- (6) RCA (ratos com antibiótico) + ABV-L - ratos tratados com antibióticos na fase de adaptação, aos quais foi administrada amido de banana verde (ABV) como primeira dieta e pão como segunda, nos dias de experimento.

A organização geral do ensaio encontra-se descrita na Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação dos grupos e sua primeira dieta em ensaio de curta duração com ratos

Grupos	Primeira dieta administrada
RSA+pão e RCA+pão	Pão (referência)
RSA+MBV e RCA+MBV	MBV
RSA+ABV-L e RCA+ABV-L	ABV-L

MBV = massa de banana verde; ABV-L = amido de banana verde laboratorial; RSA = ratos tratados em antibiótico; RCA = ratos tratados com antibiótico. Para todos os grupos, “pão” foi segunda dieta.

No ensaio de curta duração em animais, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Índice glicêmico (IG) de MBV e ABV-L;
- “Efeito segunda dieta” de MBV e ABV-L;
- Influência da presença ou não da flora bacteriana sobre os parâmetros anteriormente citados.

Todos os produtos foram diluídos em água (1mg/ml) em quantidade contendo 2mg/g de peso corporal de amido total (AT) para serem administrados por sonda gástrica. Para maiores informações sobre os produtos utilizados neste ensaio, vide itens 3.1.4.1 (MBV), 3.1.5 (ABV-L) e 3.3.1 (pão).

4.2.3 Determinação de índice glicêmico (IG)

Todos os grupos permaneceram 18 horas em jejum em gaiolas metabólicas individuais até a administração dos produtos a serem estudados.

Em cada dia de experimento, foram administradas amostras de pão (referência de IG = 100%), MBV ou ABV-L aos ratos em jejum. A glicemia de cada um foi determinada nos tempos 0 (jejum), 30, 60, 90 e 120 minutos a partir da administração de cada produto. Com elas foram elaboradas as curvas glicêmicas de cada animal e produto. Foram determinados os IGs de MBV e ABV-L. Os resultados foram expressos como média \pm SEM.

4.2.4 Estudo do “efeito segunda dieta”

O efeito aqui investigado, chamado “efeito segunda refeição” (RABEN et al, 1994; LILJEBERG; AKERBERG; BJÖRCK, 1999; LILJEBERG; BJÖRCK, 2000), refere-se à possibilidade de uma primeira refeição de reduzido índice glicêmico (IG) influenciar na resposta glicêmica a uma refeição subsequente de IG elevado e conhecido, no caso em questão, tal refeição foi padronizada consistindo de pão branco. No presente trabalho, o termo “efeito segunda dieta” foi adotado para tal efeito em animais.

Após quatro horas da ingestão da primeira dieta os animais receberam a segunda dieta padronizada constituída por alimento de elevado IG: pão. Novamente foram coletadas amostras de sangue da veia caudal de cada animal aos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos a partir da administração.

Com os valores de glicemia obtidos com as primeiras e segundas dietas, foram elaboradas tabelas de resposta glicêmica, curvas glicêmicas individuais e da média do grupo. A resposta glicêmica ao “pão após pão” foi considerada como referência nas comparações, para assim avaliar se os produtos, administrados como primeira dieta, foram eficientes em diminuir a resposta glicêmica à segunda refeição.

Foi avaliado o “efeito segunda dieta” de MBV e ABV-L. Os resultados foram expressos como média \pm SEM.

4.3 Ensaio de média duração com animais

O ensaio de média duração foi realizado com ratos da linhagem “Wistar”, machos, obtidos a partir de colônias nascidas e mantidas no Biotério da FCF/IQ – USP. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais à temperatura constante (em torno de 22°C) e com ciclo de luz claro:escuro de 12h por 5 a 6 semanas, período que incluiu 1 semana de adaptação, 4 semanas de tratamento e 1 semana de

sacrifícios para avaliação de diversos parâmetros. No ensaio foram utilizados 108 ratos, a princípio com 5 semanas de vida, em duas etapas, cada uma com 54 animais, por limitações de espaço e viabilização da análise de diversos parâmetros estudados.

Em cada etapa, os 54 animais foram submetidos a uma semana de adaptação ao ambiente onde foram separados em gaiolas metabólicas. Os ratos iniciaram o período de adaptação com peso ao redor de 100g e foram alimentados com ração comercial do Biotério da FCF-IQ/USP (item 3.2.1). Após uma semana, os animais foram pesados e divididos em três grupos de 16 ratos de forma que o peso médio dos grupos se mantivesse semelhante. Os animais que não foram selecionados nesta triagem continuaram a receber ração comercial do biotério até serem usados para testar parâmetros que seriam avaliados no final do experimento.

Cada grupo passou a receber um tipo diferente de ração (item 3.2). O grupo controle (G-Controle) recebeu ração AIN-93G (R-Controle) (item 3.2.2); o grupo MBV (G-MBV) recebeu ração AIN-93G com o amido de milho substituído por massa de banana verde (R-MBV) (item 3.2.3); o grupo ABV (G-ABV) recebeu ração AIN-93G com parte de amido de milho substituído por amido de banana verde (R-ABV) (item 3.2.4).

Foram utilizados 32 animais por grupo no ensaio como um todo.

4.3.1 Parâmetros avaliados periodicamente

Consumo - ração e água foram oferecidas *ad libitum* e o consumo foi medido diariamente.

Peso corpóreo - o peso dos animais foi verificado a cada 2 ou 3 dias.

Fezes: peso e umidade - as fezes foram coletadas em *pool* nos quatro primeiros dias de cada semana para avaliação da umidade e peso seco ao longo do experimento.

Todo contato com os animais (alimentação, pesagem, limpeza, entre outros) foi feito aproximadamente no mesmo horário de cada dia, por uma equipe fixa de pessoas. Um cronograma resumido das demais intervenções realizadas em cada etapa do experimento pode ser encontrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Principais intervenções em cada etapa do ensaio de média duração com ratos

Semana	Dieta	Parâmetros avaliados
S0 - Adaptação	Ração comercial do biotério	resposta glicêmica ao pão (D0)
S1 - Experimental	R-Controle, R-MBV ou R-ABV	-
S2 - Experimental	R-Controle, R-MBV ou R-ABV	resposta glicêmica ao pão (D14)
S3 - Experimental	R-Controle, R-MBV ou R-ABV	-
S4 - Experimental	R-Controle, R-MBV ou R-ABV	resposta glicêmica ao pão (D28)
S5 - Sacrifícios	R-Controle, R-MBV ou R-ABV	TTG verificação de peso, pH e umidade cecais coleta de conteúdo cecal para quantificação de AGCC coleta de tecido cecal para histologia coleta de sangue para quantificação de glicose e lipídios avaliação de secreção de insulina em ilhotas isoladas

R-Controle = ração controle AIN 93-G; R-MBV = ração com massa de banana verde; R-ABV = ração com amido de banana verde; S0-S5 = semanas de cada etapa; D0 = dia anterior ao início do período experimental; D14 e D28 = 14^o e 28^o dias do período experimental; TTG = teste de tolerância à glicose; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta.

4.3.2 Estudo do “efeito segunda dieta”

Um dia antes do início da administração das rações experimentais (semana de adaptação, D0), foi avaliada a resposta glicêmica dos animais em relação ao pão branco, alimento que produz elevada glicemia pós-prandial. O pão (“pão francês”) foi comprado em comércio local e preparado em quantidade suficiente para ser administrado em todos os experimentos nas duas etapas. O pão foi seco em estufa ventilada (60°C) por 18h, triturado e sua umidade total e residual e teor de amido total foram determinados.

No dia do experimento, o fornecimento de ração cessou às 07:00, para que os animais fizessem jejum de 7 a 8 horas. Foi administrado o pão diluído em água (0,2g/mL) por gavagem (sonda gástrica) entre as 14:00 e 15:00 horas da tarde. A quantidade de pão administrada foi equivalente a 2mg de carboidrato total por grama de peso corpóreo de rato. Foram tomadas amostras de sangue da cauda do animal por secção da extremidade nos tempos 0 (antes da administração), 30, 60, 90 e 120 minutos a partir da administração da dieta para quantificação de glicose sanguínea. Este experimento foi repetido a cada 14 dias (D0, D14, D28) para avaliação da evolução das curvas glicêmicas ao longo do tratamento.

4.3.3 Teste de tolerância à glicose (TTG)

O TTG foi realizado de acordo com o método proposto por Machado, Nogueira e Carpinelli (1992), com modificações. Foram utilizados 10 animais por grupo para o estudo deste parâmetro.

Em cada etapa, para avaliar a tolerância à glicose, a veia jugular externa de 5 animais de cada grupo/ensaio foi canulada para coleta de sangue e para administração de glicose.

O procedimento cirúrgico foi iniciado sempre entre as 9:00 e 11:00 horas da manhã, sacrificando somente três animais por dia, para que todos estivessem em jejum de tempo semelhante (3 a 5 horas). Cada animal foi anestesiado intraperitonealmente com hidrato de cloral (400mg/kg peso de rato) e imobilizado em suporte de isopor com inclinação de aproximadamente 20°. A temperatura do animal foi mantida a 37°C durante as coletas de sangue. O pêlo da região do pescoço e tórax superior foi removido (depilado) e a veia jugular externa foi canulada para administração de glicose (0,75g/kg peso de rato). Amostras de sangue (0,4ml) foram colhidas nos tempos 0 (anterior à injeção de glicose), 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos a partir da administração da glicose para quantificação de glicose e insulina. Durante os intervalos de coleta, a cânula esteve constantemente preenchida com solução

fisiológica, que foi mantida em banho-maria a aproximadamente 40°C. A glicose foi quantificada no momento da retirada do sangue, por meio de aparelho dosador de glicose (Glicosímetro Advantage 2 – Roche) e para as demais dosagens o sangue de cada tempo foi depositado em tubos de microcentrífuga identificados, com anticoagulante (heparina sódica 10u/ml), centrifugado a 3000rpm por 15 minutos para obtenção do plasma, o qual foi então armazenado a -20°C para dosagens de insulina. No final das coletas de sangue, os animais submetidos a este procedimento foram sacrificados por decapitação.

4.3.4 Avaliação de secreção de insulina em ilhotas de Langerhans isoladas

O isolamento de ilhotas de Langerhans de ratos foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Secreção de Insulina do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), por técnicos e pesquisadores especializados. O procedimento visou avaliar a secreção de insulina em resposta a doses de diferentes concentrações de glicose.

Após 28 dias de tratamento, 3 de cada grupo foram sacrificados por decapitação para o isolamento das ilhotas de Langerhans do pâncreas por perfusão/ incubação. Assim que os animais foram sacrificados, foram injetados 15-20mL de solução fisiológica no pâncreas e este foi retirado. Cada pâncreas foi homogeneizado e incubado a 37°C por 25 minutos para sua digestão. Após a incubação, ilhotas do pâncreas (aproximadamente 10 ilhotas/rato) foram isoladas sob microscópio eletrônico. Soluções de diferentes concentrações de glicose (5,6mM e 16,7mM) foram injetadas no meio contendo as ilhotas e a produção-resposta de insulina foi medida (XIMENES et al., 2006).

4.3.5 Perfil lipídico

Foram realizadas coletas de sangue dos ratos em jejum de 8h para avaliação do perfil lipídico. Os ratos foram anestesiados com cetamina (Vetaset[®]) / xilazina (Coopazine[®]) (2:1, 75µL/100g rato). Cerca de 3-4mL de sangue foram colhidos da artéria abdominal através de *Vacutainer TM*[®], que foram centrifugados a 3000rpm/15min a 4°C, para a obtenção de soro que foi então congelado até realização das análises de colesterol total, colesterol-HDL e triacilglicerol sanguíneo por métodos colorimétricos (kits Labtest).

Para o estudo do perfil lipídico, foram sacrificados 8 animais de cada grupo, sendo estes mesmos ratos também utilizados para coleta de tecido cecal para possíveis análises histológicas (item 4.3.6).

4.3.6 Coleta de tecido cecal

O tecido cecal de 5 ratos por grupo (mesmos animais utilizados para avaliação do parâmetro descrito no item 4.3.5) foi coletado segundo orientação de pesquisadores do Laboratório de Biologia dos Epitélios Digestivos, do Departamento de Histologia e Embriologia (ICB/USP). Tais tecidos foram coletados para possibilitar futuras análises histológicas dos mesmos, em ocasião de interesse.

4.3.7 Fermentação *in vivo*

Foram sacrificados 8 animais por grupo para coleta de conteúdo cecal e sua caracterização.

Depois de colhido o sangue para avaliação de perfil lipídico citada no item 4.3.5, os cecos dos animais foram delimitados por cordões, removidos e pesados. Assim que aberto, seu pH interno foi medido em pHmetro portátil UP-10 (*Denver Instrument*) e o conteúdo foi

colocado em tubos de microcentrífuga contendo 400 μ L HgCl₂ 0,1% e 105 μ L H₃PO₄ 5%, previamente tarados e identificados, e foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Estes foram então armazenados a - 20°C para avaliação de umidade e quantificação de AGCC.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a execução do presente trabalho, foram estudadas diferentes características químicas e nutricionais de banana.

A banana madura foi utilizada para determinação de IG em humanos, dado de importância para a inclusão em tabelas nutricionais e para a população em geral.

A banana no estado verde foi submetida a diversos tipos de processamento com o objetivo de torná-la aceitável ao paladar e ainda manter suas características nutricionais mais desejáveis. Após serem encontrados produtos de banana verde específicos com tais características, estes produtos foram avaliados química e bioquimicamente através de análises de composição e análises *in vitro* com a finalidade de prever seus efeitos fisiológicos *in vivo*. Os produtos de banana verde utilizados foram a massa de banana verde (MBV) e o amido de banana verde (ABV).

In vivo, em humanos e em animais (ratos), foram avaliados diversos parâmetros fisiológicos em resposta ao consumo dos produtos de banana verde selecionados. O estudo de tais parâmetros sempre visou uma melhor elucidação dos efeitos da fermentação colônica, dos mecanismos da tolerância à glicose e a possível relação entre estes dois tópicos.

Para isto, foram avaliados alguns parâmetros em ensaios de curta duração, em humanos e animais, que incluíram estudos da resposta glicêmica, levando à determinação do índice glicêmico (IG) dos produtos de banana verde estudados, e da relação entre as respostas glicêmicas de duas refeições subsequentes (“efeito segunda refeição/dieta”), consistindo a primeira delas nos produtos de banana verde. Além disso, foram estudados possíveis efeitos da fermentação colônica sobre a resposta glicêmica em ensaios com ratos com ou sem flora bacteriana.

Em ensaio de média duração em ratos, foram avaliados parâmetros como a fermentação colônica *in vivo* dos produtos de banana verde e sua relação com a tolerância à

glicose em grupos alimentados com dieta controle ou com dietas experimentais contendo produtos de banana verde. O perfil da fermentação dos produtos utilizados *in vivo* foi previamente avaliado *in vitro*.

O estudo da fermentação colônica *in vivo*, em resposta ao consumo de produtos de banana verde, consistiu na avaliação de diferentes características do conteúdo cecal como peso, umidade, pH e perfil de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) presentes. Para estudar a tolerância à glicose, foi avaliada a evolução das repostas glicêmicas dos animais a um alimento padrão de alto IG (pão) a cada 14 dias de experimento (D0, D14 e D28); após 28 dias de ingestão das rações elaboradas, foram realizados testes de tolerância à glicose (TTG) e a secreção de insulina e o perfil lipídico dos animais foram avaliados.

5.1 Quantificação das frações de amido dos produtos de banana verde

Diversos produtos derivados de banana verde foram analisados para avaliar o efeito das condições de processamento sobre o teor e tipo de amido contido neles. Além disso, os resultados obtidos foram úteis para a seleção dos produtos a serem utilizados em ensaios *in vivo*. Informações sobre cada fração de amido analisada encontram-se nas Tabela 5 a 8.

Tabela 5 - Quantificação de amido resistente (AR), amido disponível (AD) e amido total (AT) de banana verde crua

Amostra	(% b.s.)		
	AR	AD	AT
Banana verde crua homogeneizada c/ água	51,3 ± 0,0#	10,7 ± 0,5	62,1 ± 0,5#
Banana verde crua homogeneizada c/ ác. ascórbico 0,5%	47,4 ± 3,5*+	10,5 ± 0,3+	57,9 ± 3,3*+
Banana verde crua fatiada em água	53,5 ± 2,3*#	8,8 ± 0,1*#	62,3 ± 2,4
Banana verde crua fatiada em ác. ascórbico 0,5%	56,4 ± 0,7*#	7,8 ± 0,4*#+	63,0 ± 0,6#

Resultados expressos em base seca (b.s.) como média ± DP. Diferença estatística analisada por ANOVA/Tukey, considerando:

*p<0,05 indica diferença estatística entre dados da mesma coluna, em relação ao primeiro valor;

#p<0,05 indica diferença estatística entre dados da mesma coluna, em relação ao segundo valor;

+p<0,05 indica diferença estatística entre dados da mesma coluna, em relação ao terceiro valor.

A Tabela 5 mostra os teores das frações de amido de bananas verdes cruas preparadas com pequenas variações como a homogeneização ou fatiação, sendo estas feitas em água ou solução de ácido ascórbico.

O interesse em saber se o ácido ascórbico exerce alguma influência sobre as frações de amido, deveu-se à sua capacidade de evitar o escurecimento das bananas verdes por oxidação, tornando seus produtos visualmente mais atrativos. Comparando as bananas verdes cruas homogeneizadas, a presença do ácido ascórbico teve efeito significativo nos teores de amido resistente (AR) e amido total (AT), sendo que tais teores foram mais baixos na presença de tal composto. Entre as bananas verdes cruas fatiadas em água ou ácido ascórbico, o amido disponível (AD) foi significativamente mais baixo na presença de ácido ascórbico.

Quanto à influência da homogeneização ou fatiação sobre as bananas verdes cruas, sejam preparadas em água ou em ácido ascórbico, os teores de AR e AT foram significativamente maiores nas bananas fatiadas, enquanto o teor de AD foi menor. De acordo com estes resultados, o processo de homogeneização é um fator que causa redução no teor de AR e no de AT, em relação à fatiação.

As bananas verdes cruas contêm essencialmente AR2 (grânulos de amido resistentes), mas também possuem certo teor de AR1 (amido fisicamente inacessível) (FAISANT et al., 1995). Apesar da maior parte do amido resistente presente (AR2) ser influenciada basicamente pelo estado de maturação da fruta e pela exposição a altas temperaturas em presença de água (gelatinização), o pouco AR1 presente pode ser facilmente disponibilizado pela ruptura de parede celular causada por processos de homogeneização (CHAMP et al., 2003). Isto possivelmente explica a queda no teor de AR das bananas verdes cruas homogeneizadas em relação às fatiadas.

Apesar de apresentarem alto teor de AR em todos os casos, as bananas verdes cruas apresentaram gosto muito adstringente para serem utilizadas em ensaios *in vivo*, como produto a ser ingerido.

A Tabela 6 mostra os teores das frações de amido de amidos isolados em diferentes locais (ABV-México / ABV-L-Brasil), escalas (ABV-piloto / ABV-L-laboratorial) e de diferentes variedades de banana (ABV-plátano / ABV-L-nanica).

Tabela 6 - Quantificação de amido resistente (AR), amido disponível (AD) e amido total (AT) de amido de banana verde (ABV) e amido de banana verde laboratorial (ABV-L)

Amostra	AR	AD	AT
(% b.s.)			
ABV	66,0 ± 2,5	16,1 ± 0,9	82,1 ± 2,7
ABV-L	66,1 ± 0,5	13,7 ± 0,8*	79,7 ± 3,5

Resultados expressos em base seca (b.s.) como média ± DP. *p<0,05 indica diferença estatística entre dados da mesma coluna (teste “t” de Student).

De acordo com a Tabela 6, as frações de AR e AT dos dois tipos de amido isolado podem ser consideradas semelhantes. Apesar disto, o ABV recebeu preferência na utilização em experimentos *in vivo* em humanos (curta duração) e em ratos (média duração) devido à maior facilidade de sua produção em grande escala, viabilizando seu consumo em grandes quantidades.

Entre os dois tipos de amido isolados, o amido isolado de banana verde laboratorial (ABV-L) é um produto de obtenção mais trabalhosa e de baixo rendimento, seja pela variedade da banana utilizada ou pelo método de isolamento empregado. Neste caso, o método de isolamento foi elaborado para a obtenção de amido essencialmente para realização de análises laboratoriais, que requerem pequenas quantidades de amostra. Já o ABV foi obtido em planta piloto desenvolvida visando sua produção em grande escala.

Além disso, a variedade de banana utilizada para sua produção no México difere da variedade utilizada laboratorialmente no Brasil em relação ao teor de amido total (AT) da fruta verde *in natura*. A banana utilizada no México (*Musa paradisíaca* L.) para obtenção do ABV é de uma variedade comumente chamada de plátano enquanto a banana utilizada para obtenção do ABV-L é uma das variedades mais comuns no comércio local do Brasil (*Musa* spp. var. Nanica). O teor de AT das bananas utilizadas para obtenção do ABV é de 80% (b.s.) (PACHECO-DELAHAYE; TESTA, 2005), enquanto o teor de AT das bananas utilizadas para obtenção do ABV-L é aproximadamente 20% menor (AT = 58-63%b.s.) (Tabela 5). Isto ajuda a explicar o menor rendimento da produção do ABV-L em relação à do ABV, influenciando na escolha de tais produtos para serem utilizados em grande ou pequena escala.

As bananas verdes também foram analisadas após serem cozidas com pequenas variações na forma de preparo. Basicamente foram avaliadas as influências dos processos de cocção e de refrigeração. As bananas verdes cozidas foram chamadas de massa de banana verde (MBV) e seus teores de frações de amido encontram-se expressos na Tabela 7.

Tabela 7- Quantificação de amido resistente (AR), amido disponível (AD) e amido total (AT) de massa de banana verde (MBV) obtida por diferentes formas de cocção e armazenamento

Item	Amostra	AR	AD	AT
		(% b.s.)		
I ¹	MBV, cozida s/ pressão ² , c/ casca, em água, s/ refrigeração	8,3 ± 0,2#•	53,2 ± 2,1	61,6 ± 4,5
II	MBV, cozida s/ pressão ² , c/ casca, em água, c/ refrigeração	8,9 ± 0,2*+•	52,8 ± 2,3	61,5 ± 4,7
III	MBV, cozida s/ pressão ² , c/ casca, em vapor, s/ refrigeração	8,0 ± 0,2#•	55,4 ± 2,5	63,8 ± 4,0
IV	MBV, cozida s/ pressão ² , c/ casca, em vapor, c/ refrigeração	8,1 ± 0,4#•	55,9 ± 2,8	64,2 ± 5,0
V	MBV, cozida c/ pressão ³ , c/ casca, em água, s/ refrigeração	10,3 + 0,6*##+	54,6 + 3,1	64,4 + 5,1
VI	MBV, cozida c/ pressão ³ , c/ casca, em água, c/ refrigeração	10,5 + 0,4*##+	54,5 + 2,7	64,7 + 4,3
VII	MBV, cozida c/ pressão ³ , s/ casca, em água, s/ refrigeração	8,2 + 0,2#•	50,1 + 1,9	58,4 + 4,2•

¹ MBV obtida em grande escala para utilização em experimentos *in vivo*; ² cocção em autoclave; ³ cocção em “panela de pressão” doméstica; Resultados expressos em base seca (b.s.) como média ± DP. Diferença estatística analisada por ANOVA/Tukey, considerando:

*p<0,05 indica diferença estatística entre dados da mesma coluna, em relação ao item I;

#p<0,05 indica diferença estatística entre dados da mesma coluna, em relação ao item II;

+p<0,05 indica diferença estatística entre dados da mesma coluna, em relação ao item III;

•p<0,05 indica diferença estatística entre dados da mesma coluna, em relação ao item VI.

De acordo com a Tabela 7, pôde ser avaliada a influência de diversas variáveis sobre o perfil do amido de MBV. O preparo das MBVs com pressão no recipiente de cocção resultou em maiores teores de AR em relação às MBVs preparadas sem pressão (comparação do item I com V - Tabela 7). Isto pode ter ocorrido talvez não por influência da pressão, mas devido à diferença na relação entre volume de água e bananas em cozimento. O recipiente utilizado para a cocção sem pressão foi uma autoclave industrial completa de água (60L), enquanto para a cocção com pressão, o recipiente foi uma “panela de pressão” doméstica com capacidade de apenas 4,5L.

Para o preparo das MBVs, a cocção das bananas imersas em água ou somente em contato com vapor (comparação do item I com III - Tabela 7) não implicou em efeitos conclusivos sobre o teor de AR.

De um modo geral, a refrigeração a 4°C por 16h (comparação do item I com II, III com IV e V com VI - Tabela 7) também não alterou significativamente o conteúdo de AR. Isto contrasta com resultados de outros estudos quanto à influência armazenamentos de leguminosas em baixas temperaturas (-20°C) por 7 ou 30 dias sobre o teor de AR (ROSIN; LAJOLO; MENEZES, 2002).

Apesar das MBVs preparadas com casca e com pressão (itens V e VI – Tabela 7) terem apresentado teor de AR mais alto do que as outras MBVs, na prática a diferença nos valores de AR remanescente não foi suficiente para tornar a escolha deste processo como sendo o mais viável para obtenção de MBV em grande escala. A MBV do item I (Tabela 7) foi escolhida para ser utilizada nos ensaios *in vivo* com base na maior viabilidade de sua obtenção.

A presença da casca das bananas, durante sua cocção em água, resultou em teores mais elevados tanto de AR como de AD, provavelmente pelo fato da casca agir como barreira física à gelatinização e solubilização do amido.

Tabela 8 - Proporção de amido resistente (AR) e amido disponível (AD) em banana verde e seus produtos

Amostra	AR	AD
	(% do amido total)	
ABV	80	20
ABV-L	83	17
Banana verde crua homogeneizada em água	83	17
Banana verde crua homogeneizada em ácido ascórbico 0,5%	82	18
Banana verde crua fatiada em água	86	14
Banana verde crua fatiada em ácido ascórbico 0,5%	88	12
MBV preparada s/ pressão ¹ , c/ casca, em água, s/ refrigeração	13	87
MBV preparada s/ pressão ¹ , c/ casca, em água, c/ refrigeração	14	86
MBV preparada s/ pressão ¹ , c/ casca, em vapor, s/ refrigeração	13	87
MBV preparada s/ pressão ¹ , c/ casca, em vapor, c/ refrigeração	13	87
MBV preparada c/ pressão ² , c/ casca, em água, s/ refrigeração	16	84
MBV preparada c/ pressão ² , c/ casca, em água, c/ refrigeração	16	84
MBV preparada c/ pressão ² , s/ casca, em água, s/ refrigeração	13	87

¹ cocção em autoclave; ² cocção em “panela de pressão” doméstica; ABV = amido de banana verde; ABV-L = amido de banana verde laboratorial; MBV = massa de banana verde Resultados expressos em base seca (b.s.) como média \pm DP.

De acordo com a Tabela 8, a diferença na relação AR:AD foi muito grande entre a massas de banana verde (MBV) e os outros produtos que não envolveram cocção (amidos isolados e bananas verdes cruas). Entre amido isolados ou bananas verdes cruas e MBVs, a relação AR:AD é praticamente invertida. Isto pode ser justificado pela gelatinização que ocorre com os grânulos de AR2, abundante em bananas verdes cruas, em presença de água e altas temperaturas (CHAMP et al., 2003). Apesar desta inversão na proporção AR:AD na MBV, este produto ainda representa significativa fonte de AR e foi posteriormente investigado como fonte de carboidratos não-disponíveis também.

5.2 Perfil de carboidratos da massa de banana verde (MBV) e do amido de banana verde (ABV)

Os produtos de banana verde escolhidos para serem utilizados nos ensaios *in vivo* de média duração foram a MBV (item 3.1.4.1) e o ABV (item 3.1.6), devido à sua maior

facilidade de obtenção em grande escala e por serem sensorialmente mais aceitáveis ao paladar. A Tabela 9 apresenta a umidade de cada produto. Os resultados do perfil de carboidratos de MBV e ABV, expressos em base integral (b.i.), encontram-se nas Tabelas 10 a 12.

Tabela 9 - Umidade da massa de banana verde (MBV) e do amido de banana verde (ABV)

	Umidade (%)
MBV	4,0 ± 0,3 ^a
ABV	8,6 ± 0,9 ^b

Resultados expressos como média ± DP. Diferença analisada por teste “t” de Student, considerando p<0,05.

Tabela 10 - Quantificação de frações de amido e fibra alimentar de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde (ABV)

	AR	AD	AT	FA insolúvel	FA solúvel	FA total
	(% b.i.)					
MBV	7,9 ± 0,2 ^a	51,1 ± 1,2 ^a	59,1 ± 1,3 ^a	5,6 ± 0,2 ^a	4,3 ± 0,2 ^a	9,9 ± 0,2 ^a
ABV	60,3 ± 2,3 ^b	15,2 ± 0,9 ^b	75,4 ± 2,5 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	1,2 ± 0,1 ^b	1,4 ± 0,2 ^b

AR = amido resistente; AD = amido disponível; AT = amido total. Resultados expressos em base integral (b.i.) como média ± DP. Diferença, entre valores da mesma coluna, analisada por teste “t” de Student, considerando p < 0,05.

Na Tabela 10, pode-se observar que o ABV é uma fonte concentrada de amido resistente (60% b.i.), enquanto a MBV, apesar de apresentar menor teor de AR, ainda é classificada como fonte de AR além de ser também fonte de fibra alimentar (FA). Produtos assim são de grande importância para a população brasileira, na qual a ingestão de AR e FA são consideradas inferiormente inadequadas (MENEZES; GIUNTINI; LAJOLO, 2001), segundo as recomendações nutricionais que sugerem ingestão de 25-38g/dia para jovens e adultos (THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2002).

De acordo com a definição de fração indigerível (FI) de Saura-Calixto et al., (2000), a FI insolúvel é constituída basicamente de AR, FA insolúvel e proteína resistente, enquanto o

teor de FI solúvel deve-se essencialmente à fibra FA solúvel e polissacarídeos solúveis. As frações indigeríveis dos produtos de banana verde selecionados foram analisadas e o seu perfil pode ser observado na Tabela 11.

Tabela 11 - Quantificação de fração indigerível (FI) solúvel, insolúvel e total de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde (ABV)

	FI insolúvel	FI solúvel	FI total
	(% b.i.)		
MBV	14,2 ± 0,7 ^a	6,8 ± 0,8 ^a	21,0 ± 0,5 ^a
ABV	57,7 ± 2,5 ^b	11,6 ± 0,6 ^b	69,4 ± 1,5 ^b

Resultados expressos em base integral (b.i) como média ± DP. Diferença, entre valores da mesma coluna analisada por teste “t” de Student, considerando $p < 0,05$.

A Tabela 12 mostra o cálculo teórico dos carboidratos não-disponíveis de ABV e MBV, sendo estes calculados pela soma das frações de AR e FA.

Tabela 12 - Cálculo teórico do teor de carboidratos não-disponíveis de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde (ABV)

	Carboidratos não-disponíveis		
	Insolúveis	Solúveis	Totais
	(%b.i.)		
MBV	13,5 (AR=7,9; FA insolúvel=5,6)	4,3 (FA solúvel=4,3)	17,8
ABV	60,3 (AR=60,3; FA insolúvel=0,0)	1,2 (FA solúvel=1,2)	61,5

Resultados obtidos por soma das frações de fibra alimentar (FA) e amido resistente (AR) previamente analisados. Resultados expressos em base integral (b.i.).

Observando os valores de FI da Tabela 11, pode-se notar que os teores de cada fração de FI, bem como seu total, são valores muito próximos à soma das devidas frações de AR e FA (Tabela 10), como proposto por Saura-Calixto et al., (2000). Tal semelhança deve-se ao fato destes produtos não possuírem valor considerável de proteína que pudesse ser, ainda que em pequena parte, resistente. A diferença encontrada principalmente na MBV entre os valores

das frações solúveis-teóricos (4,3%) (Tabela 12) e experimentais (6,8%) (Tabela 11) pode ser explicada por separação não totalmente eficiente das frações solúvel e insolúvel da FI, ou mesmo pela possibilidade da presença de outros polissacarídeos solúveis não quantificados em particular.

É do conhecimento da comunidade científica que o método de análise de fibras proposto pela AOAC 991.43 apresenta problemas em algumas de suas etapas. Segundo Saura-Calixto (2006), este método não está adequado aos novos conceitos de fibra alimentar e apresenta diversas fontes de erro.

Uma das críticas ao método proposto é feita quanto à precipitação da FA solúvel com etanol. Nesta etapa, parte da FA solúvel pode não ser precipitada e se manter no sobrenadante, indicando valores subestimados desta fração (MAÑAS; SAURA-CALIXTO, 1993; MAÑAS; SAURA-CALIXTO, 1995). Estes autores sugerem a substituição da precipitação com etanol por diálise.

Como os produtos aqui analisados não continham teor significativo de lipídios ou proteína, os menores valores de FA solúvel em relação aos de FI solúvel dos produtos analisados, podem ser justificados por problemas analíticos do método de quantificação de fibras da AOAC.

Vale ressaltar que o AR, apesar de ser quantificado como fração insolúvel, tem efeitos fisiológicos mais semelhantes ao da FA solúvel (HARALAMPU, 2000).

5.3 Perfil da fermentação *in vitro* da massa de banana verde (MBV) e do amido de banana verde (ABV)

Métodos de fermentação *in vitro* têm sido amplamente utilizados para estimar os possíveis efeitos fisiológicos de carboidratos não-disponíveis como substrato para fermentação colônica (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

No presente trabalho, a fermentação colônica foi realizada com inóculo de conteúdo cecal de ratos e o substrato foi a fração indigerível (FI) dos produtos de interesse. As amostras a serem fermentadas (inóculo + FI + meio de fermentação) foram incubadas a 37°C por 24h em meio totalmente anaeróbio. O principal parâmetro avaliado foi a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), entretanto outras variáveis também foram quantificadas para monitorar a eficiência do processo e para serem relacionadas com a produção de AGCC.

Por exemplo, foram medidas a variação de pH das amostras antes e depois do período de incubação (Δ pH) e a pressão interna dos frascos contendo as amostras após incubação; além disso, foi calculada a porcentagem de substrato que não foi fermentado mesmo após 24h de incubação anaeróbia (RNF – resíduo não fermentado).

Fermentabilidade é um termo que combina a taxa e a extensão da degradação do substrato por bactérias colônicas. Em geral, a fermentabilidade de carboidratos pode variar de 97%, como para pectina, a 6-9% para celulose. Na literatura, alta fermentabilidade se refere à grande produção de AGCC *in vitro* (TOPPING; CLIFTON, 2001). Entretanto, no presente trabalho, outros parâmetros avaliados (pH, pressão e resíduo não fermentado) também foram considerados como indicadores de fermentabilidade.

Desta forma, para caracterizar o perfil da fermentação *in vitro* dos produtos de banana verde (ABV e MBV), suas frações indigeríveis (FI) foram isoladas, fermentadas e suas fermentabilidades foram expressas sempre em relação à lactulose, que foi considerada substrato referência de 100% de fermentabilidade. Os vários parâmetros utilizados para avaliação da fermentabilidade *in vitro* dos produtos estão descritos na Tabela 13, com seus respectivos valores.

Tabela 13 - Fermentabilidade *in vitro* de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde (ABV) calculada por diferentes parâmetros

	Fermentabilidade ¹ (%)			
	DpH ²	Pressão ³	RNF ⁴	AGCC total ⁵
MBV	50,0	52,9 ± 8,3 ^a	47,8 ± 0,1 ^a	74,6 ± 8,2 ^a
ABV	83,7	107,8 ± 4,2 ^b	71,0 ± 7,0 ^b	98,1 ± 7,5 ^b

¹calculada tendo os valores da lactulose como referência (100%); ²(média de pH 24h) - (média de pH 0h); ³pressão em 24h; ⁴porcentagem de resíduo não fermentado (RNF) = 100 X (massa seca final de resíduo após a fermentação) / (massa seca inicial de amostra); ⁵soma da produção de acetato, propionato, isobutirato, butirato, isovalerato e valerato. Resultados expressos como média ± DP. Diferença, entre valores da mesma coluna, analisada por teste “t” de Student, considerando p < 0,05.

A fermentabilidade medida pela produção de AGCC é o principal parâmetro para avaliação da fermentabilidade (TOPPING; CLIFTON, 2001), entretanto, todos os outros são considerados bons indicativos para chegar-se a conclusões finais.

Os resultados expressos na Tabela 13 e 14 justificam a utilização de tais produtos em estudos de fermentação e avaliação de seus efeitos fisiológicos, devido à sua alta fermentabilidade. A FI do ABV se mostrou mais fermentável do que a da MBV, de acordo com todos os parâmetros avaliados. Isso pode ter ocorrido devido à diferente composição da FI de cada produto (Tabela 11).

A maior parte da fração de carboidratos que chega ao cólon (carboidratos não-disponíveis) é composta de amido resistente, que é fermentado quase totalmente (ASP; van AMELSVOORT; HAUTVAST, 1996; MUIR et al., 1994). A segunda maior fração é constituída de fibra alimentar. As fibras solúveis estão mais sujeitas à fermentação colônica, já as fibras insolúveis são apenas parcialmente fermentadas no intestino grosso e sua atuação é mais restrita ao aspecto físico, acelerando o transito intestinal pela absorção de água, aumentando a massa fecal e ligando-se a determinados nutrientes e compostos (PACHECO; SGARBIERI, 2001).

O ABV tem o AR como componente praticamente único de sua fração indigerível, enquanto a MBV possui AR e FA no substrato fermentado.

A diferença entre a fermentabilidade da MBV e do ABV talvez não tenha sido maior porque, apesar de grande parte da FA da MBV ser insolúvel (baixa fermentabilidade), ainda existia considerável teor de FA solúvel somado ao AR, sendo estes dois últimos componentes altamente fermentáveis (TOPPING; CLIFTON, 2001).

Tabela 14 - Perfil dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos na fermentação *in vitro* de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde (ABV)

	Proporção molar ¹			AGCC Totais ²
	Acetato	Propionato	Butirato	(mmol/g substrato)
MBV	57,4 ± 3,1 ^a	23,0 ± 1,4 ^a	19,6 ± 1,8 ^a	2,8 ± 0,7 ^a
ABV	68,3 ± 1,9 ^b	14,4 ± 0,7 ^b	17,3 ± 1,1 ^a	3,7 ± 0,5 ^b

¹ porcentagem de cada AGCC em relação à soma da produção de acetato, propionato e butirato;
² soma da produção de acetato, propionato e butirato. Resultados expressos como média ± DP. Diferença, entre valores da mesma coluna, analisada por teste “t” de Student, considerando p<0,05.

Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* apontam o AR como melhor substrato para produção de butirato do que outras fontes de polissacarídeos não-amido (TOPPING; CLIFTON, 2001; NOAKES et al., 1996; MUIR et al., 2004). Outros trabalhos questionam o efeito butirogênico da fermentação do AR (CUMMINGS et al., 1996; WACKER et al., 2002).

A produção total de AGCC em fermentações *in vitro* varia entre 0,4-14,2mmol de AGCC por grama de substrato dependendo do substrato. A proporção do butirato em relação aos outros dois principais AGCC produzidos na fermentação geralmente é de 12-36%, em substratos que consistem basicamente em AR, e 1-20%, em substratos contendo essencialmente FA (CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001). De acordo com a Tabela 14, na fermentação da MBV e do ABV, a proporção molar de butirato não foi expressiva em relação aos demais AGCC produzidos apesar de ambos os substratos conterem consideráveis quantidades de AR.

5.3.1 Comparação interlaboratorial

A fermentação da MBV foi realizada em dois momentos em diferentes laboratórios (Departamento de Nutrición I da Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid e Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, FCF/USP). Alíquotas da mesma amostra (obtida na Brasil) foram fermentadas em ambos os laboratórios. Os resultados expressos na Tabela 15 permitem comparar valores de diversos parâmetros de fermentação avaliados, mostrando que os valores absolutos obtidos em diferentes análises podem variar. Isto pode ocorrer devido a diferenças de inóculo, o que pode ocorrer mesmo em análises distintas realizadas em um mesmo laboratório; diferenças na qualidade da lactulose utilizada como referência (100% fermentação) ou mesmo de equipamentos utilizados principalmente para quantificação dos AGCC (diferentes colunas e métodos de cromatografia a gás). Estas variáveis de difícil uniformização dificultam muitas vezes a comparação de resultados.

Tabela 15 - Perfil de fermentação *in vitro* da massa de banana verde (MBV) realizada em diferentes laboratórios

	AGCC Totais ¹ (mmol/g substrato)	RNF ² (% da massa inicial)	DpH ³ (0h-24h)	Pressão ⁴ (psi)
Análise Madri⁵				
Lactulose	9,46 ± 0,80	n.d.	n.d.	10,80 ± 0,99
MBV	8,58 ± 0,27	n.d.	n.d.	8,15 ± 0,07
Análise SP⁶				
Lactulose	3,66 ± 0,56	9,88 ± 0,52	0,89	8,50 ± 0,71
MBV	2,80 ± 0,73	61,75 ± 0,09	0,44	4,50 ± 0,71

¹soma das quantidades de acetato, propionato e butirato; ²resíduo não fermentado em 24h; ³(média de pH 24h) - (média de pH 0h); ⁴pressão em 24h; ⁵realizada no Departamento de Nutrición I, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid; ⁶realizada no Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, FCF/USP. Resultados expressos como média ± DP.

A fermentabilidade das amostras expressa como porcentagem de um produto referência de 100% de fermentabilidade (lactulose) fornece medidas que facilitam um pouco

mais a comparação entre os resultados. Entretanto, a produção dos AGCC, expressa em proporção molar, ainda é o melhor parâmetro comparativo (Tabela 16).

Tabela 16 - Fermentabilidade *in vitro* da massa de banana verde (MBV) calculada por análise em diferentes laboratórios

	Proporção Molar (acet:prop:but)	Fermentabilidade ¹ (%)			
		AGCC ²	RNF ³	pH ⁴	Pressão ⁵
Análise Madri⁶					
Lactulose	60:26:14	100,00	100,00	n.d.	100,00
MBV	62:29:09	90,65 ± 4,73	87,83 ± 4,63	n.d.	75,46 ± 0,98
Análise SP⁷					
Lactulose	65:15:20	100,00	100,00	100,00	100,00
MBV	57:23:20	74,56 ± 18,23	47,81 ± 0,11	50,00	52,94 ± 8,32

¹calculada tendo os valores da lactulose como referência (100%); ²soma de acetato, propionato, isobutirato, butirato, isovalerato e valerato; ³resíduo não fermentado = 100 X (massa seca final de resíduo após a fermentação) / (massa seca inicial de amostra) ⁴(média de pH 24h) - (média de pH 0h); ⁵pressão em 24h; ⁶realizada no Departamento de Nutrición I, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid; ⁷realizada no Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, FCF/USP. Resultados expressos como média ± DP.

A fermentação *in vitro* é um método bem reprodutível, entretanto a falta de padronização dificulta comparações entre trabalhos (CUMMINGS et al, 1994).

Pesquisas entre laboratórios europeus vêm buscando estudar as variáveis que condicionam a fermentação colônica *in vitro* dos carboidratos e determinar as condições ótimas do processo (BARRY et al., 1995; CAMBRODÓN; MARTIN-CARRÓN, 2001).

Neste contexto, apesar da MBV ter sido fermentada *in vitro* em Madri primeiramente, ela foi novamente analisada no Brasil juntamente com outras amostras estudadas no presente trabalho, para possibilitar comparações entre os diversos parâmetros avaliados.

5.4 Ensaio de curta duração com humanos

5.4.1 Caracterização de carboidratos dos produtos ingeridos por humanos

Para a elaboração de curvas glicêmicas em humanos saudáveis, foram utilizados três produtos testados e um produto referência. Os produtos testados foram a banana madura (BM), a massa de banana verde (MBV) e o amido de banana verde (ABV).

Antes de sua ingestão, foram determinados os teores de frações de amido e a umidade de cada produto de banana verde. Tais dados podem ser visualizados nas Tabelas 9 e 10.

O pão possui umidade = 26% e AT = 51% b.i.. A BM apresenta umidade = 79%, AT = 0,9% b.i. e açúcares solúveis = 20,6% b.i. (SOUZA, 2004). A composição dos produtos de banana verde (MBV e ABV) pode ser verificada no item 5.2.

5.4.2 Resposta glicêmica de humanos a uma primeira refeição

Foram avaliadas as respostas glicêmicas ao pão, à banana madura (BM), à massa de banana verde (MBV) e ao amido de banana verde (ABV) em humanos, após jejum de 8 a 10 horas. Os resultados das respostas glicêmicas encontram-se expressos na Tabela 17 e nos Gráficos 1 a 3.

Tabela 17 - Resposta glicêmica a diferentes produtos como primeiras refeições – ensaio com humanos

1ª Refeição	Glicemia (mmol/L)						
	0min	15min	30min	45min	60min	90min	120min
Pão (1)	5,3 ± 0,1	5,6 ± 0,2	6,8 ± 0,3	7,3 ± 0,3	7,0 ± 0,3	6,2 ± 0,2	5,8 ± 0,2
BM	5,1 ± 0,1	6,4 ± 0,3	7,0 ± 0,3	6,4 ± 0,2	5,7 ± 0,2	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1
Pão (2)	4,9 ± 0,3	5,5 ± 0,4	6,8 ± 0,3	7,0 ± 0,5	6,9 ± 0,3	6,0 ± 0,4	5,9 ± 0,2
MBV	5,1 ± 0,1	5,4 ± 0,1	6,7 ± 0,2	6,6 ± 0,3	6,0 ± 0,4	5,6 ± 0,3	5,4 ± 0,2
Pão (3)	4,8 ± 0,1	6,0 ± 0,3	7,1 ± 0,3	6,8 ± 0,3	6,2 ± 0,3	5,8 ± 0,2	5,5 ± 0,2
ABV	4,9 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,1 ± 0,2	5,0 ± 0,2	4,8 ± 0,1	4,6 ± 0,1

BM = banana madura; MBV = massa de banana verde; ABV = amido de banana verde. Resultados expressos como média ± SEM.

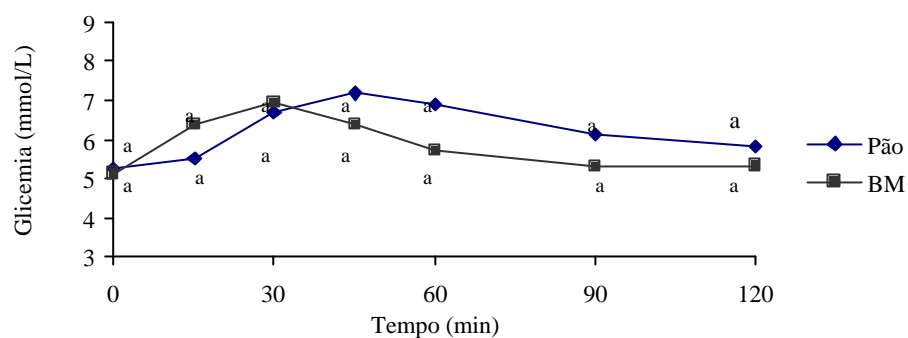


Gráfico 1 - Curvas de resposta glicêmica ao pão e à banana madura (BM) como primeiras refeições – ensaio com humanos
Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (“t” de Student).

As curvas glicêmicas foram construídas com a média da resposta glicêmica dos voluntários em cada ponto de coleta de sangue. Nota-se que as respostas glicêmicas à banana madura e à MBV (Gráficos 1 e 2) são estatisticamente iguais à resposta glicêmica ao pão quando comparadas ponto a ponto.

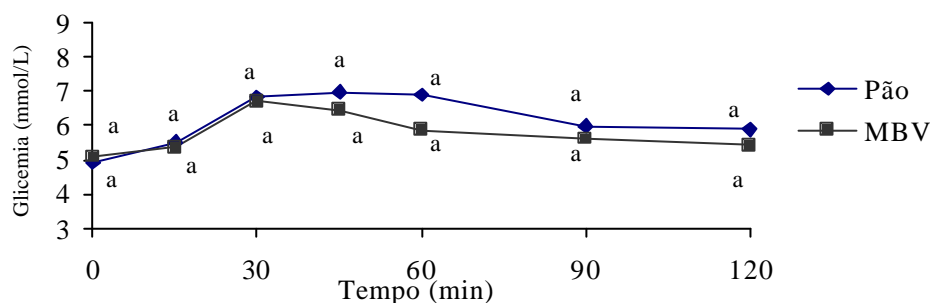


Gráfico 2 - Curvas de resposta glicêmica ao pão e à massa de banana verde (MBV) como primeiras refeições – ensaio com humanos
Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (“t” de Student).

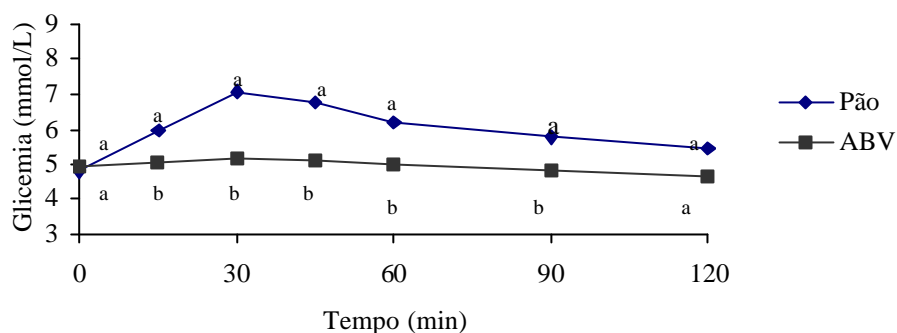


Gráfico 3 - Curvas de reposta glicêmica ao pão e ao amido de banana verde (ABV) como primeiras refeições – ensaio com humanos
Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (“t” de Student).

O Gráfico 3 apresenta a resposta glicêmica ao ABV abaixo da resposta ao pão na maioria dos tempos avaliados, sendo estatisticamente diferente entre 15 e 90 minutos. Tal resposta glicêmica é coerente com seu alto teor de AR (60%b.i.) e baixo de AD (15%b.i.) (Tabela 10).

No Gráfico 4, fica mais clara a diferença entre as respostas glicêmicas proporcionadas por cada produto.

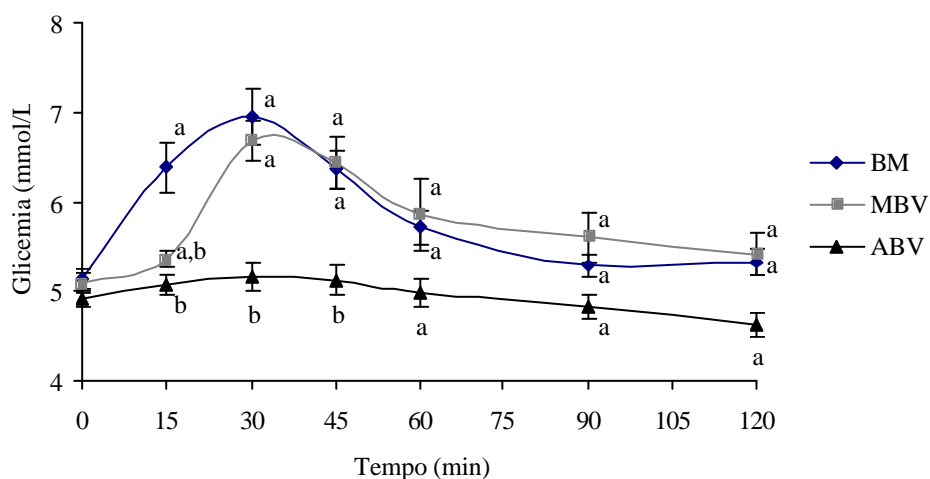


Gráfico 4 - Curvas de reposta glicêmica à banana madura (BM), à massa de banana verde (MBV) e ao amido de banana verde (ABV) como primeiras refeições – ensaio com humanos
Os pontos indicam médias e as barras verticais o erro padrão da média (SEM). Letras sobrescritas diferentes em cada tempo representam diferença significativa, $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey).

Observando Gráfico 4, nota-se que a resposta glicêmica ao ABV é significativamente diferente das respostas à BM e à MBV nos principais pontos de pico glicêmico (15, 30 e 45 minutos). Isto é coerente com seu alto teor de amido resistente, resultando em pequena liberação de glicose quando ingerido, enquanto a maior parte do amido é levada ao intestino grosso onde poderá servir de substrato para a fermentação colônica. No tempo $t=15\text{min}$, a resposta glicêmica à MBV foi significativamente diferente da BM, proporcionando deslocamento da curva para a direita, embora em $t=30\text{min}$ a diferença não tenha sido mais significativa. Isto pode indicar que os carboidratos da MBV são mais lentamente digeríveis do que os da BM.

5.4.3 Índice glicêmico em humanos

A partir dos resultados da resposta glicêmica às primeiras refeições em humanos saudáveis (item 5.4.2), foram calculados o IG de banana madura (BM), da massa de banana verde (MBV) e do amido de banana verde (ABV).

Cabe ressaltar que no presente trabalho o teor de carboidratos ingerido foi referente à soma dos carboidratos disponíveis e não-disponíveis. Somente nos casos do pão e da BM é que foram ingeridos 50g de carboidrato disponível (amido disponível e açúcares solúveis), segundo o proposto pela definição de IG (JENKINS et al., 1981; BROUNS et al., 2005), tornando possível a comparação do IG da BM com valores de outros bancos de dados de IG. Os valores de IG determinados para os produtos de banana verde só possibilitam discussões e comparações no presente trabalho.

Quando o alimento referência (100%) é o pão, o $IG \leq 75$ é considerado baixo e sugere que o alimento analisado é constituído principalmente por carboidratos de lenta digestão. Quando $IG \geq 95$, o índice é considerado alto e sugere grande presença de carboidratos de

rápida digestão (MENEZES; LAJOLO, 2003). Assim, para $75 < IG < 95$, o índice é considerado médio.

A Tabela 18 apresenta os IGs de diversos produtos avaliados em humanos saudáveis.

Tabela 18 - Índice glicêmico (IG) de diferentes produtos - ensaio com humanos

Alimento/Produto	n	IG (%)
Pão	*	100
BM	14	86,5 + 13,7 ^a
MBV	9	65,3 + 12,7 ^b
ABV	9	11,1 ± 3,8 ^c

n = número de voluntários participantes; *variável (n = 9 a 14). Resultados de IG expressos como média ± SEM. Dados com letras sobscritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey).

Observando os valores expressos na Tabela 18, que mostra o pão como referência de $IG=100\%$, o IG da BM pode ser classificado como médio ($75\% < IG < 100\%$). Apesar da banana madura (BM) conter alto teor de carboidratos disponíveis (item 5.4.2) seu IG foi médio, mostrando que provavelmente tais carboidratos não são de digestão tão rápida quanto o amido do pão. A BM foi estudada por ser um alimento abundante, de baixo custo e alto consumo no país; o que torna o valor de seu IG um dado de importância para tabelas de composição de alimentos nacionais. É importante ressaltar que as informações sobre o IG de da BM serão incluídos na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (USP, 1998).

A título de comparação, o IG da MBV e do ABV podem ser classificados como baixos ($IG < 75$). A MBV, apesar perder grande parte do AR durante seu processamento, apresentou baixo IG e ainda contém significativo teor de AR e fibra alimentar (Tabela 10). Assim, a MBV pode trazer os diversos benefícios de dietas com baixo IG e alto teor de carboidratos não-disponíveis (DANONE VITAPOLE/FAO, 2001; LAJOLO et al., 2001).

O ABV é um produto com um IG extremamente baixo, o que é coerente com seu alto teor de AR e baixo teor de AD (Tabela 10).

5.4.4 “Efeito segunda refeição” em humanos em ensaio de curta duração

O “efeito segunda refeição”, que se refere à capacidade de uma primeira refeição influenciar a reposta glicêmica de uma refeição subsequente, foi avaliado em humanos saudáveis. Foi investigado se os produtos ABV e MBV exercem influência em uma refeição padrão subsequente à sua ingestão (pão).

A primeira refeição foi ingerida após jejum de 8 a 10 horas e a segunda refeição foi ingerida 4 horas após a primeira. Os resultados obtidos estão nos Gráficos 5 e 6 e nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19 - Comparação entre respostas glicêmicas ao pão como segunda refeição, após pão ou amido de banana verde (ABV) como primeira refeição – ensaio com humanos

2ª Refeição	Glicemia (mmol/L)						
	Tempo (min)						
	0	15	30	45	60	90	120
Pão após pão	4,7 ± 0,1	6,1 ± 0,2	7,6 ± 0,3	7,3 ± 0,2	6,5 ± 0,3	6,2 ± 0,1	5,8 ± 0,2
Pão após ABV	4,8 ± 0,1	5,9 ± 0,3	7,3 ± 0,4	7,2 ± 0,4	6,7 ± 0,4	6,3 ± 0,2	6,1 ± 0,1

Resultados expressos como média \pm SEM.

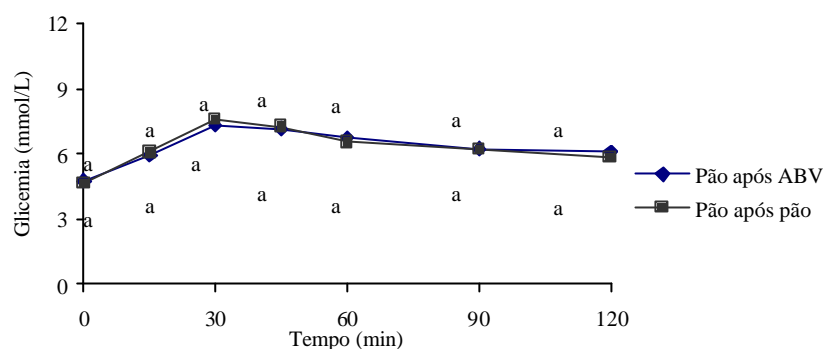


Gráfico 5 - Curvas de resposta glicêmica ao pão, como segunda refeição, após pão ou amido de banana verde (ABV) como primeira refeição - ensaio com humanos. Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ ("t" de Student).

A Tabela 19 e o Gráfico 5 mostram o “efeito segunda refeição” de ABV em humanos. Como já visto, o ABV proporciona uma resposta glicêmica consideravelmente baixa como primeira refeição. Por isso, foi investigado se tal produto causaria alguma queda na resposta glicêmica à segunda refeição em relação ao pão ingerido após pão. Tal efeito não foi observado de acordo com o Gráfico 5.

Duas hipóteses podem ser especuladas para a explicação de tal fato. A primeira é que não houve tempo suficiente para que houvesse fermentação do AR para que seus produtos exercessem qualquer efeito sobre a resposta glicêmica à segunda refeição; outra é que o ABV possui uma resposta glicêmica tão baixa na primeira refeição que o organismo teria se comportado como se estivesse praticamente se mantido em jejum, aceitando a segunda refeição como se fosse a primeira após um jejum mais prolongado.

Os resultados dos estudos sobre o efeito de primeira refeição de MBV sobre a segunda refeição são mostrados na Tabela 20 e Gráfico 6.

Tabela 20 - Comparação entre respostas glicêmicas ao pão como segunda refeição, após pão ou massa de banana verde (MBV) como primeira refeição – ensaio com humanos

2ª Refeição	Glicemia (mmol/L)						
	Tempo (min)						
	0	15	30	45	60	90	120
Pão após pão	4,8 ± 0,2	5,1 ± 0,3	6,6 ± 0,4	6,8 ± 0,4	7,2 ± 0,5	6,3 ± 0,3	6,0 ± 0,3
Pão após MBV	5,0 ± 0,2	5,1 ± 0,2	6,1 ± 0,3	7,3 ± 0,3	7,3 ± 0,3	6,7 ± 0,3	6,5 ± 0,2

Resultados expressos como média ± SEM.

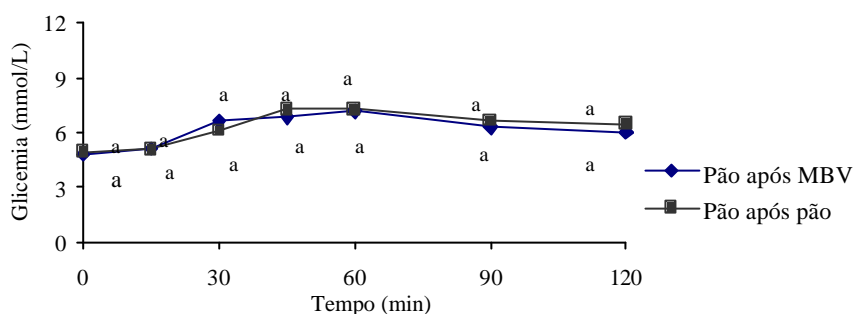


Gráfico 6 - Curvas de resposta glicêmica ao pão, como segunda refeição, após pão ou massa de banana verde (MBV) como primeira refeição - ensaio com humanos. Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (“t” de Student).

Pela Tabela 20 e Gráfico 6 não foi observado “efeito segunda refeição” significativo também com a MBV como primeira refeição.

Tabela 21 - Comparação das áreas abaixo da curva (AAC) de resposta glicêmica a pão como segunda dieta após primeira dieta com diferentes produtos – ensaio com humanos

2ª Refeição	AAC de glicemia
	(mmol.min/L)
Pão após Pão ¹	175 ± 21
Pão após MBV	181 ± 24
Pão após Pão ²	200 ± 26
Pão após ABV	209 ± 24

¹ingerido pelo mesmo grupo de voluntários que ingeriu MBV; ² ingerido pelo mesmo grupo de voluntários que ingeriu ABV; MBV = massa de banana verde; ABV = amido de banana verde. Resultados expressos como média ± SEM.

Pela avaliação das áreas abaixo da curva (AAC) exibidas na Tabela 21, definitivamente não houve “efeito segunda refeição” com os produtos de banana verde ingeridos por humanos.

A justificativa se baseia principalmente na primeira hipótese apresentada para o ABV, onde o possível “efeito segunda refeição” seria consequência da fermentação da MBV, e neste caso, não houve tempo para que seus efeitos exercessem influência sobre a glicemia.

5.5 Ensaio de curta duração com animais

5.5.1 Resposta glicêmica de ratos a uma primeira dieta

Os ensaios de curta duração com ratos foram os primeiros ensaios realizados *in vivo*, servindo como orientação para os ensaios posteriormente realizados com humanos (item 5.4), por exemplo, para avaliar a resposta glicêmica a produtos de banana verde. No ensaio de curta duração em ratos, as respostas glicêmicas a dois produtos foram avaliadas em ratos tratados com ração comercial do biotério (FCF/IQ-USP) acrescida de antibiótico (RCA) e ratos tratados com ração sem antibiótico (RSA) na fase de adaptação (5 dias). Tais tratamentos foram realizados para obter-se um grupo de animais com flora bacteriana normal e ou com a mesma extinta pela ação do antibiótico.

As dietas administradas por sonda gástrica após a fase de adaptação (com e sem antibiótico), consistiram em amido de banana verde laboratorial (ABV-L) ou massa de banana verde (MBV). Tais produtos foram considerados como a primeira dieta dos animais após jejum de 18 horas.

Os resultados obtidos no ensaio com ratos sem tratamento prévio com antibiótico (RSA) podem ser visualizados na Tabela 22 e nos Gráficos 7 e 8.

Tabela 22 - Resposta glicêmica a diferentes produtos como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA)

1ª Dieta	Glicemia (mmol/L)				
	Tempo (min)				
	0	30	60	90	120
Pão	2,2 ± 0,1	9,4 ± 0,4	10,6 ± 0,3	7,9 ± 0,4	5,7 ± 0,2
MBV	2,5 ± 0,1	9,5 ± 0,5	8,0 ± 0,2	6,7 ± 0,3	5,6 ± 0,1
ABV-L	2,5 ± 0,1	5,0 ± 0,3	6,0 ± 0,3	6,5 ± 0,3	6,0 ± 0,3

MBV = massa de banana verde; ABV-L = amido de banana verde laboratorial. Resultados expressos como média ± SEM

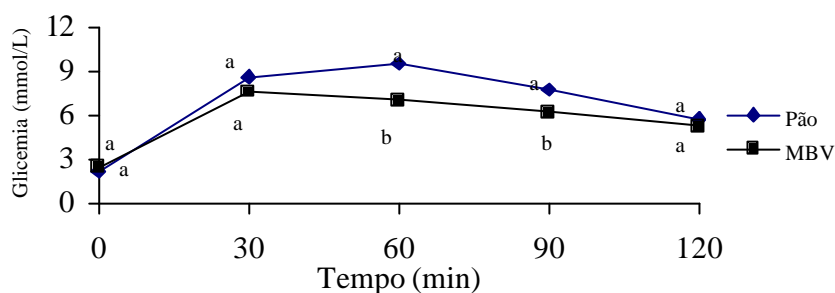


Gráfico 7 - Curvas de resposta glicêmicas ao pão e à massa de banana verde (MBV) como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA). Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (“t” de Student).

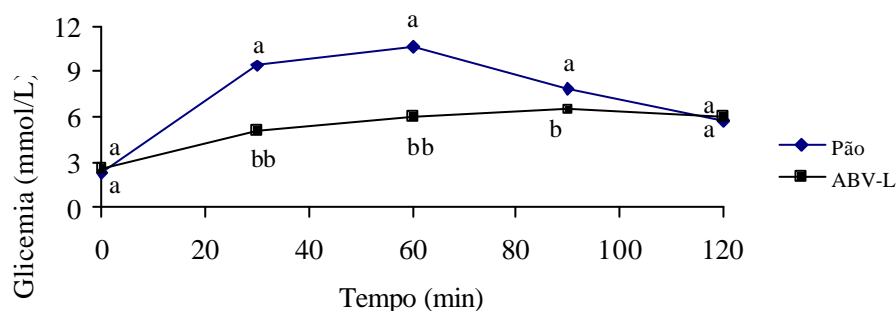


Gráfico 8 - Curvas de resposta glicêmica ao pão e ao amido de banana verde laboratorial (ABV-L) como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA). Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (“t” de Student).

Em RSA, pôde-se notar respostas glicêmicas crescentes para o ABV-L, MBV e pão, respectivamente (Tabela 22), o que é coerente com os teores de AD dos produtos estudados (Tabelas 6 e 7) e com o esperado no caso do pão. De acordo com o Gráfico 7, a MBV produziu respostas glicêmicas discretamente menores do que o alimento referência. Já o ABV-L, produziu respostas glicêmicas ainda menores (Gráfico 8).

A Tabela 23 e os Gráficos 9 e 10 mostram os resultados dos mesmos parâmetros, mas obtidos em ratos com tratamento prévio com antibiótico (RCA).

Tabela 23 - Resposta glicêmica a diferentes produtos como primeiras dietas - ensaio com ratos tratados com antibiótico (RCA)

1ª Dieta	Glicemia (mmol/L) de RCA				
	Tempo (min)				
	0	30	60	90	120
Pão	2,2 ± 0,1	8,6 ± 0,4	9,5 ± 0,6	7,7 ± 0,4	5,7 ± 0,4
MBV	2,5 ± 0,1	7,6 ± 0,5	7,0 ± 0,4	6,2 ± 0,2	5,3 ± 0,2
ABV	2,8 ± 0,1	4,6 ± 0,4	5,1 ± 0,3	5,5 ± 0,3	5,7 ± 0,3

MBV = massa de banana verde; ABV-L = amido de banana verde laboratorial. Resultados expressos com média ± SEM.

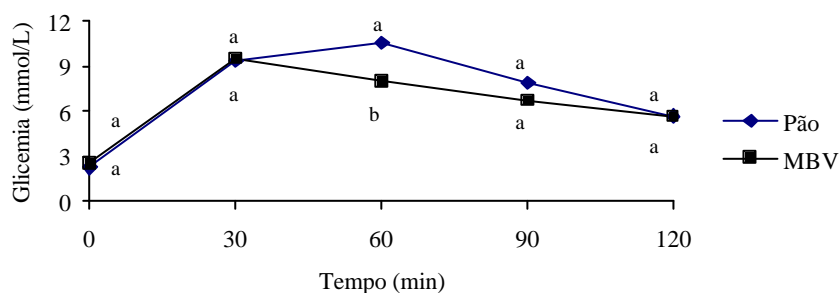


Gráfico 9 - Curvas de resposta glicêmica ao pão e à massa de banana verde (MBV) como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados com antibiótico (RCA) Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (“t” de Student).

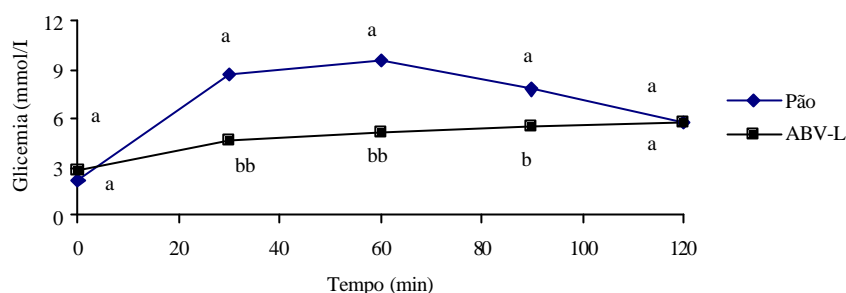


Gráfico 10 - Curvas de resposta glicêmica ao pão e ao amido de banana verde (ABV-L) como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados com antibiótico (RCA)
Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (“t” de Student).

As mesmas observações feitas quanto aos resultados obtidos em RSA, podem ser feitas quanto aos RCA (Tabela 23 e Gráficos 9 e 10).

Comparando os resultados obtidos em RSA e RCA, produto por produto, nos Gráficos 8 e 10 percebe-se que a resposta glicêmica à MBV é mais baixa que a resposta do pão, porém não tão baixa como a resposta ao ABV-L (Gráficos 9 e 11). Como os dois grupos receberam a mesma quantidade de AT, mas o ABV-L possui maior teor de AR, a resposta observada é consequência do maior teor de AD na MBV decorrente da gelatinização de parte do amido durante o cozimento da banana verde.

Nos Gráficos 8 e 10 nota-se que a resposta glicêmica ao ABV é baixa em relação ao pão. Tal resultado já era esperado considerando-se o alto teor de AR e o baixo teor de amido disponível presente neste produto. Basicamente todo seu amido não é disponível. Para uma melhor visualização da comparação entre as respostas glicêmicas em ratos tratados previamente com e sem antibiótico (RSA X RCA), foi construído o Gráfico 11.

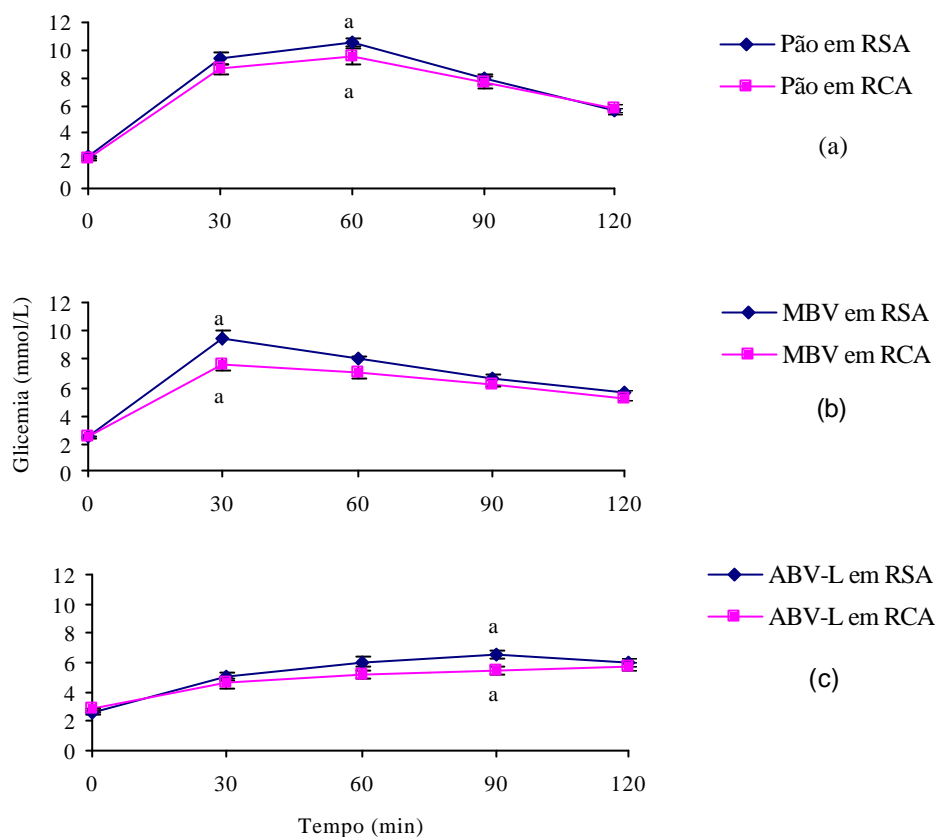


Gráfico 11 - Curvas de resposta glicêmica ao pão (a), à massa de banana verde (MBV) (b) e ao amido de banana verde laboratorial (ABV-L) (c) como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA) ou com antibiótico (RCA). Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (“t” de Student). Barras de erros verticais representam erro padrão da média (SEM).

Estatisticamente, comparando-se as curvas glicêmicas de RSA e RCA, a resposta glicêmica ponto a ponto foi igual para os dois grupos. Dessa forma, pode-se concluir que nas condições experimentais deste ensaio de curta duração em ratos, a flora bacteriana não interferiu na resposta glicêmica pós-prandial.

Os Gráficos 12 e 13 relacionam as respostas glicêmicas aos três produtos administrados em cada grupo de animais. O ABV-L e a MBV apresentaram respostas glicêmicas reduzidas em relação ao pão, sendo a resposta ao ABV-L muito mais contrastante. Tal relação continua sendo observada tanto em RSA como em RCA. Estes resultados são

coerentes com o teor de AD de cada produto, representado pela diferença entre AT e AR (Tabelas 6 e 7).

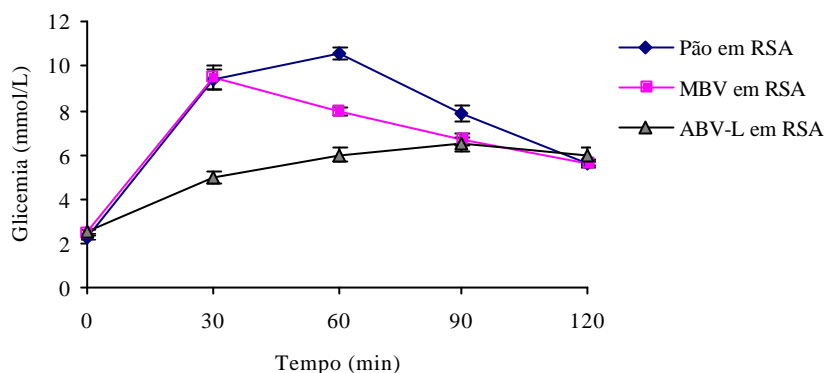


Gráfico 12 - Curvas de resposta glicêmica a diferentes produtos como primeiras dietas – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA)

MBV = massa de banana verde; ABV-L = amido de banana verde laboratorial. Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (“t” de Student). Barras de erros verticais representam erro padrão da média (SEM).

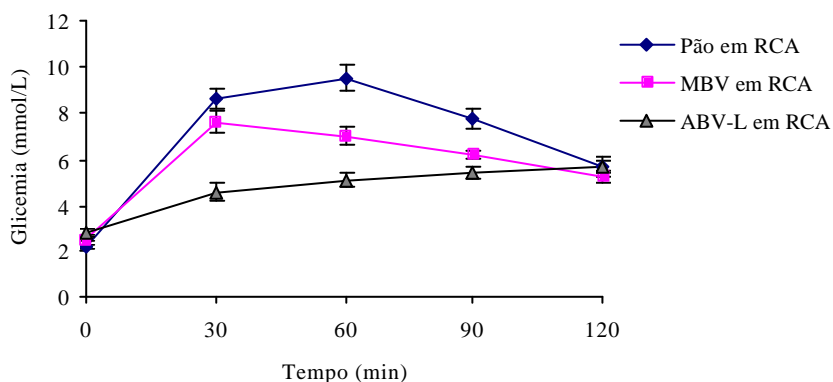


Gráfico 13 - Curvas de resposta glicêmica a diferentes produtos como primeiras dietas - ensaio com ratos tratados com antibiótico (RCA)

MBV = massa de banana verde; ABV-L = amido de banana verde laboratorial. Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (“t” de Student). Barras de erros verticais representam erro padrão da média (SEM).

Nota-se também que cada alimento possui uma curva própria, isto é, sua forma em geral se mantém quando comparados os dois grupos de ratos estudados. Isto mostra que a queda ou aumento da taxa de absorção da glicose em RSA ou RCA mantém uma relação constante para cada produto, apesar das variações individuais entre cada animal.

5.5.2 Índice glicêmico (IG) em ratos

Os resultados de IG obtidos em ratos tratados previamente com antibiótico (RCA) e sem o mesmo (RSA), estão presentes na Tabela 24.

Tabela 24 - Índice glicêmico (IG) de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde laboratorial (ABV-L) - ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA) ou com antibiótico (RCA)

Produto	IG (%)	
	RSA	RCA
Pão	100	100
MBV	74 ± 10 ^a	70 ± 4 ^a
ABV-L	56 ± 3 ^b	40 ± 4 ^c

Resultados expressos como média ± SEM. Letras sobrescritas diferentes expressam diferença significativa, $p < 0,05$ ("t" de Student). A diferença foi analisada tanto entre colunas como entre linhas.

De acordo com a Tabela 24 e Figura 2, o IG da MBV foi significativamente diferente do IG de ABV-L tanto em RSA (74 e 56%, respectivamente) como em RCA (70 e 40%, respectivamente). Mesmo assim, os IGs tanto da MBV quanto do ABV-L podem ser classificados como baixos, em animais.

Conforme já mencionado, os resultados obtidos nestes ensaios com ratos foram importantes para delinear os ensaios realizados posteriormente em humanos.

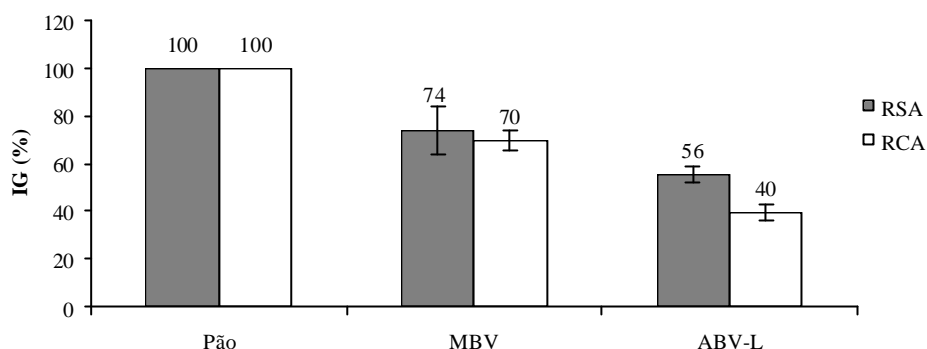


Figura 2 - Comparação entre índices glicêmicos (IG) de diferentes produtos - ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA) ou com antibiótico (RCA)
 MBV = massa de banana verde; ABV-L = amido de banana verde laboratorial. Diferença, entre colunas referentes a um mesmo produto, analisada por teste “t” de Student, considerando $p < 0,05$. Barras de erros verticais representam erro padrão da média (SEM).

Os valores de IG entre RSA e RCA foram significativamente diferentes para o ABV-L, mas não para a MBV. Entretanto, analisando novamente os Gráficos 12 e 13, não foi observada diferença entre as respostas glicêmicas a estes, quando analisadas ponto a ponto.

5.5.3 “Efeito segunda dieta” em ratos em ensaio de curta duração

O “efeito segunda dieta” foi estudado em ratos, visando avaliar se os produtos ABV-L e MBV (baixos IGs) seriam capazes de proporcionar tal efeito sobre a resposta glicêmica a uma segunda dieta padrão de (pão) e, além disso, verificar se a presença ou não da flora bacteriana exercia alguma influência sobre tal processo em ensaio de curta duração.

A primeira refeição foi ingerida após jejum de 18 horas e a segunda refeição foi ingerida 4 horas após a primeira. Os resultados podem ser observados na Tabela 25 e nos Gráficos 14 e 15.

Tabela 25 - Respostas glicêmicas ao pão como segunda dieta, após pão, massa de banana verde (MBV) ou amido de banana verde (ABV-L) como primeira dieta – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA) ou com antibiótico (RCA)

	Glicemia (mmol/L)				
	Tempo (min)				
	0	30	60	90	120
2ª Dieta de RSA					
Pão após Pão (1)	3,5 + 0,7	10,8 + 1,4	9,0 + 1,1	8,2 + 1,4	5,7 + 0,8
Pão após MBV	3,9 ± 0,6	9,5 ± 1,1	8,7 ± 0,6	7,6 ± 0,9	5,4 ± 0,7
Pão após ABV-L	4,0 ± 0,6	9,8 ± 1,2	9,0 ± 1,2	8,3 ± 0,6	6,1 ± 0,5
2ª Dieta de RCA					
Pão após Pão (2)	3,8 ± 0,7	11,0 ± 1,3	9,8 ± 1,1	6,9 ± 1,0	5,5 ± 0,8
Pão após MBV	3,7 + 1,0	8,7 + 1,6	8,3 + 1,1	6,4 + 1,3	5,1 + 0,9
Pão após ABV-L	4,4 + 0,3	9,7 + 2,1	8,5 + 1,0	7,1 + 1,5	5,8 + 0,8

Valores expressos como média ± desvio padrão (DP).

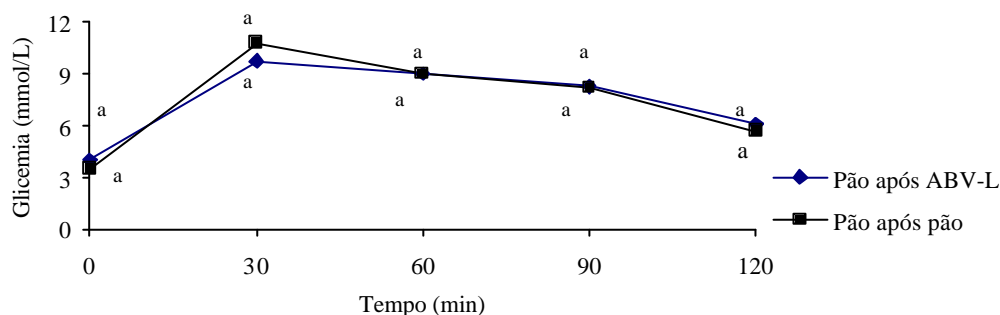


Gráfico 14 - Curvas de resposta glicêmica ao pão como segunda dieta, após pão ou amido de banana verde (ABV-L) como primeira dieta - ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA) Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobscritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ ("t" de Student).

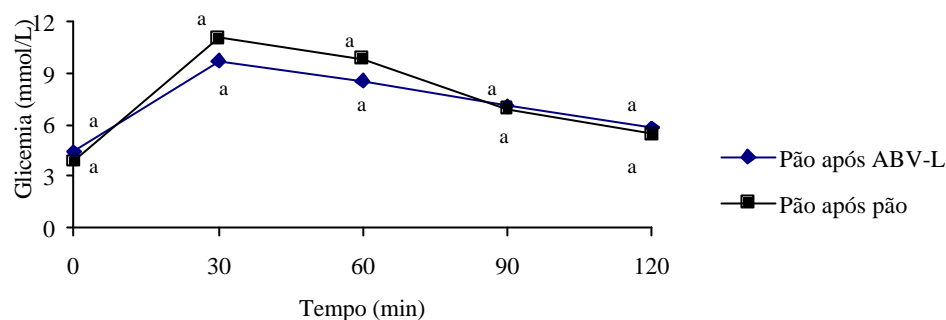


Gráfico 15 - Curvas de resposta glicêmica ao pão como segunda dieta, após pão ou amido de banana verde (ABV-L) como primeira dieta - ensaio com ratos tratados com antibiótico (RCA) Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ ("t" de Student).

Estatisticamente, de acordo com os Gráficos 14 e 15, o ABV-L, como primeira dieta não influenciou na resposta glicêmica à segunda dieta ponto a ponto, tanto em RSA como em RCA. Entretanto, foi notada uma tendência à significância na diminuição do pico glicêmico ($t = 30\text{min}$) em ambos os grupos após a dieta com ABV-L.

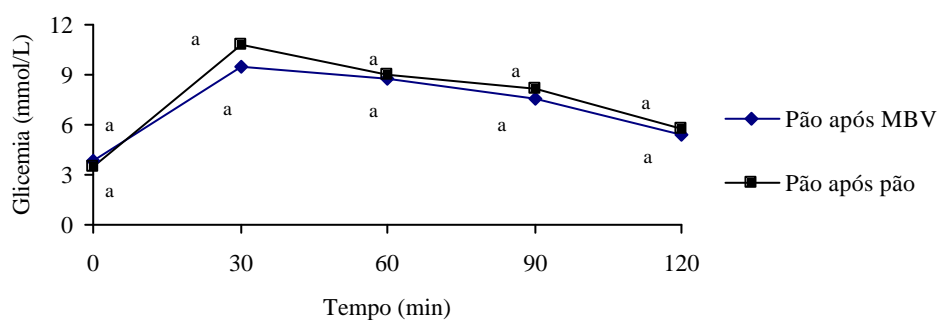


Gráfico 16 - Curvas de resposta glicêmica ao pão como segunda dieta, após pão ou massa de banana verde (MBV) como primeira dieta - ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA) Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ ("t" de Student).

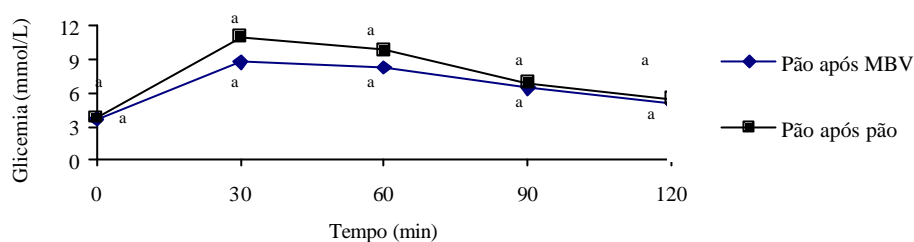


Gráfico 17 - Curvas de resposta glicêmica ao pão como segunda dieta, após pão ou massa de banana verde (MBV) como primeira dieta - ensaio com ratos tratados com antibiótico (RCA) Média de resposta glicêmica em cada tempo com letras sobrescritas diferentes representam diferença significativa, $p < 0,05$ (“t” de Student).

Observando-se os Gráficos 16 e 17, percebe-se que, estatisticamente, novamente não foi observado efeito da primeira dieta (MBV) sobre a resposta glicêmica à segunda (pão) ponto a ponto. Mais uma vez, pôde ser observada uma tendência à queda do pico glicêmico, mais acentuada em RCA.

Tabela 26 - Comparação das áreas abaixo da curva (AAC) de resposta glicêmica ao pão como segunda dieta após primeira dieta com diferentes produtos – ensaio com ratos tratados sem antibiótico (RSA) e com antibiótico (RCA)

2ª Dieta	AAC de glicemia (mmol.min/L)	
	RSA	RCA
Pão após Pão	554 ± 31	510 ± 39
Pão após MBV	$450 \pm 36^{a*}$	$382 \pm 23^{b*}$
Pão após ABV-L	479 ± 12^a	$352 \pm 28^{b*}$

MBV = massa de banana verde; ABV-L = amido de banana verde laboratorial. Resultados expressos como média \pm SEM. Entre dados da mesma coluna, diferença analisada por ANOVA/Tukey, considerando $*p < 0,05$ em relação ao primeiro valor. Entre dados da mesma linha, diferença analisada por teste “t” de Student, onde letras sobrescritas diferentes representam $p < 0,05$.

O efeito de determinadas refeições de baixo IG sobre refeições subsequentes vem sendo avaliado e questionado em diversos trabalhos nas últimas três décadas (ELDER et al., 2006). Enquanto pensava-se apenas em IG e barreiras físicas da fibra impedindo a liberação

de glicose da matriz do alimento, os resultados eram muito contraditórios. Recentemente o mecanismo do “efeito segunda refeição/dieta” vem sendo melhor elucidado quando levado em conta não apenas o IG mas também a quantidade de carboidratos não-disponíveis e fermentáveis.

De acordo com as áreas abaixo da curva exibidas na Tabela 26, o “efeito segunda dieta” em RSA, ratos com flora bacteriana normal, foi significativamente menor para a MBV, enquanto nos RCA, ratos sem flora bacteriana, o efeito ocorreu após a ingestão de ambos os produtos de banana verde como primeira dieta.

Como o “efeito segunda dieta” foi observado em ambos os grupos, isto pode ter sido observado porque os produtos de banana verde como primeira dieta, por serem produtos de baixo IG, ou seja, por proporcionarem moderada liberação de glicose, podem não ter estimulado a secreção de insulina tanto quanto a digestão do pão, alimento de alto IG. Talvez seja por isso que o pão como segunda dieta resultou em menor glicose sanguínea pós-prandial após primeira dieta com produtos de banana verde, que teriam causado menor estímulo das células β poucas horas antes.

5.6 Correlação de resultados obtidos nos ensaios de curta duração com humanos e com animais

Para avaliar a relação entre as repostas glicêmicas à MBV em humanos e ratos, foi realizada a análise de regressão linear com as glicemias pós-prandiais dos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos (Gráfico 18).

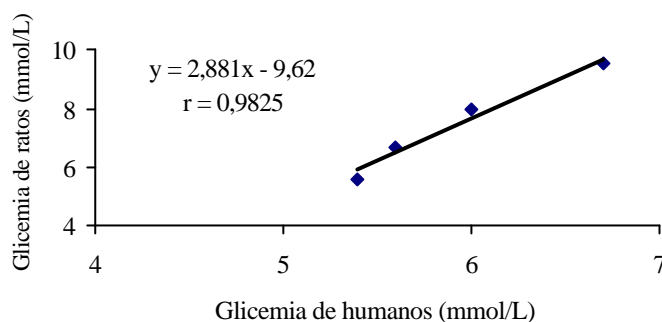


Gráfico 18 - Correlação entre as respostas glicêmicas à massa de banana verde (MBV) em ratos e humanos em 30, 60, 90 e 120 minutos de glicemia pós-prandial

De acordo com o Gráfico 18, a resposta glicêmica à MBV mostrou uma alta correlação positiva entre ratos e humanos.

No caso do ABV, não foi possível avaliar a existência de correlação entre a resposta glicêmica em humanos e animais, uma vez que as amostras de amido isolado utilizadas em ratos e humanos não foram as mesmas.

5.7 Caracterização química das rações utilizadas no ensaio de média duração em animais

5.7.1 Análise da composição das rações

As rações foram elaboradas pela empresa Rhoster Ind. e Com. Ltda. e congeladas (-20°C) para que antes de sua utilização tivessem sua composição centesimal analisada e evitar proliferação de microrganismos.

A ração controle (R-Controle) foi elaborada de acordo com as determinações da AIN-93G. As rações experimentais e controle foram elaboradas com parte dos carboidratos da AIN-93G substituídos por massa de banana verde (R-MBV) ou amido de banana verde (R-ABV), ambos produtos fonte de fibra alimentar (FA) e amido resistente (AR).

A ração experimental R-MBV teve o amido de milho e a celulose substituídos por massa de banana verde (MBV), produto fonte de FA e AR, resultando em uma ração contendo AR = 5%, FA total = 5% (ambos provenientes da MBV), totalizando 10% de carboidratos não-disponíveis em sua formulação. A ração experimental R-ABV teve parte do amido de milho substituído por amido de banana verde (ABV), que consiste em amido de banana verde isolado, com alto teor de amido resistente, resultando em uma ração contendo AR = 10% (provenientes do ABV), FA total = 5% (provenientes de celulose), totalizando 15% de carboidratos não-disponíveis adicionados em sua formulação final.

Assim, foram elaboradas rações objetivando uma ração controle (R-Controle), sem adição de AR, e duas rações experimentais com teores crescentes de AR (R-MBV=5% e R-ABV=10% de AR) provenientes de produtos de banana verde.

A Tabela 27 apresenta os teores das diferentes frações de amido e de fibra alimentar das rações analisados após sua elaboração.

Tabela 27 - Teor das frações de amido e fibra alimentar (FA) das rações

	Amido resistente	Amido disponível	Amido total	FA insolúvel	FA solúvel	FA total
	(%b.i.)					
R-Controle	1,9 ± 0,1	41,44 ± 1,8	43,3 ± 1,7	5,73 ± 0,25	0,11 ± 0,07	5,85 ± 0,30
R-MBV	5,5 ± 0,2	36,5 ± 1,7	42,0 ± 1,6	3,32 ± 0,25	3,30 ± 0,15	6,61 ± 0,32
R-ABV	10,6 ± 0,1	32,3 ± 1,2	42,8 ± 1,2	5,66 ± 0,20	0,04 ± 0,01	5,70 ± 0,19

R-Controle = ração controle AIN93-G; R-MBV = ração com massa de banana verde; R-ABV = ração com amido de banana verde; resultados expressos em base integral (b.i.) como média ± DP.

A partir dos teores de AR e das frações de FA, foram calculados valores teóricos de carboidratos não-disponíveis das rações (Tabela 28). Também foram analisados seus teores de frações indigeríveis, que podem incluir outros produtos além do AR e da FA (Tabela 29).

Tabela 28 - Cálculo teórico do teor de carboidratos não-disponíveis das rações

	Carboidratos não-disponíveis		
	Insolúveis	Solúveis	Totais
	(%b.i.)		
R-Controle	7,63	0,11	7,74
R-MBV	8,82	3,3	12,12
R-ABV	16,26	0,04	16,3

Resultados obtidos por soma das frações de fibra alimentar (FA) e amido resistente (AR) analisados previamente. Resultados expressos em base integral (b.i.).

Tabela 29 - Teores das frações indigeríveis (FI) presentes nas rações

	FI	FI	FI
	insolúvel	solúvel	total
	(%b.i.)		
R-Controle	7,3 ± 0,3	0,3 ± 0,1	7,6 ± 0,1
R-MBV	12,5 ± 0,3	2,2 ± 0,1	14,7 ± 0,7
R-ABV	16,6 ± 0,5	1,8 ± 0,1	18,5 ± 0,8

R-Controle = ração controle AIN93-G; R-MBV = ração com massa de banana verde; R-ABV = ração com amido de banana verde; resultados expressos em base integral (b.i.) como média ± DP.

De acordo com a definição de fração indigerível (SAURA-CALIXTO et al., 2000), os teores de FI total de R-MBV e R-ABV deveriam ser semelhantes entre si e ambos superiores ao teor encontrado em R-Controle. A FI insolúvel é constituída basicamente de amido resistente (AR), fibra alimentar insolúvel (FA insolúvel) e proteína resistente, enquanto o teor de FI solúvel deve-se essencialmente à fibra alimentar solúvel (FA solúvel) e polissacarídeos solúveis. Subtraindo-se da FI total os teores de cinzas e proteínas, espera-se encontrar um valor muito próximo da soma dos teores de AR e FA total da amostra. Ao serem analisadas as Tabelas 27 a 29, verifica-se que tal resultado foi observado. Os resultados também indicam que a proteína presente nas rações era biodisponível, por não fazer parte da FI.

Isto possibilita apoio à proposta de utilização do método de determinação de FI em alternativa aos métodos de análise de FA, no caso de alimentos fonte de carboidratos sem significativo teor de proteínas (SAURA-CALIXTO, 2006).

A Tabela 30 apresenta os resultados das análises de composição centesimal das rações.

Tabela 30 - Composição centesimal das rações

	Umidade (%)	Cinzas	Lipídios (%b.i.)	Proteína	CHO Totais
R-Controle	6,8 ± 0,3	3,0 ± 0,1	7,0 ± 0,0	17,8 ± 0,2	65,5
R-MBV	7,5 ± 0,4	2,9 ± 0,1	6,8 ± 0,1	19,1 ± 0,4	63,7
R-ABV	5,9 ± 0,3	4,6 ± 0,1	7,0 ± 0,1	17,8 ± 0,3	64,8
AIN-93G (referência)	6,6	4,2	7,0	18,0	64,0

R-Controle = ração controle AIN-93G; R-MBV = ração com massa de banana verde; R-ABV = ração com amido de banana verde; CHO Totais = carboidratos totais calculados por diferença. Resultados expressos em base integral (b.i.) como média ± DP.

De acordo com a Tabela 30, pode-se dizer que as rações são isoproteicas e que os demais componentes estão presentes em quantidades semelhantes. Logo, o diferencial entre as rações se resume à qualidade dos carboidratos, a qual pode ser avaliada pelos resultados das Tabelas 27 a 29.

5.8 Perfil da fermentação *in vitro* das rações preparadas para ensaio de média duração com ratos

As rações R-Controle, R-MBV e R-ABV, contendo diferentes teores de AR, foram desengorduradas e tiveram suas frações indigeríveis (FI) isoladas. As FIs foram fermentadas *in vitro* com inóculo de conteúdo cecal de ratos e incubadas a 37°C por 24h em meio anaeróbio bem vedado. A fermentação *in vitro* das rações visou estimar seu possível perfil fermentativo *in vivo*.

As Tabelas 31 e 32 mostram resultados de diversos parâmetros indicativos da fermentação *in vitro* das rações.

Tabela 31 - Fermentabilidade *in vitro* das rações

	Fermentabilidade ¹ (%)							
	pH ²	Pressão ³		RNF ⁴		AGCC totais ⁵		
R-Controle	11,8	26,47	± 4,0	20	± 3,1	44,7	± 5,9	
R-MBV	20,8	47,06	± 0,1	58,9	± 11,0	63,3	± 4,1	
R-ABV	33,2	76,47	± 7,3	59,3	± 3,9	98,4	± 13,9	

¹ sendo lactulose = 100% (referência); ² (média de pH 24h) - (média de pH 0h); ³ pressão formada em 24h; ⁴ porcentagem de resíduo não fermentado = 100 X (massa seca final de resíduo após a fermentação) / (massa seca inicial de amostra); ⁵ soma da produção de acetato, propionato, isobutirato, butirato, isovalerato e valerato (C2-C5). Resultados expressos como média ± DP.

Tabela 32 - Perfil de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos na fermentação *in vitro* das rações

	Proporção molar ¹			AGCC Totais ² (mmol/g substrato)
	Acetato	Propionato	Butirato	
R-Controle	70,1 ± 0,1	17,5 ± 0,8	12,3 ± 0,9	1,7 ± 0,2
R-MBV	62,3 ± 4,1*	22,2 ± 1,1*	15,5 ± 3,0*	2,4 ± 0,1*
R-ABV	71,5 ± 1,4	15,7 ± 0,7*	12,8 ± 0,9	4,1 ± 0,6*

¹ porcentagem de cada AGCC em relação à soma da produção de acetato, propionato e butirato; ² soma da produção de acetato, propionato e butirato. Resultados expressos como média ± DP. Valores a mesma coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes. Diferença, entre valores da mesma coluna, analisada por ANOVA/Tukey, considerando *p<0,05 em relação à R-Controle

De acordo com as Tabelas 31 e 32 pode-se afirmar que as rações são fermentáveis e que todos os parâmetros de fermentabilidade e produção total de AGCC apontam para uma fermentabilidade crescente entre R-Controle, R-MBV e R-ABV, respectivamente.

Muir et al., (2004), em estudos de fermentação de AR e FA, relatam que embora a quantidade total de butirato produzida seja elevada nas fermentações de AR, nem sempre é notada diferença significativa na proporção molar dos AGCC totais produzidos.

5.9 Ensaio de média duração com animais

Como já avaliado, a massa de banana verde (MBV) e o amido de banana verde (ABV) são fontes de carboidratos não-disponíveis (Tabela 10). Seus índices glicêmicos, avaliados pelo teor de carboidratos totais e não somente pelos disponíveis, foram classificados como baixos tanto em humanos como em ratos (Tabelas 18 e 24). Tais produtos, administrados como primeira refeição/dieta, não mostraram efeito significativo sobre a resposta glicêmica à ingestão de uma segunda refeição/dieta padronizada (pão branco) após 4h em humanos. Já em ratos, a refeição posterior ao ABV e à MBV apresentou menor área abaixo da curva (AAC) do que a mesma refeição precedida de alimento de alto IG (pão).

O ensaio de média duração foi realizado com ratos tratados com rações com diferentes quantidades de amido resistente (AR). A ração controle (R-Controle) foi preparada para não ter quantidade significativa de AR, enquanto as rações experimentais R-MBV e R-ABV foram elaboradas de forma que contivessem teor de AR igual a 5% e 10%, respectivamente.

Os animais foram tratados por 28 dias com tais rações para avaliação do efeito da ingestão de diferentes quantidades de AR de banana verde sobre fatores fisiológicos relacionados à síndrome metabólica (glicemia de jejum, resposta glicêmica, tolerância à glicose, secreção de insulina e perfil lipídico). Além disso, foi avaliada a fermentação colônica de cada tipo de ração (item 5.8) para verificação de relação entre seus parâmetros e os demais fatores relacionados à síndrome metabólica.

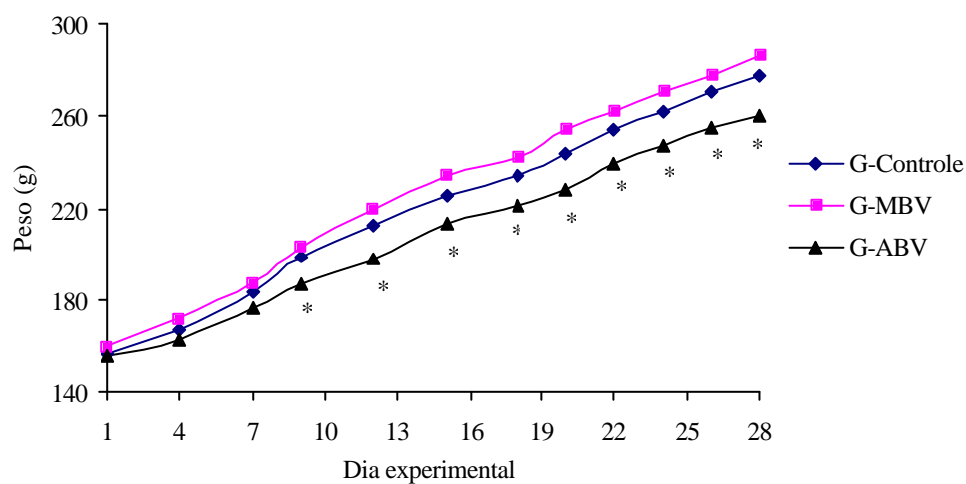
5.9.1 Peso dos ratos

O peso dos animais foi verificado a cada 2 ou 3 dias. Os dados de pesagem dos ratos podem ser observados na Tabela 33 e a curva de crescimento no Gráfico 19.

Tabela 33 - Peso médio dos ratos

Dia	Peso médio (g)		
	G-Controle	G-MBV	G-ABV
1	157 ± 18	160 ± 15	156 ± 17
4	167 ± 12	172 ± 13	163 ± 13
7	183 ± 13	183 ± 16	176 ± 17
9	199 ± 13	204 ± 18	187 ± 19
12	213 ± 13	220 ± 17	198 ± 20
15	226 ± 15	234 ± 21	213 ± 22
18	234 ± 15	242 ± 19	221 ± 23
20	244 ± 16	254 ± 19	228 ± 22
22	254 ± 15	262 ± 19	240 ± 22
24	262 ± 17	270 ± 21	247 ± 22
26	271 ± 17	278 ± 22	255 ± 25
28	277 ± 18	286 ± 22	260 ± 28

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 30 ratos/grupo.

**Gráfico 19 -** Curva de crescimento dos ratos

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 30 ratos/grupo; *p<0,05 mostra diferença significativa em relação ao grupo controle (G-Controle) (ANOVA/Tukey).

De acordo com o Gráfico 19, o peso dos animais do G-ABV apresentou diferença significativa a partir do 9º dia de experimento, enquanto o G-MBV não mostrou diferença em relação ao G-Controle. Isto indica que o consumo de ração com 5% de AR (R-MBV) não influenciou no crescimento dos animais, enquanto o consumo da ração com 10% de AR (R-ABV) já influenciou significativamente o aporte energético dos animais.

5.9.2 Consumo de ração

O consumo de ração pelos animais foi *ad libitum* e foi calculado diariamente durante os 28 dias de ensaio (Gráfico 20).

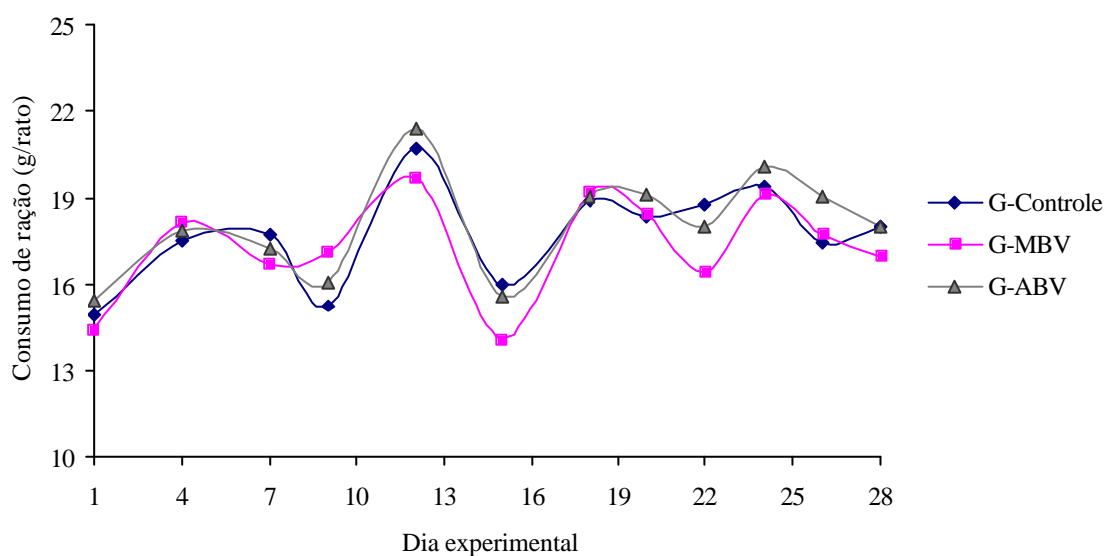


Gráfico 20 - Consumo diário de ração

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 30 ratos/grupo.

Apesar oscilar bastante, não houve diferença entre o consumo médio diário de ração pelos diferentes grupos. Tais oscilações podem ter ocorrido devido a diversas intervenções no ambiente de experimentação.

O fato de não haver diferença no consumo de ração entre os grupos valoriza ainda mais os resultados discutidos no item 5.9.2, referente ao peso dos ratos. Apesar de todos os grupos apresentarem consumo de ração semelhante, o G-ABV teve menor taxa de crescimento em relação ao G-Controle.

Tal resultado pode despertar interesse pelo produto inserido na ração com 10% de AR (ABV) para estudos de manutenção ou redução de peso corpóreo, representando um ingrediente para redução do valor energético dos alimentos. Este efeito pode ser decorrente tanto do tipo quanto do teor de AR que levou a uma redução de 6% no peso final dos animais em relação ao grupo controle.

5.9.3 Fezes: peso e umidade

As fezes foram coletadas em *pool*, nos quatro primeiros dias de cada semana, para avaliação da diferença de umidade (Gráfico 21) e peso seco (Gráfico 22) das fezes dos diferentes grupos ao longo do experimento.

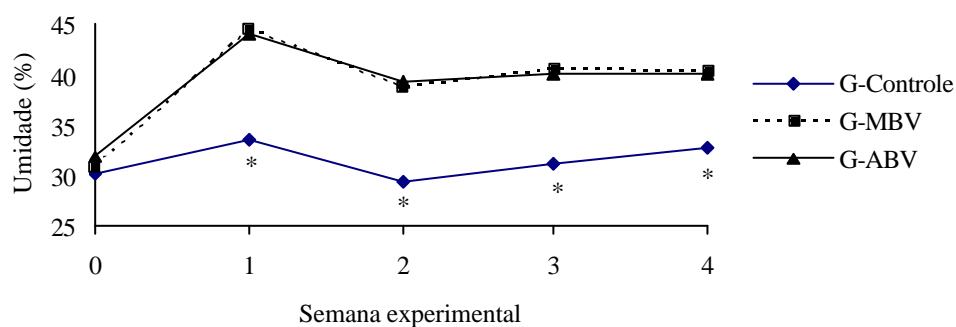


Gráfico 21 - Umidade de pool de fezes dos primeiros quatro dias de cada semana
 G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 30 ratos/grupo; *p<0,01 mostra diferença muito significativa em relação ao grupo controle (G-Controle) (ANOVA/Tukey).

De acordo com o Gráfico 21, nota-se que as fezes dos animais GMBV e G-ABV, alimentados com ração à base de massa de banana verde (MBV) e amido de banana verde (ABV) respectivamente, apresentaram teor de umidade muito superior às do G-Controle. Isto, provavelmente é devido à capacidade dos carboidratos não-disponíveis de proporcionar maior retenção de água no cólon e conseqüentemente aumentar o peso total das fezes. Paralelamente, o Gráfico 22, a seguir, mostra um aumento também no peso seco das fezes do G-ABV, mostrando, possivelmente aumento da flora bacteriana, neste grupo.

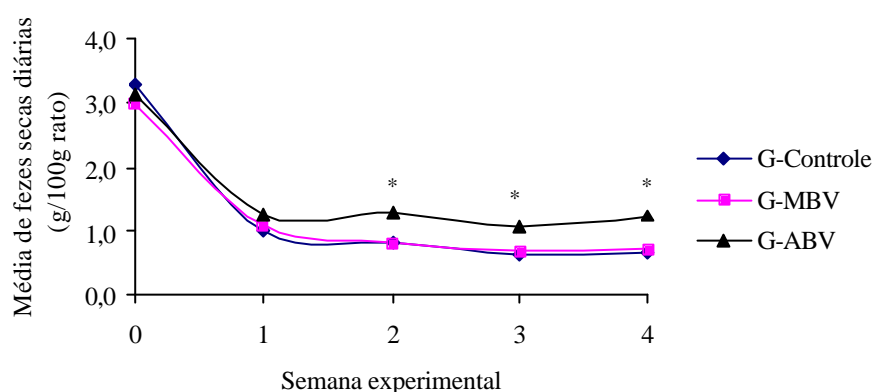


Gráfico 22 - Peso médio de fezes secas diárias em cada semana

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; GMBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); GABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 30 ratos/grupo; * $p < 0,05$ mostra diferença significativa em relação ao grupo controle (G-Controle) (ANOVA/Tukey).

De acordo com os Gráficos 21 e 22 a R-ABV (AR=10%) proporcionou aumento não só na umidade, mas também na massa bacteriana. Já a R-MBV (AR=5%) proporcionou somente aumento na retenção de água nas fezes, uma vez que o peso seco das fezes do G-MBV foi semelhante ao do G-controle.

5.9.4 Estudo do “efeito segunda dieta” em ratos em ensaio de média duração

Para estudar o “efeito segunda dieta”, foi avaliada a resposta glicêmica dos animais em relação ao pão branco (alimento este que produz elevada glicemia pós-prandial), após 7-8 horas de jejum, sendo que as próprias rações foram consideradas as primeiras dietas. Este experimento foi repetido a cada 14 dias (D0, D14, D28) para avaliação da evolução das curvas glicêmicas em resposta à ingestão de pão ao longo do tratamento. A evolução pode ser observada no Gráfico 23.

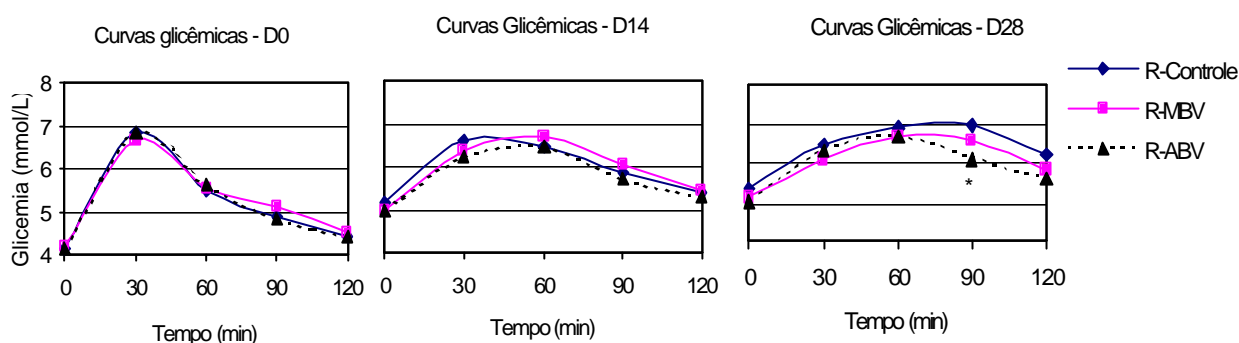


Gráfico 23 - Evolução das curvas glicêmicas em resposta ao pão branco administrado por sonda gástrica ao longo do ensaio de média duração

D0 = dia anterior ao início da administração de rações experimentais; D14 e D21 = 14^o e 21^o dias a partir da administração de rações experimentais; G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 30 ratos/grupo; *p<0,05 mostra diferença significativa em relação ao grupo controle (G-Controle) (ANOVA/Tukey).

Tabela 34 - Comparação das áreas abaixo da curva (AAC) de resposta glicêmica a pão como segunda dieta após primeira dieta com diferentes produtos – ensaio de média duração com ratos

2 ^a Dieta	AAC de glicemia (mmol.L/min)		
	D0	D14	D28
Pão após R-Controle	155 ± 11	127 ± 13	144 ± 15
Pão após R-MBV	144 ± 12	137 ± 15	139 ± 17
Pão após R-ABV	154 ± 9	114 ± 11	175 ± 10

R-Controle = ração controle AIN-93G; R-MBV = ração com massa de banana verde (MBV); R-ABV = ração com amido de banana verde (ABV); n = 30 ratos/grupo. Resultados expressos como média ± SEM. *p<0,05 em dados da mesma coluna mostram diferença significativa em relação ao G-Controle (ANOVA/Tukey).

De acordo com o Gráfico 23 e a Tabela 34, tanto as curvas glicêmicas como as áreas abaixo da curva (AAC) foram semelhantes (não houve diferença estatística) entre o G-Controle e os grupos experimentais. Dessa forma, conclui-se que mesmo após 28 dias de ingestão de rações contendo produtos fonte de carboidratos não-disponíveis e de alta fermentabilidade (R-MBV e R-ABV), não houve redução da resposta glicêmica ao pão.

Apesar dos IGs das rações experimentais serem desconhecidos, a literatura menciona que o “efeito segunda refeição/dieta” tem sido mais encontrado não quando as primeiras dietas são de baixo IG, mas sim quando além de baixo IG possuem consideráveis quantidades de carboidratos não-disponíveis e fermentáveis, como a FA e o RS (ELDER et al., 2006). Este foi o motivo do interesse em investigar o possível “efeito segunda dieta” proveniente das rações experimentais utilizadas nos ensaio de média duração, no presente trabalho.

Evidências epidemiológicas suportam que alimentos com estas características têm grande potencial na prevenção de diabetes tipo 2 (SALMERÓN et al., 1997; ROBERTSON et al., 2002) e na resistência à insulina (McKEOWN et al., 2004). Isto porque um alto teor de carboidratos não-disponíveis e fermentáveis pode aumentar a produção colônica de propionato, que tem sido apontado como um moderador da produção de glicose hepática (VENTER; VORSTER; CUMMINGS, 1990) e do metabolismo lipídico (WOLEVER; BRIGHENTI; ROYALL, 1989).

Elder et al. (2006), recentemente encontraram um significativo efeito “overnight” de dietas ricas em carboidratos não-disponíveis sobre a resposta glicêmica de produtos padronizados na manhã subsequente, com uma redução de 23% na área glicêmica após a ingestão de refeições de baixo IG e composta de grãos integrais (alto teor de AR e FA) na noite anterior (10h antes). Entretanto, tal efeito não foi notado quando a refeição da noite anterior foi composta de produtos de baixo IG, mas com grãos refinados. Semelhante efeito

foi notado por Grandfeldt, Wu e Björck (2005) com refeições noturnas compostas de trigo, mas não de macarrão na resposta glicêmica de café da manhã padronizado.

Outros trabalhos apontam que a redução na área glicêmica em resposta a um mesmo produto pode chegar a 38% dependendo da refeição da noite anterior (WOLEVER et al., 1988; THORBURN; MUIR; PROIETTO, 1993). Por isto, recomenda-se que antes de avaliações de IG de alimentos ou testes de tolerância á glicose, a refeição anterior seja padronizada, melhorando a reprodutibilidade e diminuindo a variação dos resultados obtidos (WOLEVER et al., 2003; ELDER et al., 2006; BROUNS et al., 2005).

5.9.5 Teste de tolerância à glicose (TTG)

Com os valores encontrados de glicose e insulina sanguíneas, foram construídas glicêmicas e insulínicas de 0 a 60 minutos. Foram calculadas as áreas totais abaixo da curva de cada uma e tais áreas foram chamadas áreas glicêmicas (AG) e áreas insulínicas (AI) e podem ser observadas na Tabela 35.

Tabela 35 - Áreas glicêmicas (AG), insulínicas (AI) e sua relação AG/AI no teste de tolerância à glicose (TTG)

	AG (mmol/L.min)	AI (ng/mL.min)	AG/AI (mmol/ng.10 ³)
G-Controle	292,9 ± 14,5	183,6 ± 25,7	1,9 ± 0,1
G-MBV	298,4 ± 10,0	154,5 ± 23,4	2,5 ± 0,5*
G-ABV	302,6 ± 12,4	128,6 ± 22,6	3,2 ± 0,6*

R-Controle = ração controle AIN-93G; R-MBV = ração com massa de banana verde (MBV); R-ABV = ração com amido de banana verde (ABV); n = 8 ratos/grupo. Resultados expressos como média ± SEM. *p<0,05 em dados da mesma coluna mostram diferença significativa em relação ao G-Controle (ANOVA/Tukey).

De acordo com as áreas glicêmicas (AG) e insulínicas (AI) da Tabela 35, não houve diferença significativa entre os valores obtidos em cada grupo experimental e o G-Controle. Já ao observar a relação entre as áreas (AG/AI), houve diferença significativa entre o G-Controle e os dois grupos experimentais.

Nos Gráficos 24 e 25 podem ser observadas as curvas glicêmicas e insulínicas de cada grupo durante o TTG.

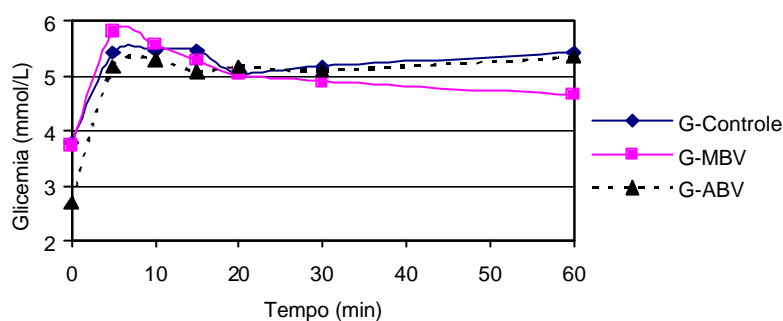


Gráfico 24 - Curvas de resposta glicêmica do teste de tolerância à glicose (TTG) G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 8 ratos/grupo.

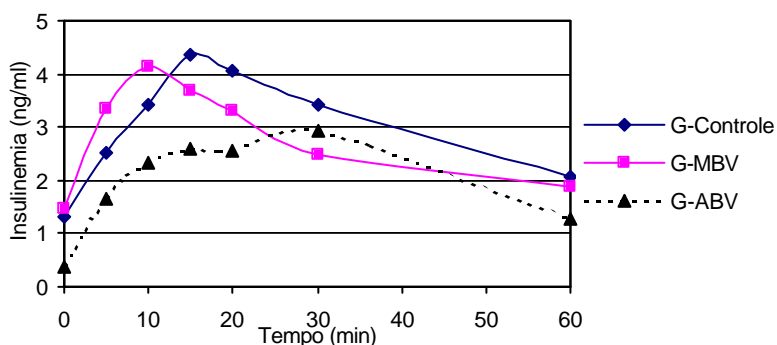


Gráfico 25 - Curvas de resposta insulínica do teste de tolerância à glicose (TTG) G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 8 ratos/grupo.

Ximenes et al., (2006) evidenciaram que o propionato inibe a secreção de insulina induzida por glicose em células pancreáticas incubadas.

Observando os Gráficos 24, 25 e a relação entre as áreas glicêmicas e insulínicas (AG/AI) apresentada na Tabela 35, verifica-se que houve uma menor liberação de insulina para a manutenção de um mesmo nível de glicose sanguínea em ambos grupos experimentais. Isto pode ser uma consequência da diferente produção de AGCC resultantes da fermentação das rações e do efeito supressor do propionato sobre a secreção de insulina. Em longo prazo pode-se estar evitando a sobrecarga das células β , que poderia tornar a produção de insulina ineficiente e determinando um caso de intolerância à glicose.

Outra hipótese seria uma menor resistência periférica à insulina nas células destino da glicose dos grupos G-MBV e G-ABV.

5.9.6 Fermentação *in vivo* e características cecais

Ao final do ensaio de 28 dias, o ceco de alguns animais foi delimitado e removido. Imediatamente, o ceco foi pesado, o pH do conteúdo cecal foi medido, o conteúdo cecal foi removido e congelado (para quantificação de AGCC) e a parede cecal foi pesada também.

O peso do ceco ainda fechado (com conteúdo), o peso somente da parede cecal e o peso do conteúdo cecal (por diferença) estão apresentados na Tabela 36.

Tabela 36 - Peso de diferentes partes do ceco de ratos alimentados com diferentes rações por 28 dias

	Conteúdo cecal	Parede cecal	Ceco completo
	(g/100g rato)		
G-Controle	0,70 ± 0,08	0,21 ± 0,02	0,91 ± 0,08
G-MBV	1,06 ± 0,06	0,24 ± 0,02	1,30 ± 0,07*
G-ABV	1,98 ± 0,26**	0,39 ± 0,03**	2,37 ± 0,28**

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (R-MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (R-ABV); n = 8 ratos/grupo; **p<0,01 e *p<0,05 entre valores da mesma coluna mostram diferença significativa em relação ao G-Controle (ANOVA/Tukey).

As características cecais apresentadas na Tabela 36 e no Gráfico 26 são importantes para prever ou confirmar a intensidade da fermentação colônica cecal. O aumento da parede celular cecal em massa pode mostrar efeito trófico devido à produção dos AGCC, em especial de butirato, que é a principal fonte de energia para os colonócitos (GOÑI; LÓPEZ-OLIVA, 2006). Estudos mostram que os AGCC em geral estimulam o crescimento das células mucosas quando administrados até intraperitonal ou direto no cólon (TOPPING; CLIFTON, 2001; KRIPKE et al., 1989; SAKATA; YAJIMA, 1984).

O pH do conteúdo cecal indica a maior ou menor quantidade de AGCC presente e pode ser verificado no Gráfico 26.

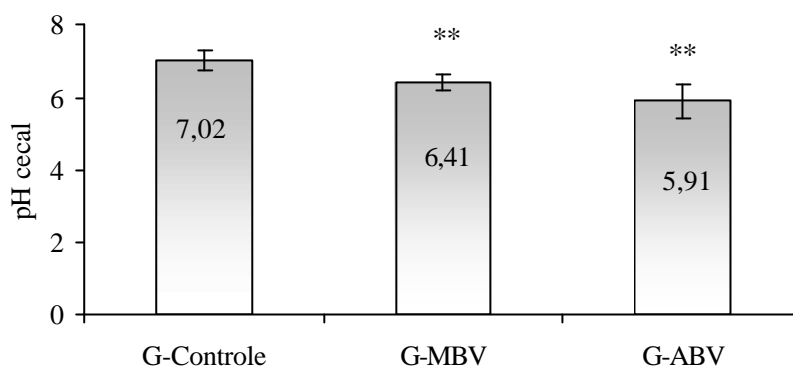


Gráfico 26- pH do conteúdo cecal de ratos alimentados com diferentes rações por 28 dias

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G (R-Controle); G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (R-MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (R-ABV); n = 8 ratos/grupo; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ mostram diferença significativa em relação ao G-Controle (ANOVA/Tukey). Barras verticais se referem ao erro padrão da média (SEM).

De acordo com o Gráfico 26, o pH variou em aproximadamente 0,5 no G-MBV e 1,0 no G-ABV, ambos em relação ao G-Controle. A bibliografia indica que o pH cecal de ratos costuma variar entre 6,1 a 8,2 de acordo com a dieta administrada, ou seja, ratos alimentados com carboidratos fermentáveis chegam a ter o pH cecal reduzido em até 2 unidades (CHENG et al, 1987; CHOCT et al., 1998; ILLMAN; STORER; TOPPING, 1993; TOPPING; CLIFTON, 2001),

Parte do conteúdo cecal removido foi utilizada para a determinação de umidade do mesmo (Gráfico 27).

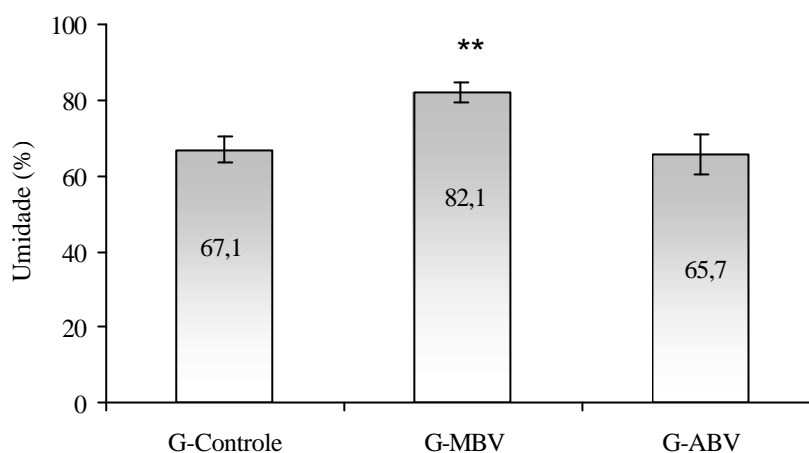


Gráfico 27 - Umidade do conteúdo cecal de ratos alimentados com diferentes rações por 28 dias
 G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G (R-Controle);
 G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (R-MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (R-ABV); n = 8 ratos/grupo; **p<0,01 e *p<0,05 mostram diferença significativa em relação ao G-Controle (ANOVA/Tukey). Barras verticais se referem ao erro padrão da média (SEM).

Ao serem comparados os resultados de umidade do conteúdo cecal (Gráfico 27) com a umidade das fezes (Gráfico 21), percebe-se que os resultados são contraditórios. Enquanto as fezes do G-ABV são mais úmidas, o Gráfico 27 aponta o G-MBV como tendo o conteúdo cecal mais úmido. Para avaliação do efeito de diluição da massa colônica, a umidade do conteúdo cecal é mais relevante. Além disto, a umidade das fezes é um parâmetro muito mais suscetível a erros, uma vez que as fezes foram colhidas uma vez ao dia, ficando assim expostas ao ambiente externo por diferentes e desconhecidos períodos de tempo.

A maior umidade do conteúdo cecal do G-MBV também é coerente com a maior presença de FA solúvel na ração deste grupo (Tabela 27), sendo que uma das propriedades da FA solúvel é a capacidade de formar sistemas viscosos no intestino, em resultado à sua dissolução em água (PACHECO; SGARBIERI, 2001).

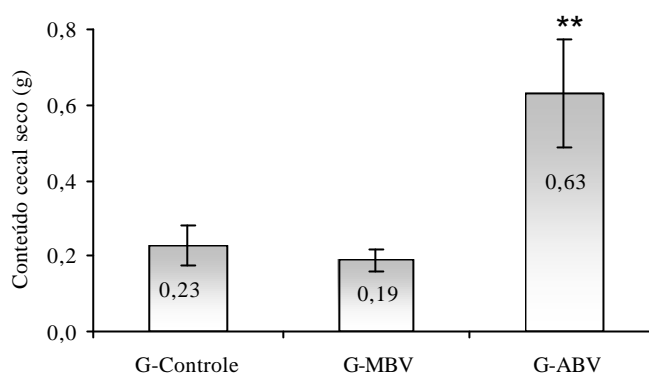


Gráfico 28 - Conteúdo cecal seco de ratos alimentados com diferentes rações por 28 dias
 G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G (R-Controle);
 G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (R-MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (R-ABV); n = 8 ratos/grupo; **p<0,01 e *p<0,05 mostram diferença significativa em relação ao G-Controle (ANOVA/Tukey). Barras verticais se referem ao erro padrão da média (SEM).

A comparação do peso seco das fezes (Gráfico 28) e do conteúdo cecal (Gráfico 34) é mais coerente, uma vez que em ambos os casos o G-ABV é o grupo que apresenta maior peso seco tanto de fezes como de conteúdo cecal. Isto possivelmente indica aumento da flora bacteriana em massa.

Uma reavaliação da Tabela 14, referente à fermentabilidade das rações, chama a atenção para o fato de que a fermentabilidade da R-ABV é menor quando avaliada considerando-se o resíduo não fermentado (RNF). Possivelmente isto indica que o aumento do peso seco das fezes e do conteúdo cecal no G-ABV é resultado também da maior presença de RNF.

O restante do conteúdo cecal removido foi purificado para quantificação de AGCC presentes por CG. Os resultados estão expressos nas Tabelas 37 e 38.

Tabela 37 - Proporção molar dos principais ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em relação ao total produzido no ceco de animais alimentados com diferentes rações por 28 dias

	Acetato	Propionato	Butirato
G-Controle	71,6 ± 7,7	18,3 ± 4,0	11,1 ± 4,0
G-MBV	76,3 ± 2,7	13,1 ± 1,9*	10,6 ± 1,6
G-ABV	79,1 ± 2,2*	11,3 ± 4,2**	9,6 ± 1,2

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 8 ratos/grupo. Média ± DP. **p<0,01 e *p<0,05 em dados da mesma coluna mostram diferença significativa em relação ao G-Controle (ANOVA/Tukey).

De acordo com estudos de fermentação *in vivo* (MUIR et al., 2004), a expressão da produção de AGCC em proporção molar é apontada como melhor indicador de mudanças no perfil de fermentação dos que valores brutos de AGCC quantificados. Isto porque mais de 95% dos AGCC produzidos são muito rapidamente absorvidos pelo cólon (SCHEPPACH et al., 1988; NOAKES et al., 1996). As proporções molares apresentadas na Tabela 37 mostram que só houve aumento significativo na produção de acetato do G-ABV, em relação ao G-Controle. Por outro lado, houve redução na concentração de propionato nos dois grupos experimentais em relação ao controle.

Tabela 38 - Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos no ceco de animais alimentados com diferentes rações por 28 dias

	Acetato	Propionato	Butirato	Total
	(umol / g conteúdo cecal)			
G-Controle	43,9 + 8,8	10,2 + 1,0	5,9 + 0,6	57,2 + 10,3
G-MBV	68,3 + 6,6*	11,5 + 0,8	9,2 + 0,6*	89,1 + 7,7*
G-ABV	94,0 + 9,3**	14,4 + 2,1*	12,0 + 2,1**	120,4 + 11,2**

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n + 8 ratos/grupo. Média ± DP. **p<0,01 e *p<0,05 em dados da mesma coluna mostram diferença significativa em relação ao G-Controle (ANOVA/Tukey).

A Tabela 38 mostra mais nitidamente que a quantidade produzida de cada AGCC e do total deles foi maior em todos os grupos experimentais, em relação ao controle. Estes resultados confirmaram as indicações de fermentação *in vitro* realizada previamente com as rações (Tabelas 31 e 32).

A maior quantidade de propionato no G-ABV, mesmo que em forma de tendência à significância, pode ser um reforço para a hipótese mencionada nos resultados do TTG quanto ao efeito do propionato, diminuindo a secreção de insulina. Como o ácido propiônico é o AGCC e tem maior influência sistêmica sobre o metabolismo de lipídeos e controle de glicemia e insulinemia, poderia-se estar comparando quantidades consideravelmente maiores de propionato no sistema sanguíneo do G-ABV. O butirato é a principal fonte de energia para os colonócitos. Já o acetato, está envolvido com o crescimento e proliferação de células normais do epitélio colônico. É absorvido e transportado ao fígado pra utilização periférica como fonte d energia e com funções estruturais na síntese de AGCC (CAMBRODÓN; MARTÍN-CARRÓN, 2001).

5.9.7 Secreção de insulina em ilhotas de Langerhans isoladas

Com a finalidade de avaliar a secreção de insulina após os 28 dias de tratamento com diferentes rações, na última semana de cada etapa, 2 ratos de cada grupo foram enviados ao Laboratório de Fisiologia da Secreção de Insulina (ICB/USP) por dia, onde foram sacrificados para o isolamento das ilhotas de Langerhans do pâncreas para avaliação da secreção de insulina. Ilhotas isoladas foram incubadas na presença de soluções de glicose em diferentes concentrações (5,6mM e 16,7mM) e a produção-resposta de insulina foi medida (Tabela 39).

Tabela 39 - Aumento da produção de insulina em ilhotas de Langerhans isoladas em resposta a soluções de glicose 5,6mM (referência 100%) e 16,7mM

Aumento da secreção de insulina	
(%)	
G-Controle	150,5 ± 2,0
G-MBV	116,2 ± 3,1**
G-ABV	117,3 ± 2,6**

G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 3 ratos/ grupo. Média ± SEM. **p<0,01 e *p<0,05 em dados da mesma coluna mostram diferença significativa em relação ao G-Controle (ANOVA/Tukey).

Assim como nos resultados discutidos sobre o TTG, a observação da Tabela 39 mostra que ocorreu uma menor produção de insulina nos grupos G-MBV e G-ABV em resposta a doses comuns de glicose, mostrando que rações contendo 5 e 10% de AR de produtos de banana verde possivelmente agem sobre a liberação de insulina em médio prazo. Em longo prazo, isto poderia ser uma alternativa para prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis como diabetes tipo 2.

5.9.8 Perfil lipídico

Visando avaliar a possível modificação do perfil lipídico em resposta ao tratamento de 28 dias com rações contendo AR de produtos de banana verde, foram sacrificados 8 animais por grupo para coleta de sangue em jejum de 8h para quantificação de lipídio séricos (Tabela 40).

Tabela 40 - Perfil lipídico dos ratos em jejum de 8 horas

	TAG	CT	C-HDL	C-VLDL
	(mg/dL)			
G-Controle	141 ± 23	74 ± 4	48 ± 2	15 ± 2
G-MBV	103 ± 52*	67 ± 3*	54 ± 3*	10 ± 1*
G-ABV	116 ± 18*	66 ± 4*	45 ± 2	23 ± 4**

TAG = triacilglicerol; CT = colesterol total; C-HDL = colesterol HDL; C-VLDL = colesterol VLDL; G-Controle = grupo controle alimentado com ração controle AIN-93G; G-MBV = grupo MBV alimentado com ração com massa de banana verde (MBV); G-ABV = grupo ABV alimentado com ração com amido de banana verde (ABV); n = 8 ratos/grupo. Média ± SEM. . **p<0,05 em dados da mesma coluna mostram diferença significativa em relação ao G-Controle; *0,10<p<0,05 mostra tendência à significância (ANOVA/Tukey).

Os resultados da Tabela 40 indicam que houve uma tendência à significância na diferença entre os teores de triacilglicerol (TAG) e colesterol total (CT) do G-Controle e dos dois grupos experimentais. O G-MBV apresentou colesterol HDL tendendo a ser inferiormente significativo em relação ao G-controle. Portanto, a melhora no perfil lipídico não foi claramente observada nos dois grupos experimentais apesar de todos os parâmetros indicativos de fermentação apontarem as rações administradas como bem fermentáveis.

Em casos de síndrome metabólica em humanos, após 5 ou 10 anos de hiperinsulinemia causada por defeitos sutis na primeira fase de secreção de insulina, sua secreção pelas células β diminui, podendo haver hipoinsulinemia absoluta ou relativa. Esta, por sua vez, causa diminuição da síntese de ácidos graxos e aumenta a lipólise (CHACRA; DIB, 2003).

No presente trabalho, a secreção de insulina e o perfil lipídico só foram avaliados ao final do ensaio de média duração (28 dias de tratamento) e houve elevado coeficiente de variação para alguns parâmetros. Apesar da superioridade dos níveis de triacilgliceróis e colesterol total do G-Controle tender à significância em relação aos dos grupos experimentais, melhor discussão quanto à relação entre secreção de insulina e perfil lipídico seria possível se

tivesse sido avaliada a evolução da secreção de insulina e do perfil lipídico ao longo do tratamento e/ou se o número de amostras fosse maior. Isto talvez mostrasse quando ocorre o limite de produção de insulina e subsequente queda desta para níveis que influenciam o perfil lipídico dos ratos.

6. CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A banana verde *in natura* é uma fruta rica em carboidratos não-disponíveis e fermentáveis, sendo a maior parte deles constituída por fibra alimentar e amido resistente, entretanto suas características sensoriais não são agradáveis ao paladar. Produtos derivados de banana verde podem ter melhor palatabilidade e conter quantidades variáveis dos componentes principais da banana verde, dependendo do processamento realizado durante sua obtenção.

A massa de banana verde (MBV) é um produto de banana verde, cozida com casca, que conserva essencialmente o teor de fibra alimentar (FA) e parte do amido resistente (AR) da fruta *in natura*. O amido de banana verde (ABV), amido isolado, por outro lado, conserva e concentra o teor de AR da fruta *in natura*. Ambos os produtos podem ser considerados fontes de carboidratos não-disponíveis e possuem alta fermentabilidade.

A ingestão de produtos de banana verde produz moderado aumento da resposta glicêmica pós-prandial tanto em ratos quanto em humanos. Além disto, se comparados a alimentos de alto índice glicêmico (pão), a MBV e o ABV são capazes de produzir menor aumento da glicemia pós-prandial em uma dieta/refeição subsequente à sua ingestão tanto em ratos com flora bacteriana como em ratos sem a mesma. Tal fato provavelmente deve-se à sua capacidade de não estimular demasiadamente as células β na primeira dieta/refeição.

A banana madura é um alimento com índice glicêmico (IG) classificado como médio (87%) sendo essa informação importante para tabelas de composição de alimentos devido à alta produção e baixo custo da fruta no país.

Nos ensaios de média duração, três grupos de animais (ratos) foram tratados por 28 dias com rações controle (R-Controle) ou experimentais contendo produtos de banana verde (R-ABV ou R-MBV), como fontes de carboidratos não-disponíveis e fermentáveis.

De acordo com a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no ceco, as rações contendo MBV (AR = 5%b.i.) ou ABV (AR = 10%b.i.) foram, respectivamente, 1,4 e 2,2 vezes mais fermentáveis *in vitro* e 1,5 e 2,1 vezes mais fermentáveis *in vivo*, do que a ração controle. Estes resultados ressaltam o valor dos estudos de fermentação *in vitro* como método para prever a utilização dos carboidratos não-disponíveis fisiologicamente.

Quanto à tolerância à glicose, os animais tratados por 28 dias com rações contendo produtos de banana verde (R-ABV ou R-MBV) não mostraram alteração significativa no perfil de glicemia pós-prandial, mas mostraram outras alterações positivas em resposta à ação física ou fermentativa dos carboidratos não-disponíveis de banana verde no ceco. O teste de tolerância à glicose (TTG) revelou que nos grupos experimentais houve redução da insulinemia em relação à glicemia, isto é, os animais produziram menos insulina para manter níveis de glicose sanguínea semelhantes. Além disto, a secreção de insulina nas ilhotas pancreáticas dos animais também foi significativamente reduzida, o que pode poupar as células β diminuindo o risco de futuro desenvolvimento de diabetes tipo 2.

Apesar de possuírem o mesmo teor de fibra alimentar (FA) total, a ração R-MBV apresentou maior teor de FA solúvel, por sua FA ser proveniente da MBV, enquanto a R-ABV continha apenas FA insolúvel, proveniente da adição de celulose para obtenção de valores semelhantes de FA entre as rações.

Os ratos alimentados com R-MBV apresentaram a umidade do conteúdo cecal muito mais elevada do que o grupo controle, o que pode causar aumento da velocidade do trânsito intestinal. Estes resultados, associados à queda de pH cecal também notada, podem favorecer a eliminação de metabólitos nocivos à saúde intestinal e/ou prevenir a reabsorção de ácidos biliares, evitando a formação indesejável de ácidos biliares secundários. Além disto, a eliminação de ácidos biliares faz necessária a produção de novos ácidos, o que pode causar alterações no perfil lipídico. Tais alterações foram observadas nos animais alimentados com

R-MBV, nos quais a diminuição nos níveis de triacilgliceróis e de colesterol total tendeu à significância, apesar de os dados apresentarem alta variabilidade.

Nos ratos alimentados com R-ABV, também houve queda do pH cecal e, além disto, houve aumento da flora bacteriana indicado pelo aumento do peso seco das fezes e do conteúdo cecal. Entretanto, não foram encontradas alterações na maioria dos lipídios séricos, em relação ao grupo controle. Isto ressalta a importância da investigação quanto à qualidade e não somente quantidade dos carboidratos não-disponíveis de alimentos.

Com semelhante consumo ao grupo controle, o grupo tratado com R-ABV apresentou menor taxa de crescimento, enquanto o grupo que consumiu R-MBV teve crescimento estatisticamente semelhante ao grupo controle. Isto indica que a ingestão de ração contendo 5% de AR e com parte de sua FA sendo solúvel (fermentável) não interfere no aporte energético em ratos a ponto de reduzir as taxas de crescimento durante 28 dias. Entretanto, a administração de ração contendo 10% de AR e FA completamente insolúvel (não-fermentável) por 28 dias, reduz a disponibilidade energética a ponto de diminuir as taxas de crescimento de ratos.

Em resumo, os carboidratos não-disponíveis provenientes de produtos de banana verde são altamente fermentáveis. A ação destes produtos sobre a redução da glicemia pós-prandial pode ser notada quando ingeridos puros, contendo elevados teores de carboidratos não-disponíveis, mas não quando adicionados a rações em quantidades mais moderadas. Por outro lado, mesmo em quantidades mais discretas em rações, os produtos de banana verde estudados também apresentam alta fermentabilidade e menor disponibilização energética, causando diversos efeitos positivos ao metabolismo de ratos tratados por 28 dias.

Estes resultados indicam que os produtos de banana verde estudados têm grande potencial para serem utilizados na elaboração de alimentos destinados à prevenção de determinadas doenças crônicas não-transmissíveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNISON, G.; TOPPING, D.L. Nutritional role of resistant starch: chemical structure vs physiological function. **Annu Rev Nutr**, n.14, p.297-320, 1994.

ASP, N.G. Resistant starch. Physiological implications of the consumption of resistant starch in man. Proceedings from the Second plenary meeting of EURESTA: European FLAIR Concerted Action No.11 (COST 911). **Eur J Clin Nutr**, v.46 (Suppl), p.1-148, 1992.

ASP, N-G.; van AMELSVOORT, J.M.M.; HAUTVAST, J.G.A.J. **EURESTA physiological implication of consumption of resistant starch in man** (European FLAIR - concerted action n.11 - COST 911) s.l.p., Flair [Proceedings of the concluding, plenary meeting of EURESTA]; 1994. 204 p.

ASP, N-G.; van AMELSVOORT, J.M.M.; HAUTVAST, J.G.A.J. Nutritional implications of resistant starch. **Nutr Res Rev**, v.9, p.1-31, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 12. Ed. Washington, DC, 1980. 1018p.

AUGUSTIN, L.S.; GALLUS, S.; NEGRI, E.; La VECCHIA, C. Glycemic index, glycemic load and risk of gastric cancer. **Ann Oncol**, v.15, n. 4, p.581-584, 2004.

AUGUSTIN, L.S.A.; FRANCESCHI, S.; JENKINS, D.J.; KENDALL, C.W.; La VECCHIA, C. Glycemic index in chronic disease: a review. **Eur J Clin Nutr**, v.56, n.11, p.1049-1071, 2002.

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.

BEHALL, K.M.; HOWE, J.C. Effect of long-term consumption of amylose vs amylopectin starch on metabolic variables in human subjects. **Am J Clin Nutr**, v.61, n.2, p.334-340, 1995.

BEHALL, K.M.; SCHOLFIELD, D.J.; YUHANIAK, I.; CANARY, J. Diets containing high amylose vs amylopectin starch: effects on metabolic variables in human subjects. **Am J Clin Nutr**, v.49, n.2, p.337-344, 1989.

BERGE, R.K.; TRONSTAD, K.J.; BERGE, K.; ROST, T.H.; WERGEDAHL, H.; GUDBRANDSEN, O.A.; SKORVE, J. The metabolic syndrome and the hepatic fatty acid drainage hypothesis. **Biochimie**, v.87, n.1, p.15-20, 2005.

BERGGREN, A.M.; BJORCK, I.M.; NYMAN, E.M.; EGGUN, B.O. Short-chain fatty acid content and pH in caecum of rats fed various sources of starch. **J Sci Food Agric**, v.68, p.241-248, 1995.

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, 1974. p.1205-1215.

BJÖRCK, I. Starch: nutritional aspects. In: ELIASSON, A.C. (ed). **Carbohydrates in food**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.505-553.

BJÖRCK, I.; ASP, N.G. Balance experiments in nebacetin-treated rats. In: GUDMAND-HOYER, E. **Methodological aspects of in vivo methods for measuring of starch digestibility**. (EURESTA, Report of a European Flair Concerted Action Workshop, Copenhagen, 10-12 November), 1991. p.35-39.

BJÖRCK, I.; NYMAN, M.; PEDERSEN, B.; SILJESTRÖM, M. ASP, N.G.; EGGUM, B.O. On the digestibility of starch in wheat bread studies in vitro and in vivo. **J Cereal Sci**, v.4, p.1-11, 1986.

BOUHNİK, Y.; FLOURIÉ, B.; D'AGAY-ABENSOUR, L.; POCHART, P.; GRAMET, G.; DURAND, M.; RAMBAUD, J.C. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. **J Nutr**, v.127, p.444-448, 1997.

BRAND-MILLER, J.C. Glycemic load and chronic disease. **Nutr Rev**, v.61, n.5, Suppl Part 2, p.49S-55S, 2003.

BRAND-MILLER, J.C. Importance of glycemic index in diabetes. **Am J Clin Nutr**, v.59, p.747S-752S, 1994.

BRAND-MILLER, J.C. Postprandial glycemia, glycemic index, and the prevention of type 2 diabetes. **Am J Clin Nutr**, v.80, p.243-244, 2004.

BROUNS, F.; BJÖRCK, I.; FRAYN, K.N.; GIBBS, A.L.; LANG, V.; SLAMA, G.; WOLEVER, T.M.S. Glycaemic index methodology. **Nutr Res Rev**, 18, p.145-171, 2005.

BRYNES, A.E.; ADAMSON, J.; DORNHORST, A.; FROST, G.S. The beneficial effect of a diet with low glycaemic index on 24 h glucose profiles in healthy young people as assessed by continuous glucose monitoring. **Br J Nutr**, v.93, n.2, p.179-192, 2005.

BRYNES, A.E.; LEE, J.L.; BRIGHTON, R.E.; LEEDS, A.R.; DORNHORST, A.; FROST, G.S. A low glyceic diet significantly improves the 24-h blood glucose profile in people with type 2 diabetes, as assessed using the continuous glucose MiniMed monitor. **Diabetes Care**, v.26, n.2, p.548-549, 2003.

CAMBRODÓN, I.G.; MARTÍN-CARRÓN, N. Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. In: LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. (eds). **Fibra dietética em Iberoamérica: tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. Proyecto CYTED XI.6 "Obtención y caracterización de fibra dietética para su aplicación en regímenes especiales"/ CNPq. São Paulo: Varela, 2001. p.311-338.

CARRERA, M.C.; LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. Glyceic index: effect of food storage under low temperature. **Braz Arch Biol Technol**, Aug. v.47, n.4, p.569-574, 2004.

CARUSO, L.; MENEZES, E. W. Índice glicêmico dos alimentos. **Nutrire: rev Soc Bras Alim Nutr**, v.19/20, p. 49-64, 2000.

CHACRA, A.R.; DIB, S.A. Diabetes Melito. In: PRADO, F.C.; RAMOS, J.A.; Do VALLE, J.R. (eds). **Atualização Terapêutica – Manual prático de diagnóstico e tratamento**. 21.ed. São Paulo: Artes Médicas, 2003, seção 5, p.391-404.

CHAMP, M.; LANGKILDE, A.; BROUNS, F.; KETTLITZ, B.; BAIL-COLLET, Y. L. Advances in dietary fibre characterization. 2. Consumption, chemistry, physiology and measurement of resistant starch; implications for health and food labelling. **Nutr Res Rev**, v.16, p.143-161, 2003.

CHENG, B.Q.; TRIMBLE, R.P.; ILLMAN, R.J.; STONE, B.A.; TOPPING, D.L. Comparative effects of dietary wheat bran and its morphological components (aleurone and pericarp-seed coat) on volatile fatty acid concentrations in the rat. **Br J Nutr**, v.57, p.69–76, 1987.

CHOCT, M.; ILLMAN, R.J.; BIEBRICK, D.A.; TOPPING, D.L. White and wholemeal flours from wheats of low and higher apparent metabolisable energy differ in their nutritional effects in rats. **J Nutr**, v.128, p.234–238, 1998.

CHRISTL, S.U.; MURGATROYD, P.R.; GIBSON, G.R.; CUMMINHGS, J.H. Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. **Gastroenterology**, v.102, n.4 Part 1, p.1269-1277, 1992.

CORDENUNSI, B.R.; MENEZES, E.W.; MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M. Composição em carboidratos em banana verde e madura de diferentes cultivares. **Seminario del Proyecto de Investigación Precompetitiva CYTED XI.8**. Quito, 2000. p. 15-22. [Anais da Conferência realizada em Baños, Ecuador. September 2-4, 1998].

CUMMINGS, J.H.; BEATTY, E.R.; KINGMAN, S.; BINGHAM, S.A; ENGLYST, H.N. Laxative properties of resistant starch. **Gastroenterology**, v.102. p.A548 (abstract), 1992.

CUMMINGS, J.H.; BEATTY, E.R.; KINGMAN, S.; BINGHAM, S.A; ENGLYST, H.N. Digestión and physical properties of resistant starch in the human large bowel. **Br J Nutr**, v.75, p.733-747, 1996.

CUMMINGS, J.H.; EDMOND, L.M.; MAGEE, E.A. Dietary carbohydrates and health: do we still need the fibre concept? **Clin Nutr Suppl**, v.1, p.5-17, 2004.

CUMMINGS, J.H.; EDWARDS, C.; GEE, J.M.; NAGENGAST, F.M.; MATHERS, J.C. **Physiological effect of resistant starch in the large bowel.** [Proceedings of the Concluding Plenary Meeting of EURESTA, ed. ASP, N.G.; van Amelsvoort, J.M.M & HAUTVAST, J.G.A.J.]. Wageningen, 1994. p.38-55.

CUMMINGS, J.H.; ENGLYST, H.N. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. **Am J Clin Nutr**, v.45, Suppl.5, p.1243-1255, 1987.

CUMMINGS, J.H.; ENGLYST, H.N. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. **Am J Clin Nutr**, v.51, p.617-637, 1990.

CUMMINGS, J.H.; ENGLYST, H.N. Gastrointestinal effects of food carbohydrates. **Am J Clin Nutr**, v.61(Suppl): 938S-945S, 1995.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. The control of bacterial fermentation in the human colon. **J Appl Bacteriol**, v.70, n.6, p.443-459, 1991.

DANONE VITAPOLE/ FAO. **Glycemic index and health: the quality of the evidence.** John Libbey Eurotext. Nutrition and Health Collection, France. 2001. 48p.

DECODE (THE DECODE STUDY GROUP), EUROPEAN DIABETES EPIDEMIOLOGY GROUP. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. **Lancet**, v.345, p.617-621, 1999.

DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH GROUP. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention and metformin. **N Engl J Med**, v.346, n.6, p.393-403, 2002.

ELDER, D.A; PRIGEON, R.L.; WADWA, R.P.; DOLAN, L.M.; D'ALESSIO, D.A. Beta-cell function, insulin sensitivity, and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic adolescents and young adults. **J Clin Endocrinol Metab**, v.91, n.1, p.185-191, 2006.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA),
Recursos Genéticos e Biotecnologia - **Cenargenda Online** - Ano I nº 31 - Semana de 8 a 14
de agosto de 2005.

ENGLYST, H.N.; CUMMINGS, J.H. Digestion of carbohydrate of banana (*Musa
paradiasiaca* sapientum) in human intestine. **Am J Clin Nutr**, v.44, p.42-50, 1986.

ENGLYST, H.N.; CUMMINGS, J.H. Digestion of the polysaccharide of some cereal
foods in the human small intestine. **Am J Clin Nutr**, v.42, p.778-787, 1985.

ENGLYST, H.N.; CUMMINGS, J.H. Improved method for measurement of dietary
fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. **J AOAC Int**, v.71, n.4, p.808-814, 1988.

ENGLYST, H.N.; HAY, S.; MACFARLANE, G.T. Polysaccharide breakdown by
mixed populations of human faecal bacteria. **FEMS Microbiol Ecol**, v.95, p.163-171, 1987.

ENGLYST, H.N.; KINGMAN, S.M.; HUDSON, G.J.; CUMMINGS, J.H.
Measurement of resistant starch *in vitro* and *in vivo*. **Br J Nutr**, v.75, n.5, p.749-755, 1996.

ENGLYST, H.N.; MACFARLANE, G.T. Breakdown of resistant and readily
digestible starch by human gut bacteria. **J Sci Food Agric**, v.37, p.699-706, 1986.

ENGLYST, K. N.; VINOY, S.; ENGLYST, H. N.; LANG, V. Glycaemic index of
cereal products explained by their content of rapidly and slowly available glucose. **Br J Nutr**,
v.89, n.3, p. 329-339, 2003.

ENGLYST, K.N; ENGLYST, H.N. Carbohydrate bioavailability. **Br J Nutr**, v.94,
p.1-11, 2005.

FAISANT, N.; BULÉON, A; COLONNA, P.; MOLIS, C.; LARTIGUE, S.; GALMICHE, J.P.; CHAMP, M. Digestion of raw banana starch in the small intestine of healthy humans: structural features of resistant starch. **Br J Nutr**, v.73, n.1, p.111-123, 1995.

FAO (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION). **Food Energy - Methods of analysis and conversion factors**. Report of a technical workshop. FAO Food and Nutrition papers, 77, Roma, 2002, FAO, 2003, 100p.

FAO (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION): Crops & Livestock primary & processed. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections>>. Acesso em: dezembro de 2002.

FAO/WHO (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Carbohydrates in human nutrition**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Food and nutrition paper 66. Rome, 1997. FAO, 1998. 140 p.

FLICK, J.A.; PERMAN, J.A. Nonabsorbed carbohydrate: effect on fecal pH in methane-excreting and nonexcreting individuals. **Am J Clin Nutr**, v.49, p.1252–1257, 1989.

FLORES-GOROSQUERA, E.; GARCÍA-SUÁREZ, F.J.; FLORES-HUICOCHEA, E.; NUÑES-SANTIAGO, M.C.; GONZÁLEZ-SOTO, R.A.; BELLO-PÉREZ, L.A. Rendimiento del proceso de extracción de almidón partir de frutos de plátano (*Musa paradisíaca*). Estudio em planta piloto. **Acta Cient Venez**, v.55, n.1, p.86-90, 2004.

FLOURIE, B.; FLORENTE, C.; JOUANY, J.P.; THIVEND, P.; ETANCHAUD, F.; RAMBAUD, J.C. Colonic metabolism of wheat starch in healthy humans. **Gastroenterology**, v.90, p.111-119, 1986.

FLOURIE, B.; LEBLOND, A.; FLORENT, C.; RAUTUREAU, M.; BISALLI, A.; RAMBAUD, J.C. Starch malabsorption and breath gas excretion in healthy consuming low- and high- starch diets. **Gastroenterology**, v.95, p.356-363, 1988.

FOLKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **Int Dairy J**, v.9, p.53-61, 1999.

FRANCESCHI, S.; DAL MASO, L; AUGUSTIN, L; NEGRI, E; PARPINEL, M; BOYLE, P.; JENKINS, D.J.; La VECCHIA, C. Dietary glycaemic load and colorectal cancer risk. **Ann Oncol**, v.12, n.2, p.173-178, 2001.

FROST, G.; KEOGH, B.; SMITH, D.; AKINSANYA, K.; LEEDS, A. The effect of low-glycaemic carbohydrate on insulin and glucose response in vivo and in vitro in patients with coronary heart disease. **Metabolism**, v.45, p.669-672, 1996.

FROST, G.; LEEDS, A.; TREW, G.; MARGARA, R.; DORNHORST, A. Insulin sensitivity in women at risk of coronary heart disease and the effect of a low glycaemic index diet. **Metabolism**, v.47, p.1245-1251, 1998.

FROST, G.; LEEDS, A.A.; DORÉ, C.J.; MADEIROS, S.; BRADING, S.; DORNHORST, A. Glycaemic index as a determinant of serum HDL-cholesterol concentration. **Lancet**, v.353, p.1045-1048, 1999.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J Appl Bacteriol**, v.66, n.5, p.365-378, 1989.

GELISSEN, I.; ALLGOOD, G.; EASTWOOD, M.A. Reproducibility of the breath hydrogen measurement after a low and high fiber meal. **Eur J Clin Nutr**, v.48, p.266-272, 1994.

GIBSON, G.R. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). **Clin Nutr Suppl**, v.1, p.25-31, 2004.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. **J Nutr**, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GOÑI, I.; GARCIA-DIZ, L.; MAÑAS, E.; SAURA-CALIXTO, F. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. **Food Chem**, v.56, n.4, p.445-449, 1996.

GOÑI, I.; GARCIA-ALONSO, A.; SAURA-CALIXTO, F. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. **Nutr Res**, v.17, n.3, p.427-437, 1997.

GOÑI, I.; LÓPEZ-OLIVA, E. Carbohidratos y salud gastrointestinal. In: LAJOLO, F.M., MENEZES, E.W. (eds). **Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos**. Proyecto CYTED/CNPq XI.18. Composición, Estructura, Propiedades Biológicas de Carbohidratos y su Utilización en Alimentos. São Paulo: EDUSP, 2006. p.289-308.

GRANFEDLT, Y.; WU, X.; BJÖRCK, I. Determination of glycemic index (GI); some methodological aspects related to the analysis of carbohydrate load and characteristics of the previous evening meal. **Eur J Clin Nutr**, v.60, n.1, p.104-112, 2006.

GRANFEDT, Y.; ELIASSON, A.C.; BJÖRCK, I. An examination of the possibility of lowering the glycemic index of oat and barley flakes by minimal processing. **J Nutr**, v.130, n.9, p.2207-2214, 2000.

GUILLOIN, 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. **Textbook of Medical Physiology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. 973p.

HARALAMPU, S.G. Resistant starch - a review of the physical properties and biological impact of RS₃. **Carbohydr Polym**, v.41, p.285-292, 2000.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J.H. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B. **Lactic acid bacteria in health and disease**, Amsterdam : Elsevier Applied Science, 1992. v.1, p.151-170.

HEINE, R.J.; BALKAU, B.; CERIELLO, A.; DEL PRATO, S.; HORTON, E.S.; TASKINEN, M.R. What does postprandial hyperglycaemia mean? **Diabet Med**, v.21, n.3, p.208-213, 2004.

HYLLA, S. ; GOSTNER, A. ; DUSEL, G. ; ANGER, H. ; BARTRAM, HP. ; CHRISTL, S.U. ; KASPER, H. ; SCHEPPACH, W. Effects of resistant starch on the colon in healthy volunteers: possible implications for cancer prevention. **Am J Clin Nutr**, v.67, p.136-142, 1998.

ILLMAN, R.; STORER, G.B.; TOPPING, D.L. White wheat flour lowers plasma cholesterol and increases cecal steroids relative to whole wheat flour, wheat bran and wheat pollard in rats. **J Nutr**, 123:1094–1100, 1993.

JENKINS, D.J.A.; WOLEVER, T.M.S.; TAYLOR, R.H.; BARKER, H.; FIELDEN, H.; BALDWIN, J.M.; BOWLING, A.C.; NEWMAN, H.C.; JENKINS, A.L., GOFF, D.V. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. **Am J Clin Nutr**, v.34, p.362-366, 1981.

KEETELS. C.J.A.M.; VAN VLIET, T.; WALSTRA, P. Gelation and retrogradation of concentrated starch systems: 2. Retrogradation. **Food Hydrocoll**, v.10, n.3, p.335-362, 1996.

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. **J Parenter Enteral Nutr**, v.13, n.2, p.109-116, 1989.

LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. Dietary fiber and resistant starch intake in Brazil: Recommendations and actual consumption patterns. **Food Sci Technol**, v.113, p.845-858, 2001.

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". São Paulo: EDUSP, 2006. 648 p.

LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F; PENNA, E.W., MENEZES, E.W. ed. **Fibra dietética en Iberoamérica: tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. Proyecto CYTED XI.6 "Obtención y caracterización de fibra dietética para su aplicación en regímenes especiales"/ CNPq. São Paulo: Editora Varela, 2001. 469p.

LEE, S. C.; PROSKY, L.; DEVRIES, 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, p.395-416, 1992.

LILJEBERG, H.; BJÖRCK, I. Effects of a low-glycemic index spaghetti meal on tolerance and lipaemia at a subsequent meal in healthy subjects. **Eur J Clin Nutr**, v.54, p.24-28, 2000.

LILJEBERG, H.G.M.; AKERBERG, A.K.E.; BJÖRCK, I.M.E. Effect of the glycemic index and content of indigestible carbohydrates of cereal breakfast meals on glucose tolerance at lunch in healthy subject. **Am J Clin Nutr**, v.69, p.647-655, 1999.

LILJEBERG, H.G.M.; BJÖRCK, I.M.E. Effects of a low-glycemic index spaghetti meal on tolerance and lipaemia at a subsequent meal in healthy subjects. **Eur J Clin Nutr**, v.54, p.24-28, 2000.

LIVESEY, G. Energy values of unavailable carbohydrates and diets: an inquiry and analysis. **Am J Clin Nutr**, v.51, p.617-637, 1990.

LIVESEY, G.; WILKINSON, J.A.; ROE, M.; FAULKS, R.; CLARK, S.; BROWN, J.C.; KENNEDY, H.; ELIA, M. Influence of the physical form of barley grain on the digestion of its starch in human small intestine and implications for health. **Am J Clin Nutr**, v. 61, p.75-81, 1995.

LUDWIG, D.S. Glycemic load comes of age. **J Nutr**, v.133, p.2695-2696, 2003.

MACDONALD, I.A.; SINGH, G.; MAHONY, D.E.; MEIER, C.E. Effect of pH on bile salt degradation by mixed fecal cultures. **Steroids**, v.32, p.245-256, 1978.

MACFARLANE, G.T.; ENGLYST, H.N. Starch utilization by human large intestinal flora. **J Applic Bacteriol**, v.60, p.195-201, 1986.

MACFARLANE, G.T.; GIBSON, G.R.; BEATTY, E.; CUMMINGS, J.H. Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurement. **FEMS Microbiol Ecol**, v.101, p.81-88, 1992.

MACHADO, U.F.; NOGUEIRA C.R.; CARPINELLI, A.R. Obesity is the major cause of alterations in insulin secretion and calcium fluxes by isolated islets from aged rats. **Physiol Behav**, v.52, n.4, p.717-721, 1992.

MAÑAS, E.; SAURA-CALIXTO, F. Dietary fibre analysis: methodological error sources. **Eur J Clin Nutr**, v.49, Suppl.3, p.158S-162S, 1995.

MAÑAS, E.; SAURA-CALIXTO, F. Ethanol precipitation: A source of error in dietary fibre determination. **Food Chem**, v.47, p.351-355, 1993.

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.

MATTHIESEN, M.L.; BOTEON, M. Análise dos principais pólos produtores de banana no Brasil. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Ago/2003 - XLI Sober). Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/banana.pdf>>. Acesso em Janeiro, 2006.

McCANCE, R.A.; LAWRENCE, R.D. **The carbohydrate content of foods**. Medical Research Council Special Report Series 135, Her Majesty's Stationery Office, London, 1929.

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.

McCLEARY, B.V.; ROSSITER, P. Measurement of novel dietary fibres. **J AOAC Int**, v.87, p.707-711, 2004.

McKEOWN, N.M.; MEIGS, J.B.; LIU, S.; SALTZMAN, R.; WILSON P.W.; JACQUES P.F. Carbohydrate nutrition, insulin resistance and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. **Diabetes Care**, v.27, p.538-546, 2004.

MENEZES, E.W.; GIUNTINI, E.B.; LAJOLO, F.M. Perfil de ingestão de fibra alimentar e amido resistente pela população brasileira nas últimas três décadas. In: LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. (eds). **Fibra dietética en Iberoamérica: tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. Proyecto CYTED XI.6 “Obtención y caracterización de fibra dietética para su aplicación en regímenes especiales”/ CNPq. São Paulo: Editora Varela, 2001. p.433-444.

MENEZES, E.W.; LAJOLO, F.M. (eds). **Contenido en fibra dietética y almidón resistente en alimentos y productos iberoamericanos**. Proyecto CYTED XI.6 “Obtención y caracterización de fibra dietética para su aplicación en regímenes especiales”. CYTED/CNPq. Docuprint, São Paulo, 2000. 121p.

MENEZES, E.W; LAJOLO, F. M. Índice glicêmico de alimentos. In: MENEZES, E.W., LAJOLO, F.M. (eds). **Avances sobre el uso y las propiedades de los carbohidratos de los alimentos regionales**. São Paulo: JK COLOR GRÁFICA e EDITORA LTDA [Anais do II Seminario Ibero-americano – Projeto CYTED XI.18, Santiago, Chile, 3 de junho de 2003]. 2003. p.53-60.

MENEZES, E.W; LAJOLO, F.M. Marcadores *in vivo* e *in vitro* de carboidratos. In: LAJOLO, F. M., MENEZES, E.W. (eds). **Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos**. Proyecto CYTED/CNPq XI.18. Composición, Estructura, Propiedades Biológicas de Carbohidratos y su Utilización en Alimentos. São Paulo: EDUSP, 2006. p.309-334

MENEZES. E.W.; MELO, A.T.; LIMA, G.H.; LAJOLO, F.M. Measurement of carbohydrates components and their impact on energy values of foods. **J Food Compos Anal**, v.17, p.331-338, 2004.

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.

MORTENSEN, P.B.; HOLTUNG, K.; RASMUSSEN, H.S. Short chain fatty acids production from mono- and disaccharides in a decal incubation system: implications for colonic fermentation of dietary fibre in humans. **J Nutr**, v.118, n.3, p.321-325, 1988.

MUIR, J.G.; BIRKETT, A.; BROWN, I.; JONES, G.; O'DEA, K. Food processing and maize variety affects amounts of starch escaping digestion in the small intestine. **Am J Clin Nutr**, v.61, p.82-89, 1995.

MUIR, J.G.; LU, Z.X.; YOUNG, G.P.; CAMERON-SMITH, D.; COLLIER, G.R.; O'DEA, K. Resistant starch in the diet increases breath hydrogen and serum acetate in human subjects. **Am J Clin Nutr**, v.61, p.792-799, 1994.

MUIR, J.G.; 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.

NAGENGAST, F.M.; HECTORS, M.P.; BUYS, W.A.; VAN TONGEREN, J.H. Inhibition of secondary bile acid formation in the large intestine by lactulose in healthy subjects of two different age groups. **Eur J Clin Invest**, v.18, p.56-61, 1988.

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.

NORDGAARD, I.; MORTENSEN, P.B. Digestive processes in the human colon. **Nutrition**, v.11, n.1, p.37-45, 1995.

PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Fibra e doenças gastrointestinais. In: LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. (eds). **Fibra dietética en Iberoamérica: tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. Proyecto CYTED XI.6 "Obtención y caracterización de fibra dietética para su aplicación en regímenes especiales"/ CNPq. São Paulo: Editora Varela, 2001 p.433-444.

PACHECO-DELAHAYE, E.; TESTA, G. Evaluacion nutricional, física y sensorial de panes de trigo y plátano verde. **INCI**, mayo 2005, v.30, n.5, p.300-304.

PEREIRA, M.A.; O'REILLY, E.; AUGUSTSSON, K.; FRASER, G.E.; GOLDBOURT, U.; HEITMANN, B.L.; HALLMANS, G.; KNEKT, P.; LIU, S.; PIETINEN, P.; SPIEGELMAN, D.; STEVENS, J.; VIRTAMO, J.; WILLETT, W.C.; ASCHERIO, A. Dietary fiber and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of cohort studies. **Arch Intern Med**, v.164, n.4, p.370-376, 2004.

PROSKY, L.; ASP, N-G.; FURDA, I.; DeVRIES, J.W.; SCHWEIZER, T.F.; HARLAND, B.F. Determination of dietary fiber in foods, food products, and total diets: interlaboratory study. **J Assoc Off Anal Chem** v.67, n.6, p.1044-1052, 1984.

PROSKY, L.; ASP, N-G.; SCHWEIZER, T.F.; DeVRIES, J.W.; FURDA, I. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods, food products: interlaboratory study. **J Assoc Off Anal Chem** v.71, n.5, p.1017-20, 1988.

PROSKY, L.; ASP, N-G.; SCHWEIZER, T.F.; DeVRIES, J.W.; FURDA, I. Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods, food products: collaborative study. **J AOAC Int**, v.75, n.2, p.360-377, 1992.

RABEN, A; TAGLIABUE, A; CHRISTENSEN, N.J.; MADSEN, J.; HOLST, J.J.; ASTRUP, A. Resistant starch: the effect on postprandial glycemia, hormonal response and satiety. **Am J Clin Nutr**, v.60, n.4, p.544-551, 1994.

RAFTER, J.J.; ENG, V.W.; FURRER, R.; MEDLINE, A.; BRUCE, W.R. Effects of calcium and pH on the mucosal damage produced by deoxycholic acid in the rat colon. **Gut**, v.27, p.1320–1329, 1986.

RANGANATHAN, S.; CHAMP, M.; PECHARD, C.; BLANCHARD, P.; N’GUYEN, M.; COLONNA, P.; KREMPF, M. Comparative study of the acute effects of resistant starch and dietary fibers on metabolic indexes in man. **Am J Clin Nutr**, v.59, p.879-883, 1994.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. American Institute of Nutrition (Committee Report), p.1939-1951. 1993.

REISER, S.; POWELL, A.S.; SCHOLLFIELD, D.J.; PANDA, P.; ELLWOOD, K.C.; CANARY, J.J. Blood lipids, lipoproteins, apoproteins, and uric acid in men fed diets containing fructose or high-amylases cornstarch. **Am J Clin Nutr**, v.49, p.832-839, 1989.

ROBERTS, S. B. High-glycemic index foods, hunger, and obesity: Is there a connection? **Nutr Rev**, v.58, n.6, p.163-169, 2000.

ROBERTSON, M.D.; CURRIE, J.M.; MORGAN, L.M.; JEWELL, D.P.; FRAYN, K.N. Prior short-term consumption of resistant starch enhances postprandial insulin sensitivity in healthy subjects. **Diabetologia**, v.46, n.5, p.659-665, 2003.

ROBERTSON, M.D.; HENDERSON, R.A.; VIST, G.E.; RUMSEY, R.D.E. Extended effect of evening meal carbohydrate/fat ratio on fasting and postprandial substrate metabolism. **Am J Clin Nutr**, v.75, p.505-510, 2002.

ROSIN, P.M., LAJOLO, F.M., MENEZES, E.W. Measurement and characterization of dietary starches. **J Food Compos Anal**, v.15, p.367-377, 2002.

SAKATA, T; YAJIMA T. Influence of short chain fatty acids on the epithelial cell division of digestive tract. **Q J Exp Physiol**, v.69, p.639-648, 1984.

SALMERON, J.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. F.; COLDITZ, G. A.; WING, A. L.; WILLETT, W. C. Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. **JAMA**, v.277, n.6, p.472-477, 1997.

SARIS, W.H.M.; ASP, N.G.; BJÖRCK, I.; BLAAK, E.; BORNET, F.; BROUNS, F; FRAYN, K.N.; FÜRST, P.; RICCARDI, G.; ROBERFROID, M.; VOGEL, M. Functional food science and substrate metabolism. **Br J Nutr**, v.80, Supp1, p.47-75. 1998.

SAURA-CALIXTO, F. Evolución del concepto de fibra. 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. São Paulo: EDUSP, p.237-253. 2006.

SAURA-CALIXTO, F.; GARCÍA-ALONSO, A. Metodología para el análisis de fibra y carbohidratos. In: LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. (eds). **Fibra Dietética em Iberoamérica: tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación em alimentos.** São Paulo: Editora Varela, 2001. p.17-26.

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.

SCHEPPACH, W.; FABIAN, C; SACHS, M; KASPER, H. The effect of starch malabsorption on fecal short-chain fatty acid excretion in man. **Scand J Gastroentrol**, v.23, p.755-759, 1988.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **Am J Clin Nutr**, v.73, n.2, p.361S-364S, 2001.

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.

SHÄFER, K. Analysis of short chain fatty acids from different intestinal samples I: By column gas chromatography. **Chromatographia**, v.39, n.11/12. 1994.

SHETTY, P.S.; KURPAD, A.V. Increasing starch intake in the human diet increases fecal bulking. **Am J Clin Nutr**, v.43, p.210-212, 1986.

SOUZA, A.G. Índice glicêmico e carga glicêmica de alguns alimentos brasileiros. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação Interunidades em Nutrição Humana Aplicada (FCF/FEA/FSP-USP), 2004, 59p.

THE BRITISH NUTRITION FOUNDATION. **Complex carbohydrates in foods.** The report of the British Nutrition Foundation's Task Force. UK: Chapman and Hall, 1990. 164 p.

THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Dietary Reference Intakes (DRI) for Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Protein and Aminoacids (macronutrients), 2002. Washington, D.C.: THE NATIONAL ACADEMIES PRESS, Food and Nutrition Board (FNB), 2005, 1331p.

THORBURN, A; MUIR, J.; PROIETTO, J. Carbohydrate fermentation decreases hepatic glucose output in healthy subjects. **Metabolism**, v.42, n.6, p.780-785, 1993.

TOPPING D.L.; GOODEN J. M.; BROWN I.L.; BIEBRICK D.A.; MCGRATH L.; TRIMBLE R.P.; CHOCT,M.; ILLMAN R.J. A high amylose (amylomaize) starch raises proximal large bowel starch and increases colon length in pigs. **J Nutr**, v.127, p.615-622, 1997.

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.

TOPPING, D.L.; ILLMAN, R.J.; CLARKE, J.M.; TRIMBLE, R.P.; MARSONO, Y. Human foods and large bowel volatile fatty acids in a suitable animal: the pig. Nutrition in a Sustainable Environment. Proceeding of the XV International Congress of Nutrition. IUNS, Adelaide, 26 September-1 October, p.760-764, 1993.

TOPPING, D.L.; ILLMAN, R.J.; TAYLOR, M.N. Effects of wheat bran and porridge oats on hepatic portal venous volatile fatty acids in pig. **Ann Nutr Metab**, v.29, n.6, p.325-331, 1985.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. (USP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-USP**. Versão 4.1. No ar desde 1998. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela>>. Acesso em: Novembro, 2005.

VAN MUNSTER, I.P.; NAGENGAST, F.M. The role of carbohydrate fermentation in colon cancer prevention. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v.200, p.80-86, 1993.

VAREL, V.H. Activity of fiber-degrading microorganisms in the pig large intestine. **J Anim Sci**, v.65, n.2, p.488-496, 1987.

VENTER, C.S.; VORSTER, H.H.; CUMMINGS, J.H. Effects of dietary propionate on carbohydrate and lipid metabolism in healthy volunteers. **Am J Gastroenterol**, v.85, n.5, p.549-553, 1990.

WACKER, M.; WANEK, P.; EDER, E.; HYLLA, S.; GOSTNER, A.; SCHEPPACH, W. Effect of enzyme-resistant starch on formation of 1,N(2)-propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal and cell proliferation in the colonic mucosa of healthy volunteers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.11, n.9, p.915-920, 2002.

WANG, X.; CONWAY, P.L.; BROWN, I.L.; EVANS, A.J. In vitro utilization of amylopectin and high-amylose maize (Ammylomaize) starch granules by human colonic bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v.65, n.11, p.4848-4854, 1999.

WARING, S. **Functionality of resistant starch in food applications**. Cereal Foods World, 1998. Disponível em: < <http://www.foodstarch.com>>. Acesso em: janeiro de 2002

WEAVER, G.A.; KRAUSE, J.A.; MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. Cornstarch fermentation by the colonic microbial community yields more butyrate than does cabbage fiber fermentation: cornstarch fermentation rates correlate negatively with methanogenesis. **Am J Clin Nutr**, v.67, p.136-142, 1992.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Obesity: Preventing and managing the global epidemic**. Report of a WHO Consultation on obesity. Geneva, 1997; World Health Organization; 1998. WHO document WHO/NUT/NCD/98.1. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_NUT_NCD_98.1_\(p1-158\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_NUT_NCD_98.1_(p1-158).pdf)>.

WHO/FAO (WORLD HEALTH ORGANIZATION/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). **Diet, nutrition and prevention of Chronic Diseases**. WHO Technical Report Series. Geneva, 2003, 149p.

WOLEVER, T.M. The glycemic index. **World Rev Nutr Diet**, v.62, p.120-185, 1990.

WOLEVER, T.M.; BRIGHENTI, R.; ROYALL, E. Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects. **Am J Gastroenterol**, v.84, p.1027-1037, 1989.

WOLEVER, T.M.; JENKINS, D.J.; OCANA, A.M.; RAO, V.A.; COLLIER, G.R. Second-meal effect: low-glycemic-index foods eaten at dinner improve subsequent breakfast glycemic response. **Am J Clin Nutr**, v.48, p.1041-1047, 1988.

WOLEVER, T.M.; JENKINS, D.J.A.; JENKINS, A.L.; JOSSE, R.G. The glycemic index: methodology and clinical implications. **Am J Clin Nutr**, v.54, p.846-854, 1991.

WOLEVER, T.M.S.; VOSTER, H.H.I.; BRAND-MILLER, J.; BRIGHENTI, F.; MANN, J.I.; RAMDATH, D.D.; GRANFELT, Y.; HOLT, S.; PERRY, T.L.; VENTER, C.; XIAOMEI, W. Determination of the glycemic index of foods: interlaboratory study. **Eur J Clin Nutr**, v.57, p.475-482, 2003.

WYATT, G.M.;HORN, N. Fermentation of resistant food starches by human and rat intestinal bacteria. **J Sci Food Agric**, v.44, p.281-288, 1988.

XIMENES, H.M.A.; HIRATA, A.E.; ROCHA, S.M.; CURY, R.; CARPINELLI, A.R. Propionate inhibits glucose-induced insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. **Cell Biochem Funct**, v. 23, p. 1-6, 2005 (in press). Epub ahead of print: 2006.

ZHANG, P.; WHISTLER, R.; BEMILLER, J.; HAMAKER, B. Banana starch: production physicochemical properties and digestibility – a review. **Carbohydr Polym**, v.59, p.443-458, 2005.

APÊNDICE A

APÊNDICE A - Carboidratos: terminologia

Os carboidratos em geral são classificados de duas formas principais: de acordo com sua estrutura química ou de acordo com seu papel fisiológico. Saber as características químicas estruturais dos carboidratos nem sempre prevê sua exata utilização fisiológica no organismo.

Segundo a FAO/WHO (1998), quimicamente os carboidratos podem ser divididos em três classes principais de acordo com o seu grau de polimerização (GP):

- açúcares (GP=1-2): monossacarídeos (glicose, galactose, frutose), dissacarídeos (sacarose, lactose, trealose) e polióis (sorbitol, manitol);
- oligossacarídeos (GP=3-9): maltooligosacarídeos (maltodextrinas) e outros oligossacarídeos (rafinose, fructooligosacarídeos – FOS);
- polissacarídeos (GP>9): amido (amilose, amilopectina, amidos modificados) e polissacarídeos não-amido (celulose, hemicelulose, pectinas, hidrocolóides).

Quanto ao seu papel fisiológico, são muitas as terminologias propostas mesmo quando levados em conta somente os últimos 10 anos (FAO/WHO, 1998; FAO, 2003; CUMMINGS, EDMOND, MAGEE, 2004; ENGLYST; ENGLYST, 2005).

No presente trabalho, diversas terminologias são utilizadas para classificar os diferentes tipos de carboidratos, amidos, fibras e frações alimentares de acordo com sua digestibilidade ou utilização fisiológica.

Desde 1929, a classificação dos carboidratos em “disponíveis” e “não-disponíveis” vem sendo utilizada (McCANCE; LAWRENCE, 1929), porém sua definição tem variado ao longo dos anos. Com o intuito de identificar os carboidratos segundo sua possibilidade de absorção e metabolização, os carboidratos “disponíveis” eram definidos como “amido e açúcares solúveis” e os “não-disponíveis” eram principalmente “hemicelulose e fibra

(celulose)”. Aliás, o conceito de “fibra” é outra problemática que ainda vem sendo debatida por mais de 150 anos em todo o mundo (CUMMINGS; EDMOND; MAGEE, 2004).

Na década de 90 surgiu o conceito de que, apesar de não digerido no intestino delgado, um carboidrato não-disponível ainda pode fornecer energia ao metabolismo através de sua fermentação no intestino grosso. A partir de então foram sugeridas as terminologias de carboidratos “glicêmicos” e “não-glicêmicos” para classificá-los de acordo com sua capacidade de fornecer exclusivamente glicose ao metabolismo e não mais apenas participar deste (FAO/WHO, 1998; ENGLYST; ENGLYST, 2005).

Tal classificação foi logo em seguida criticada por um dos próprios órgãos a propô-la (FAO, 2003) por possibilitar confusão com o conceito de “índice glicêmico (IG)”, que é um índice que descreve a resposta relativa de glicose sanguínea a diferentes carboidratos “disponíveis”. Portanto, as recomendações voltaram a apontar a terminologia “disponível” e “não-disponível” como sendo a mais adequada para os carboidratos, onde o termo carboidrato disponível representa a fração de carboidratos que pode ser digerida por enzimas humanas e absorvida participando do metabolismo intermediário. A fibra não é incluída nesta definição por ser fonte de energia somente após sua fermentação.

O amido resistente (AR), outro componente dos carboidratos não-disponíveis, é definido como amido e produtos da hidrólise do amido que não são absorvidos no intestino delgado (ASP et al., 1992) não contribuindo assim para a alteração na glicemia pós-prandial (RANGANATHAN et al., 1994). O AR pode ser subdividido em quatro tipos: AR1 (fisicamente inacessível), AR2 (grânulos resistentes), AR3 (retrogradado) e AR4 (quimicamente modificado) (CHAMP et al., 2003).

Até então, por vezes o AR era classificado como fibra alimentar ou, na maioria das vezes, era completamente ignorado sendo incluído na fração chamada genericamente de

“amido”, logo, pertencente aos carboidratos disponíveis. Tais falhas eram justificadas pela falta de uma metodologia apropriada para sua quantificação, com a devida validação *in vivo*.

Diversos métodos de análise de AR foram propostos nos últimos 20 anos (CHAMP et al., 2003), isto é, mesmo antes de sua definição, enquanto era identificado com “amido presente no resíduo de fibra alimentar” (BJÖRCK et al., 1986). Atualmente, McCleary e Monaghan (2002) desenvolveram uma metodologia analítica para AR que vem sendo amplamente aceita, por ter sido extremamente criteriosa em estudar em detalhes os pontos críticos de todas as outras metodologias propostas até então.

No presente trabalho, como já se faz uso de tal metodologia para a análise do AR, os carboidratos aqui considerados disponíveis não incluem tal fração. O AR, bem como a fibra alimentar (FA), são classificados como carboidratos não-disponíveis.

A classificação do amido em tipos A, B e C não é explorada no presente trabalho, mas se refere a padrões de difração de raios-X de amidos crus (CHAMP et al., 2003).

Uma outra terminologia que merece atenção é a fração indigerível (FI), que se refere aos compostos que chegam ao intestino grosso podendo fazer parte do processo fermentativo colônico. De acordo com Cummings e Macfarlane (1991), a FI inclui carboidratos (AR, FA, açúcares-álcool e oligossacarídeos), componentes nitrogenados (proteína resistente, enzimas, uréia) e outros (polifenóis, muco, bactérias e células epiteliais). A metodologia proposta para sua análise (SAURA-CALIXTO et al., 2000; SERRANO; GOÑI; SAURA-CALIXTO, 2005) leva em conta principalmente os componentes majoritários e mais comuns: FA, AR e proteínas resistentes (SAURA-CALIXTO; GARCÍA-ALONSO, 2001).

ANEXO A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 45

São Paulo, 25 de junho de 2002.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião de 24 do corrente, aprovou o projeto "Alimentos com reduzido índice glicêmico e sua influência na tolerância à glicose", apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas ser alterada a redação do item III do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para um texto bem reduzido, com linguagem simples, sem termos técnicos (vide roteiro em anexo).

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Ilmo(a) Sr(s).
Giselli Helena de Lima
Orientador: Prof. Elizabeth Wenzel de Menezes
FBA

ANEXO B



Of. CEEA nº 10

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação da fermentação de alimentos de índice glicêmico reduzido na tolerância à glicose" (Protocolo nº11), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Milana Cara Tanasov Dan 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 02/06/2003.

São Paulo, 03 de junho de 2003.

*Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA*



CECEA nº 45/2004

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Produtos derivados de banana (Musa paradisíaca) e sua influência na tolerância à glicose e na fermentação colônica" (Protocolo nº54), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Giselli Helena Lima Cardenette 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 19/11/2004.

São Paulo, 19 de novembro de 2004.

*Prof. Associada Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA*