



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



Estudo dos efeitos nutricionais da farinha de polpa e
mucilagem extraída do quiabo (*Hibiscus esculentus* L.)

Vera Sônia Nunes da Silva

Química

Mestre em Ciência da Nutrição

Orientador: ***Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán***

Co-orientadora: ***Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco***

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação de Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Alimentos e
Nutrição

**Campinas, SP
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Si38e Silva, Vera Sônia Nunes da
Estudo dos efeitos nutricionais da farinha de polpa e mucilagem
extraída do quiabo (*Hibiscus esculentus* L.) / Vera Sônia Nunes da
Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Jaime Amaya-Farfán
Co-orientador: Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos.

1. Quiabo. 2. Fibra alimentar. 3. Diabetes. 4. Ácidos biliares.
5. Ácidos graxos de cadeia curta. I. Amaya-Farfán, Jaime. II.
Pacheco, Maria Teresa Bertoldo. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Study of the nutritional effects of the pulp flour and mucilagens
extracted from okra (*Hibiscus esculentus* L.)

Palavras-chave em inglês (Keywords): Okra, Dietary fiber, Short chain fatty acids,
Bile acids, Diabets

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Área de concentração: Nutrição experimental e aplicada a tecnologia de alimentos

Banca examinadora: Jaime Amaya-Farfán

Carla Roberta O. Carvalho

Miguel Arcanjo Áreas

Vera Lúcia Signoreli Baldini

Elizabete Lourenço Costa

Suzana Lima de Oliveira

BANCA EXAMINADORA



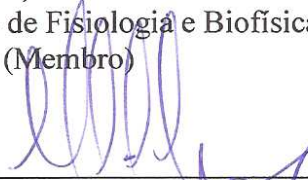
Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição
(Orientador)



Profa. Dra. Carla Roberta O. Carvalho

Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
(Membro)

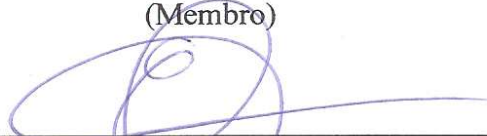


Prof. Dr. Miguel Arcanjo Arêas

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia
(Membro)

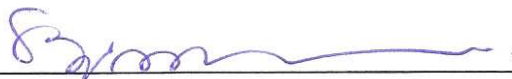
Profa. Dra. Vera Lúcia Signoreli Baldini

Instituto de Tecnologia de Alimentos
(Membro)



Profa. Dra. Elizabete Lourenço Costa

Universidade Católica de Santos
(Membro)



Profa. Dra. Suzana Lima de Oliveira

Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição
(Membro)

À Deus

*“Por vezes, senti meu corpo fraquejar, e Tu estendeste tua mão e ergueste-me
Por vezes, senti minha alma se abater, e Tu me destes coragem para prosseguir
Por vezes, senti meu espírito desvanecer, e Tu enviaste o próprio espírito para me consolar
Hoje, a vitória é minha
E a Ti, Meu Deus, toda honra e toda glória, eternamente
Amém...”*

Ao meu pai e à minha mãe,

“Por mais que o tempo e a distância insistam em me fazer esquecer, o amor verdadeiro nunca morrerá. E por todo tempo que ainda viver, perpetuarei tua memória e hei de ser fiel aos teus princípios, pois este meu trabalho é fruto de tudo o que me ensinastes”.

Estarão sempre presentes no meu coração...”

*Ao meu marido e a minha amada filha Manuela Luísa,
“Pelos dias, meses, e anos de espera,
vividos nesta jornada,
pela compreensão e carinho...”*

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, confiança e amizade;

À prof^a. Dr^a Maria Teresa Bertoldo Pacheco pela brilhante co-orientação, sempre me apoiando nas horas mais difíceis de minha vida;

Aos professores da banca examinadora que contribuíram ao aprimoramento do trabalho com enriquecedoras sugestões;

A secretaria de Pós-Graduação, em especial ao Cosme Perota, pela gentileza e eficiência na realização de seu trabalho e sempre disposto a ajudar;

A minhas amigas e colaboradoras, Aparecida Sônia de Souza, Ivonete Moura, Carla de Marco Gregghi e Iná A. C. dos Santos, na preparação de 30 kg de quiabo.

Em especial ao meu pai Joaquim Nunes pela ajuda inestimável na preparação do 40 kg de quiabo complementares, sendo também muito prestativo durante a redação deste trabalho, que teve início quando minha filha tinha apenas três meses de vida necessitou de sua tão dedicada atenção e cuidados, mais que infelizmente hoje não está mais comigo e se tornou meu anjo celeste, e sempre viverá no meu coração.

A Técnica Maria Susana Corrêa Alves da Cunha do Laboratório de Ensaio Biológico (LEB) do Departamento de Alimentos e Nutrição, pela dedicação, apoio e orientação, além da amizade, alegria, otimismo e disponibilidade durante os três meses dedicados ao manuseio dos animais;

Ao Técnico Francisco Carraro do Laboratório Central de equipamentos do Departamento de Alimentos e Nutrição, pela dedicação, apoio, orientação, e confiança depositada na utilização dos equipamentos (CLAE e CG); durante as análises cromatográficas;

Aos funcionários e amigos de Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição: Carla de Marco Gregghi, Iná A. C. dos Santos, Francisco Carraro, Eliana M. P. Motta, Eliete C. Leite, Elizabeth F. Silva, Maria Aparecida V. Osteti e Isabel de Fátima Valentino pela colaboração e prestabilidade constante;

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Geraldo A. Silva, José Marcondes, Creuza K. Nomura e Cláudia Romano, pela colaboração e atenção dispensadas;

Ao Laboratório de Bioquímica do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada – ITAL, em especial a pesquisadora Dr^a Vera Lúcia Signorelli Baldini, pela amizade e constante ajuda.

Ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de laticínios, pela disposição do laboratório para execução do ensaio in vitro.

À Margareth Lopes Galvão Saron, pela orientação durante o ensaio in vitro;

Aos amigos pesquisadores do DEPAN, que compartilharam as alegrias desta jornada, Bete, Ivonete, Beatriz, Lucia, pois onde existe harmonia existe prazer de estar junto;

Aos meus familiares, cunhados, irmãos e sobrinhos que sempre torceram pelo meu sucesso, em especial às minhas irmãs Sandra, Selma, Sirlene e Ceila, não há palavra que descreva a importância de vocês durante esta árdua jornada.

Ao Henrique Nunes Ramos pelo apoio técnico computacional, resolvendo e vencendo as dificuldades sem pedir nada em troca;

A minha amiga Sônia pelo companheirismo e dedicação, sempre incansável na solidariedade e no afeto.

A Clariant S.A. (São Paulo, Brasil) pelo fornecimento da Inulina (Raftiline®HP-Gel).

A CNPq pela concessão de bolsa de estudo durante curso de doutorado.

A FAPESP pelo financiamento deste projeto.

A todos os que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Fibra alimentar – Definição e características físico-químicas.....	03
2.1.1. Inulina – Definição e atividade funcional.....	04
2.1.2. Trato gastrintestinal e sua interação com o substrato disponível à fermentação.....	08
2.1.3. Microbiota, fermentação e produção de ácidos graxos de cadeia curta...	12
2.1.4. Efeito da fibra no índice glicêmico.....	15
2.1.5. Ácidos Biliares e o efeito da fibra alimentar no seu metabolismo.....	17
2.2. Quiabo (<i>Hibiscus esculentus</i> L.) Definição e propriedades.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Geral.....	23
3.2. Específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Matéria-prima.....	24
4.2. Métodos.....	24
4.2.1. Método de preparação da polpa.....	24
4.2.2. Método de extração da mucilagem da polpa.....	24
4.2.3. Caracterização química da mucilagem de quiabo.....	24
4.2.4. Caracterização química da farinha de quiabo.....	24
4.2.5. Determinação de aminoácidos na mucilagem e polpa do quiabo.....	25

4.3.	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	25
4.3.1.	Ensaio <i>in vitro</i> com cultura de bactérias.....	25
4.3.2.	Protocolo experimental.....	25
4.3.3.	Medidas de intensidade de crescimento.....	26
4.4.	Ensaio <i>in vivo</i> com ratos Wistar.....	27
4.4.1.	Preparo das dietas experimentais.....	27
4.4.2.	Protocolo experimental.....	27
4.4.2.1.	Trânsito intestinal.....	28
4.4.2.2.	Densidade Fecal.....	29
4.4.2.3.	Final do período experimental.....	30
4.4.2.4.	Medidas intestinais.....	30
4.5.	Contagem e classificação da microflora intestinal	30
4.6.	Estudo morfológico.....	31
4.7.	Determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e lactato no ceco e cólon.....	32
4.8.	Quantificação de ácidos biliares fecais.....	32
4.9.	Indução do diabetes utilizando estreptozotocina (STZ).....	33
4.9.1.	Parâmetro ponderal, coletas de amostras de sangue e urina.....	33
4.9.2.	Teste de tolerância à glicose (TTG).....	34
4.9.3.	Final do período experimental.....	36
4.9.3.1.	Determinação de glicose sangüínea.....	36
4.9.3.2.	Determinação de insulina sérica.....	36
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
6.	RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	37
6.1.	Caracterização química da mucilagem e da polpa do quiabo.....	37
6.2.	Resultados do ensaio <i>in vitro</i> para culturas de bactérias.....	38
6.3.	Resultados do ensaio <i>in vivo</i> com ratos Wistar.....	40
6.4.	<i>Contagem e classificação da microflora intestinal.....</i>	46
6.5.	Determinação de ácidos orgânicos no ceco e no cólon por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	51

6.6.	Estudo morfológico do íleo e cólon.....	60
6.7.	Determinação de ácidos biliares fecais por cromatografia gasosa (CG)..	64
6.8.	Ensaio com animais diabéticos (indução com estreptozotocina).....	68
6.8.1.	Testes tolerância à glicose.....	72
6.8.2.	Parâmetro ponderal, consumo de dieta e água; excreção urinária e fecal.....	77
6.8.3.	Final do período experimental.....	80
6.8.3.1.	Concentrações de glicose e insulina sangüíneas.....	82
7.	CONCLUSÕES.....	85
8.	REFERÊNCIAS.....	87
	ANEXOS.....	115

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados no estudo.....	26
Tabela 2. Composição das dietas utilizadas no estudo.....	27
Tabela 3. Composição centesimal e de aminoácidos da mucilagem e da farinha da polpa do quiabo liofilizado.....	37
Tabela 4. Efeitos das fibras no ganho de peso no consumo de dieta e na eficiência.....	41
Tabela 5. Efeito de diferentes fontes de fibra na excreção fecal e no trânsito intestinal.....	42
Tabela 6. Efeito de diferentes fontes de fibra na massa do fígado, baço e coração de ratos alimentados com dieta padrão e experimental durante 14 dias.....	43
Tabela 7. Efeito de diferentes fontes de fibra na massa do fígado, baço e coração de ratos alimentados com dieta padrão e experimental durante 28 dias.....	43
Tabela 8. Efeito de diferentes fontes de fibra na massa tecidual e do conteúdo gastrintestinal de ratos alimentados com dieta padrão e experimental, durante 14 dias.....	44
Tabela 9. Efeito de diferentes fontes de fibra na massa tecidual e do conteúdo gastrintestinal de ratos alimentados com dieta padrão e experimental, durante 28 dias.....	44
Tabela 10. Efeito de diferentes fontes de fibra no comprimento do intestino delgado, ceco e cólon de ratos alimentados com dieta padrão e experimental, durante 14 dias.....	45

Tabela 11.	Efeito de diferentes fontes de fibra no comprimento do intestino delgado, ceco e cólon de ratos alimentados com dieta padrão e experimental, durante 28 dias.....	46
Tabela 12.	Relação dos microrganismos quantificados neste estudo, seus efeitos benéficos e tóxicos no intestino.....	48
Tabela 13.	Médias da altura das vilosidades (AV) na mucosa intestinal do íleo e cólon, após 28 dias de tratamento experimental.....	63
Tabela 14.	Efeito da fibra nos consumos de água e dieta, excreção urinária e excreção fecal, em ratos normais e diabéticos ao longo de 28 dias de experimento.....	79
Tabela 15.	Efeito de dietas com diferentes fontes de fibra na massa de órgãos (tecidos).....	82

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. (a) Fórmula química da inulina; (b) Estrutura química da inulina; (c) Estrutura hidratada (4 unidades), os átomos de oxigênio das moléculas de água aparecem em vermelho.....	05
Figura 2. Fluxograma do processo para produção da inulina (Raftiline®).....	07
Figura 3. Estruturas e locais de conversão dos principais ácidos biliares primários, secundários e terciários, na bile humana. Na parte inferior da figura é ilustrada a conjugação do ácido cólico com glicina ou taurina.....	18
Figura 4. Fluxograma do protocolo experimental utilizado para o ensaio <i>in vivo</i>	29
Figura 5. Fluxograma do protocolo experimental utilizado para a indução do diabetes e do teste de tolerância à glicose.....	35
Figura 6. Crescimento relativo de <i>Lb acidophilus</i> La-5 e <i>B. lactis</i> Bb-12 em meios MRS e MRSm.....	39
Figura 7. Concentração aproximada de bactéria em várias regiões do trato gastrointestinal.....	47
Figura 8. Efeito de diferentes fontes de fibras sobre a microbiota de ratos, após 14 dias de experimento.....	49
Figura 9. Efeito de diferentes fontes de fibras sobre a microbiota de ratos, após 28 dias de experimento.....	50
Figura 10. Cromatogramas dos AGCC (acetato, propionato, butirato) e lactato presentes no conteúdo cecal dos ratos.....	54
Figura 11. Cromatogramas dos AGCC (acetato, propionato, butirato) e lactato presentes no conteúdo colônico dos ratos.....	55

Figura 12.	Produção de AGCC e lactato no ceco dos ratos alimentados com diferentes fontes de fibras após 14 e 28 dias de tratamento.....	57
Figura 13.	Produção de AGCC e lactato no cólon dos ratos alimentados com diferentes fontes de fibras após 14 e 28 dias de tratamento.....	58
Figura 14.	Porcentagem da média dos AGCC e lactato no ceco e cólon dos ratos após 14 e 28 dias de tratamento.....	59
Figura 15.	Fotomicrografias das vilosidades do íleo (aumento de 10X) e cólon (aumento de 2X) dos ratos Wistar após 28 dias de tratamento.....	61
Figura 16.	Cromatogramas dos ácidos biliares fecais (Litocólico, Desoxicólico, cólico/quenodesoxicólico e ursodesoxicólico).....	65
Figura 17.	Concentrações de ácidos biliares primários e secundários nas fezes dos ratos após 14 e 28 dias de tratamento.....	67
Figura 18.	Estrutura molecular da estreptozotocina e glicose.....	70
Fígura 19.	Arranjos das células do pâncreas (células exócrinas e endócrinas).....	71
Figura 20.	Efeito da dieta, no teste de tolerância à glicose para ratos saudáveis, antes do tratamento com estreptozotocina.....	73
Figura 21.	Efeito da dieta no teste de tolerância à glicose nos ratos saudáveis, que receberam tratamento com tampão citrato (placebo).....	74
Figura 22.	Efeito da dieta no teste de tolerância à glicose nos ratos diabéticos, após tratamento com estreptozotocina.....	75
Figura 23.	Correlação entre glicemia em jejum e glicemia 120 min. após ingestão de glicose.....	76
Figura 24.	Ganho de peso semanal dos ratos normais e diabéticos.....	77
Fígura 25.	Porcentual de peso corporal dos ratos normais e diabéticos, ao final da 4 ^a semana de tratamento.....	78
Figura 26.	Efeito da dieta nas gorduras epididimárias, peri-renais, rins e testículos dos ratos normais e diabéticos.....	81
Figura 27.	Valores médios de glicose sanguínea.....	83
Figura 28.	Valores de insulina sérica.....	83

RESUMO

As fibras alimentares são entendidas como carboidratos ou substâncias poliméricas afins em alimentos que não sendo digeridas nem absorvidas no intestino superior, possuem vários efeitos fisiológicos e bioquímicos no intestino baixo e no restante do organismo, incluindo a modulação da população microbiótica, alterações na dinâmica dos fluídos fisiológicos, produção de diversos tipos de nutrientes, caracterizando-se como componente essencial da alimentação.

A primeira fase deste trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* o efeito bifidogênico da mucilagem extraída da farinha da polpa do quiabo (*Hibiscus esculentus*, L.), como controle do crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La-5, foi utilizado o meio de cultura MRS (Man, Rogosa, Sharpe), e para a cultura de *Bifidobacterium lactis* Bb-12, o MRS enriquecido com L-cisteína denominado MRS modificado (MRSm). A segunda fase consistiu de um estudo comparativo dos efeitos ocorridos em ratos da linhagem Wistar, recém-desmamados (RD) com os que consumiam dietas AIN-93G, tendo como fontes de fibras: celulose (CC), inulina (CI) e a polpa de quiabo liofilizada (EQ). Nesse ensaio biológico foi avaliado o impacto da fibra na ingestão alimentar, trânsito intestinal, excreta fecal e morfologia intestinal, assim como os conteúdos: estomacal, cecal, colônico e do intestino delgado. Foram determinadas também as concentrações dos ácidos biliares fecais, a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e lactato no ceco e cólon. Adicionalmente foi estudado o impacto que esta fibra poderia exercer sobre o metabolismo da glicose em ratos diabéticos.

Os resultados do ensaio *in vitro*, mostraram que a mucilagem na concentração de 1,0%, promoveu aumento expressivo do número de células, de 17,57% para *Lactobacillus acidophilus*, e de 70% para *Bifidobacterium lactis* Bb-12, em relação ao controle de crescimento MRS e MRSm, respectivamente.

As análises microbiológicas aos 28 dias de alimentação demonstraram que a população de lactobacilos do grupo EQ foi superior em 0,680 log ufc/g de fezes, em relação

ao RD. E aos 14 dias a população de bifidobactérias no grupo EQ foi superior em 0,382 log ufc/g de fezes, em relação ao CI.

A soma dos níveis de acetato, lactato, propionato e butirato colônico foram superiores para o grupo EQ quando comparados aos grupos CC e CI, indicando efeito positivo na produção destes ácidos orgânicos pela fibra do quiabo. A morfologia intestinal mostrou ser independente do tipo de fibra utilizado na dieta. Os níveis de ácidos biliares secundários foram excretados em maiores quantidades pelo grupo EQ, estes resultados associados ao menor tempo de trânsito intestinal resultaram em menor tempo de permanência destes metabólitos toxicogênicos no lúmen.

No ensaio de indução de diabetes pela estreptozotocina, em ratos diabéticos alimentados com polpa de quiabo (EQD) a taxa de insulina foi superior aos ratos diabéticos alimentados com inulina (CID) e celulose (CCD). As reservas de gorduras epididimárias do grupo EQD foram menores em relação aos CCD e CID ($P<0,05$), sendo que o fator positivo para o grupo EQD foi ter apresentado menor perda de peso corporal, menor consumo de água e menor excreção urinária. Diante destes resultados, foi possível verificar um efeito global positivo associado ao consumo da fibra de quiabo pelo rato, sugerindo que o consumo do quiabo como parte integral da dieta poderá proporcionar efeitos fisiológicos benéficos ao indivíduo.

Palavras chave: Quiabo, fibra alimentar, ácidos graxos de cadeia curta, ácidos biliares, diabetes.

SUMMARY

Dietary fiber is understood as any polymer normally occurring in foods, generally of carbohydrate nature, that is not digested and absorbed in the upper digestive tract and that is responsible for various physiological and biochemical effects in the lower gastrointestinal tract and the rest of the body, including alteration of the distribution of the bowel microbiota, improvement of physiological fluid dynamics, the production of some micronutrients, and which can be considered as essential components the human diet.

This work consists of two sections. The first section consisted of an *in vitro* study of the bifidogenic effects of the mucilage extracted from okra (*Hibiscus esculentus*, L.).

The second section was an *in vivo* study with Wistar rats just weaned, as initial group (IG), compared with fed with standard (AIN-93G) diets, formulated utilizing as source of dietary fiber: cellulose control (group CC), inulin control (IC) and okra experimental (OE), estimating such parameters as feed uptake, fecal output, transit time, GI tissue mass, and the stomach, cecal, fecal and small intestine contents. Additionally the impact of the fiber on the concentration of bile acids, gut morphology, short chain fatty acid (SCFA) and lactate production in cecum and colon and the fiber effect on the metabolism in streptozotocin induced diabetic rats were also studied.

The results of the *in vitro* assay showed that mucilage concentration by 1% mucilage resulted in a substantial rise in cell counts, 17.57% *Lactobacillus acidophilus* and 70% *Bifidobacterium lactis* Bb-12, when compared to the MRS and MRSm medium, respectively.

Microbiological analyses of the assay showed that the lactobacillus in the experimental OE group on the 28th day was over 0.680 log cfu/g of feces larger when compared to the IG. On the 14th day, the levels of bifidobacteria in the group OE were higher by 0.382 log ufc/g of feces than in the IC group. The results suggested there was a selective stimulation of the lactobacillus and bifidobacteria populations in the OE group.

Meanwhile, the OE diet elicited higher levels of short chain fatty acids (SCFA) and lactate in cecum and colon as opposed to the IC and CC groups, showing that the okra fiber

stimulates intestinal organic acid production. The intestinal morphology showed independent of the type of fiber.

The amounts of secondary bile acids (lithocholic and deoxicholic) were excreted more by OE group. This results associated the lesser transit time, results time lesser this toxigenic metabolic at lumen.

With regard to the induction of diabetes by streptozotocin, diabetic rats feeding with okra (OED) the serum insulin was biggest when compared than diabetic rats feeding inulin (ICD) and cellulose (CCD). These results confirm that in the diabetics rats of OED the insulin production was bigger, maybe the fiber of okra had protector effects in these animals. The epididymal fats and kidney was smaller than CCD and ICD, although the OED showed the lowest body weight loss. These results showed that the okra mucilage was beneficial to the rat when introduced in the diet, suggesting that this fiber may exhibit similar effects in human beings.

Key words: Okra, dietary fiber, short chain fatty acids, bile acids, diabets.

1. INTRODUÇÃO

O alimento é essencial e indispensável à manutenção e a ordem da saúde, pois a dieta influencia todos os estágios metabólicos, sendo de principal importância no fornecimento de nutrientes necessários para saúde mental e corporal. Para atingir equilíbrio é essencial que os alimentos ingeridos sejam adequados tanto em quantidade como em qualidade para manter a integridade estrutural e funcional do organismo. A fibra alimentar (FA), é definida como a fração não digerível dos alimentos vegetais que não é absorvida pelo organismo. Está presente nos vegetais e é constituída por polissacarídeos: celulose, hemiceluloses, substâncias pécicas, hidrocolóides (gomas e mucilagens), amidos resistentes, oligossacarídeos resistentes e também pela lignina que é um componente da parede celular, mas não é carboidrato (Lajolo et al., 2001).

Possui vários efeitos no trato gastrointestinal, incluindo alterações na dinâmica dos fluídos fisiológicos, na digestão das macromoléculas, na absorção dos diversos tipos de nutrientes (Kumar et al., 2002), firmando-se como componente essencial para alimentação, tanto humana como animal. Embora a fibra não forneça energia ou compostos classicamente conhecidos como nutrientes, ela é considerada componente indispensável das dietas. A ausência de fibra na alimentação pode ocasionar redução das funções da mucosa do trato gastrointestinal aumentando conseqüentemente riscos de translocação de bactérias para o sangue, ou septicemia (Spaeth et al., 1990; Szilagyi, 1998). Estudos realizados ao longo das últimas décadas comprovam que a ingestão de FA ocasiona efeitos metabólicos e fisiológicos positivos (Dongowski et al., 2002).

No início da década de 70, pesquisadores puderam constatar a importância da fibra alimentar como constituinte indispensável à dieta normal (Payne, 1987) devido a seu efeito preventivo ou atenuador de algumas doenças gastrointestinais e outras crônicas e/ou degenerativas para o organismo animal (Schneeman, 1986). Em estudo com animais e humanos (Gibson et al., 1995), foi verificado que as fibras ocasionaram, durante o tempo de consumo, mudanças na composição e/ou na atividade metabólica da microbiota intestinal,

com alteração na quantidade dos produtos finais do metabolismo bacteriano, sendo que os principais substratos para atividade bacteriana foram os carboidratos não-digeríveis, fibras solúveis e insolúveis e os oligossacarídeos não-digeríveis. Alguns estudos morfológicos relatam que o consumo de FA está associado com mudanças na estrutura do intestino delgado, as quais incluem alterações no comprimento e peso, além de modificações da mucosa (Sigleo, Jackson & Vahouny, 1984; Brown, Kelleher & Losowsky, 1979). Em relação ao benefício da FA na prevenção de uma variedade de doenças, sua associação com diabetes tem sido bem estabelecida (Kumar et al., 2002). Foi verificado que ocorre diminuição da absorção de glicose no intestino na presença de fibra, sendo tal efeito atribuído principalmente às fibras solúveis (Goswamy, Mani & Mani, 1985). Muitos estudos têm sido realizados usando o modelo animal com diabetes induzido pela estreptozotocina, para avaliar o mecanismo que a fibra alimentar exerce sobre esta doença (Leclère et al., 1994; Rodriguez-Moran, Guerrero-Romero & Lazcano-Burciaga, 1998).

Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo primordial comparar o efeito de dietas contendo fibra da polpa do quiabo (*Hibiscus esculentus*, L.) com outras fibras de efeito reconhecido. Para tal foi utilizada a celulose como controle negativo, devido sua capacidade de absorção de água, baixa solubilidade e sua resistência à hidrólise pelas enzimas digestivas dos ratos bem como à fermentação colônica. A inulina foi escolhida como controle positivo uma vez que é conhecida entre outras qualidades, por promover o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos no intestino. Foram utilizados como parâmetros de avaliação a atividade metabólica da microbiota intestinal, bem como os efeitos destas fibras sobre a morfologia intestinal. Posteriormente foi avaliado se a inclusão da farinha de quiabo na dieta poderia agir positivamente sobre o diabetes induzido pela estreptozotocina (STZ).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FIBRA ALIMENTAR – Definição e características físico-químicas

Fibra alimentar é um termo genérico utilizado para uma variedade de substâncias portadoras de propriedades e efeitos fisiológicos diferenciados, principalmente no trato gastrointestinal, incluindo alterações na dinâmica dos fluídos fisiológicos, na digestão das macromoléculas, na absorção dos diversos tipos de nutrientes (Kumar et al., 2002), firmando-se como componente essencial para alimentação, tanto humana como animal. As fibras derivam da família dos carboidratos estruturais, provenientes da parede celular de vegetais constituída por polissacarídeos: celulose, hemiceluloses, substâncias pécicas, hidrocolóides (gomas e mucilagens), amidos resistentes, oligossacarídeos resistentes e também pela lignina que é um componente da parede celular, mas não é carboidrato (Lajolo et al., 2001). A fibra não é metabolizada pelas enzimas do estômago e do intestino delgado e chega ao cólon sem degradar onde é fermentada pelas bactérias intestinais (Cherbut, 1995). Três décadas atrás, alguns pesquisadores já ofereciam hipóteses sobre a função da fibra alimentar (FA), pois resultados de estudos epidemiológicos relacionavam a prevalência de doenças crônicas como constipação, diverticulite e câncer do intestino grosso, à insuficiência de fibra na dieta (Schneeman, 1986).

Esta observação incentivou muitos pesquisadores a procurarem respostas para causa de doenças comuns, especialmente aquelas relacionadas ao intestino grosso. Historicamente, a ênfase dada pelos pesquisadores ao efeito da fibra estava concentrada em relação à quantidade e não ao tipo de fibra alimentar presente na dieta. Estudos *in vitro*, com animais e humanos, medindo o efeito agudo e de longo prazo no âmbito celular e no organismo como um todo, têm demonstrado que diferentes fontes de fibras podem exercer efeitos metabólicos e fisiológicos distintos, sendo que uma das maiores dificuldades de se trabalhar com fibra alimentar é que o termo fibra alimentar refere-se a uma grande variedade de compostos incluindo carboidratos purificados, semi-purificados, amidos resistentes ou componentes da parede celular, apresentando ausência de digestão por enzimas endógenas do trato gastrointestinal humano e fermentabilidade no intestino grosso,

exibindo propriedades que variam de acordo com sua fonte, refletidas no seu comportamento durante a passagem pelo trato digestivo (Guillon & Champ, 2000).

A capacidade de hidratação do material constituinte da parede celular é que determina, em parte, o comportamento da fibra alimentar no trato digestivo (fermentação) e que esclarece alguns de seus efeitos fisiológicos (bolo fecal minimamente fermentado pela fibra alimentar). Para verificar o potencial de hidratação da fibra, pode-se avaliar a capacidade de retenção de água, que é um fator importante na fabricação de alimentos suplementados com fibras. A absorção ou retenção de água está diretamente relacionada ao comportamento da fibra durante o trânsito intestinal (Robertson & Eastwood, 1980).

As fibras insolúveis (celulose e hemiceluloses) ligam-se à água em grau limitado, mas não formam gel resultando na formação de um bolo alimentar de baixa viscosidade. A lignina contribui para o aumento (volume e massa) das fezes (Brody, 1994). As fibras solúveis (pectinas, mucilagens, gomas) são altamente viscosas e fermentáveis, com grande capacidade de retenção de água, estas características proporcionam a formação de gel, resultando em maior viscosidade do conteúdo do intestino delgado e em retardo da absorção de certos nutrientes (Schneeman, 1986).

Classificada como fibra alimentar solúvel; a inulina pode ser incorporada a outros ingredientes da dieta; e oferecer vantagens como aumento do bolo fecal, produção de AGCC, diminuição do pH colônico e do tempo de trânsito intestinal (Roberfroid, 1993), além da restauração da microbiota intestinal, favorecendo o crescimento das bifidobactérias e redução dos microorganismos patogênicos (Gibson & Wang, 1994).

2.1.1. Inulina – Definição e atividade funcional

A inulina (Figura 1) é componente natural presente em aproximadamente 36.000 plantas utilizáveis como alimentos, sendo encontrada na forma de carboidratos de reserva de plantas como cebola, alho-poró, trigo, chicória, alcachofra e alho (Carpita, Kanabus &

Housley, 1989). É constituída por uma mistura de oligômeros e polímeros de frutose com estrutura que pode ser representada pela fórmula (GF_n) onde G = unidades glicosídicas, F = unidades frutosídicas e n = número de unidades frutosídicas ligadas ($n \geq 2$), sendo uma $\beta(2 \rightarrow 1)$ frutana (Phelps, 1965).

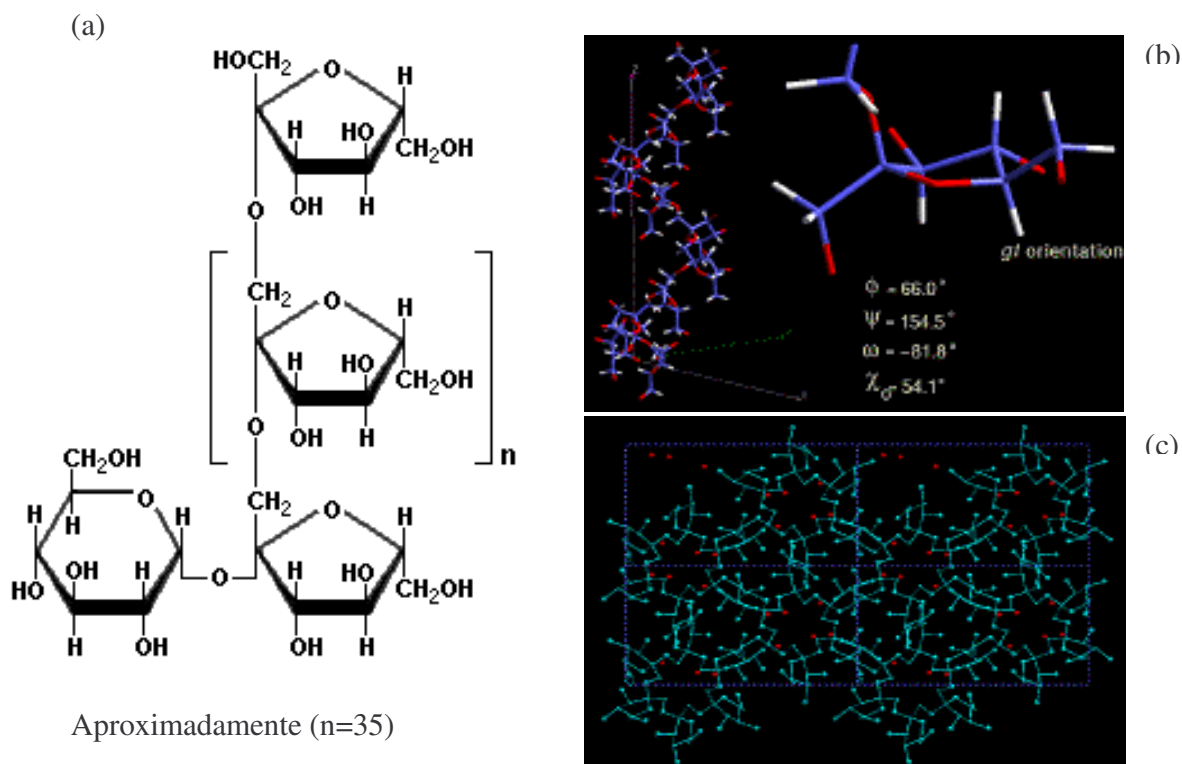


Figura 1. (a) Fórmula química da inulina; (b) Estrutura química da inulina; (c) Estrutura hidratada (4 unidades), os átomos de oxigênio das moléculas de água aparecem em vermelho.

A inulina disponível comercialmente (Raftiline®), é extraída utilizando tecnologias da indústria de açúcar e amido, no processo de extração (Figura 2), sua estrutura molecular é mantida. Inicialmente as raízes são lavadas, cortadas e extraídas em difusor. Esse processo resulta na formação de extrato rico em inulina. O precipitado purificado é seco e moído para obter pó fino (De Leenheer, 1994).

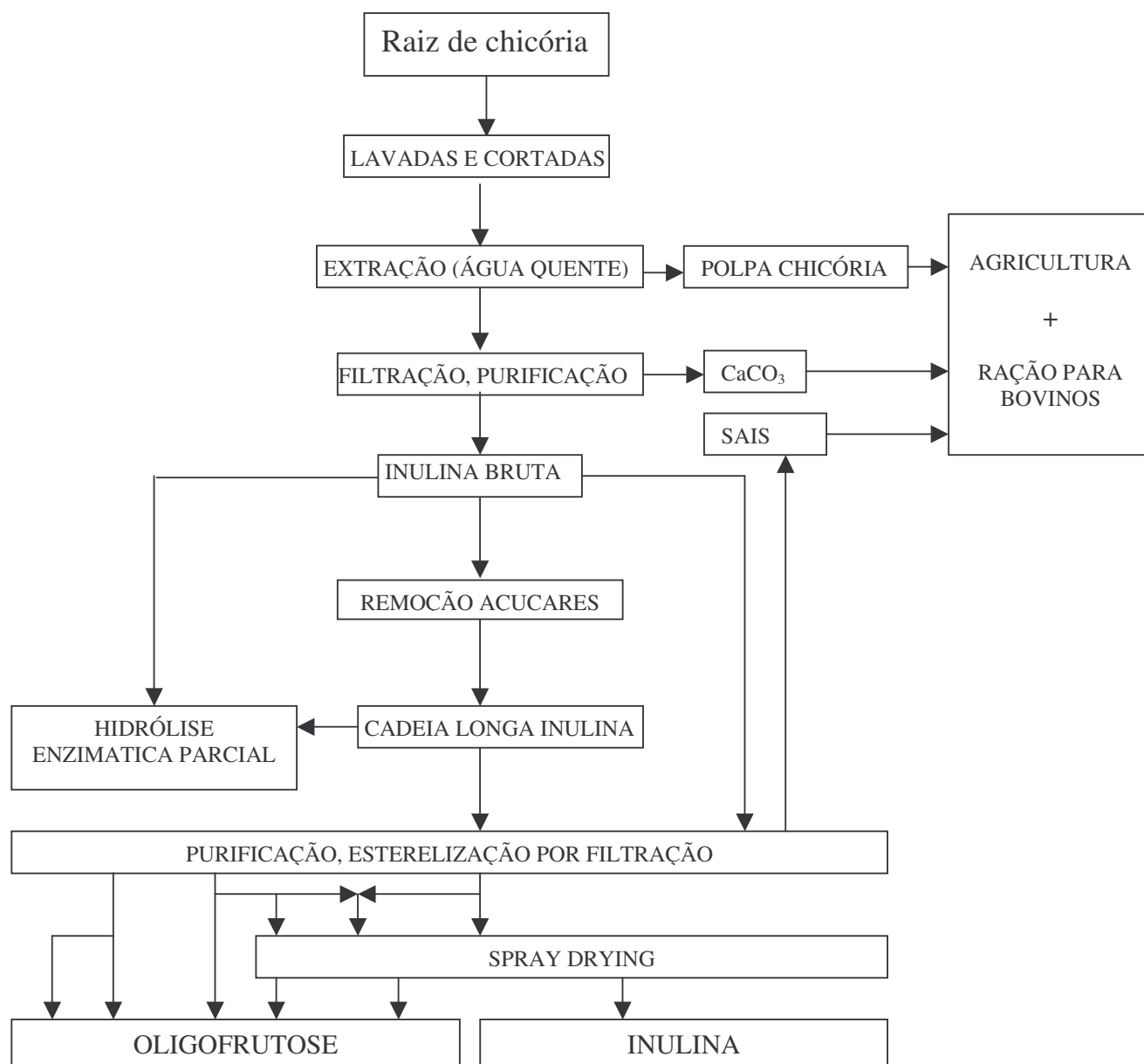


Figura 2. Fluxograma do processo para produção da inulina (Raftiline®).

Os frutooligosacarídeos (FOS) presentes na chicória (inulina), são considerados como ingredientes prebióticos devido ao seu efeito bifidogênico, é fermentado no cólon por

bactérias anaeróbicas simbióticas resistentes, sendo também substrato específico para as bifidobactérias (Jenkins, Kendall & Vuksan, 1999; Rao, 1999). O mecanismo pelo qual a bifidobactéria inibe o crescimento de outras bactérias não é ainda compreendido, mas segundo Roberfroid (1996), ela deve envolver a acidificação do meio devido à alta produção de ácidos orgânicos de cadeia curta e a secreção de peptídeos.

A inulina é utilizada como ingrediente alimentar; para melhorar as propriedades tecnológicas e nutricionais de alimentos industrializados (produtos concentrados do leite, enriquecimento do glúten do trigo, etc.), como substituto da gordura, carboidrato e/ou como agente promotor de crescimento para bifidobactérias e lactobacilos (Causey et al., 2000) exercendo impacto positivo no trato gastrointestinal.

2.1.2. Trato gastrointestinal e sua interação com o substrato disponível à fermentação

Pelo fato de oferecer os primeiros tecidos de contato bioquimicamente ativo entre o organismo humano e o alimento, os eventos ocorridos no sistema gastrointestinal (GI) possuem importância fundamental. O sistema é composto pela parte superior (boca, esôfago, estômago), a parte média (intestino delgado, pâncreas e trato biliar), e a parte baixa (cólon e reto). O preparo do sistema GI, mediante a hidratação, homogeneização e emulsificação, digestão, fermentação dos alimentos, absorção, recusa e excreção seletiva de nutrientes e não-nutrientes, ainda protege contra a agressão entérica (Krause & Mahan, 1996).

Os processos; digestivo e absorptivo devem ser vistos como uma função importante do sistema GI: pelo fato desses processos ocorrerem de forma sintonizada, o resultado é a dosagem correta dos nutrientes ao organismo. A liberação e transporte dos nutrientes são os resultados de centenas de milhares de anos de evolução e adaptação a uma ampla gama de alimentos disponíveis ao homem, sendo o sistema GI tolerante e flexível quanto ao tipo e composição de carga alimentar, sem desprezar, no entanto, a importância da capacidade

“tamponante”, especialmente do intestino baixo, às inadequações e alterações bruscas dos hábitos alimentares (Krause & Mahan, 1996).

O trato gastrintestinal (GI) do homem possui uma grande área superficial interna, de aproximadamente 300-400m². Como a média de consumo de alimentos é de 1,5-2,0kg por dia, com ingestão simultânea de organismos patogênicos, ocorre como resultado uma grande variedade de antígenos inofensivos ao sistema imune intestinal. O trato GI deve ser capaz de digerir e absorver componentes dos alimentos e nutrientes potencialmente benéficos para o organismo e, ao mesmo tempo, eliminar componentes com potencial de risco à saúde. A mucosa é normalmente colonizada pela microflora que regula a inflamação e a imunidade, sendo as células epiteliais substituídas a cada três a quatro dias. Um indivíduo saudável perde diariamente aproximadamente 330g de células da mucosa, e aproximadamente 55 milhões de células são renovadas a cada minuto. Desta maneira, a mucosa do trato gastrintestinal é considerada o único depósito para estocagem de elementos-chave para crescimento e regeneração (Bergmark, 1998).

A população microbiana que habita o intestino grosso faz parte de um sistema extremamente complexo. A microbiota, em contato direto com a mucosa, interage com o intestino humano influenciando o organismo quanto aos aspectos fisiológico, metabólico, anatômico, nutricional, imunológico e toxicológico (Berg, 1978).

Os componentes mais conhecidos que apresentam efeito funcional no sistema GI são os oligopeptídeos (principalmente os oriundos do leite), carboidratos não digeríveis (fibra dietética), probióticos e prebióticos. Os probióticos são classificados como microrganismos vivos benéficos ao balanço microbial intestinal, que afetam benéficamente a fisiologia do hospedeiro por meio da modulação da mucosa e imunidade sistêmica, além do melhoramento do equilíbrio nutricional e microbiano no trato gastrintestinal (Naidu et al., 1999). Os prebióticos são ingredientes não digeríveis presentes no alimento, que estimulam seletiva e positivamente o crescimento e/ou atividade de certas bactérias

presentes no cólon (Roberfroid, 1996), predominantemente os lactobacilos e bifidobactérias (Bielecka et al., 2002).

Os carboidratos de baixos e altos pesos moleculares presentes na fibra alimentar não são enzimaticamente digeridos no segmento central do intestino delgado dos mamíferos. Contudo, esses polímeros são degradados através de processos fermentativos por microorganismos de ocorrência natural no íleo e cólon (Vercellotti, Salyers & Wilkins, 1978). Ensaio realizado com animais monogástricos mostrou que os fatores que interferem na digestibilidade além da estrutura química dos componentes da fibra, são a microbiota do cólon, tempo de trânsito intestinal, característica do bolo alimentar que entra no cólon (Cummings, 1978), sendo todos os componentes fermentáveis no intestino grosso geralmente classificados como fibra alimentar.

Inúmeras bactérias são encontradas no intestino delgado dos animais monogástricos, incluindo gêneros como bacteróides, eubactéria, lactobacilos, estreptococos, entre outros. Muitos destes gêneros estão presentes no intestino de toda espécie de animal, e sua composição bacteriana (quantidade e proporção) varia dependendo da idade, estado fisiológico, localização no intestino, assim como a composição da dieta (Montagne, Pluskem & Hampson, 2003). As bactérias localizam-se no lúmen do trato gastrointestinal, na camada de muco e na superfície da mucosa. Considera-se que o muco e a mucosa associados à microbiota são subconjuntos da flora luminal, devido a fatores como excreção fecal, troca epitelial e movimentos peristálticos no trato gastrointestinal (Leser et al., 2002).

O conceito de “saúde intestinal” é complexo. Para Conway, Gorbach & Goldin (1987), existem três grandes componentes da saúde intestinal: mucosa, flora e dieta, (microbiota). A mucosa é composta pelo epitélio digestivo, os tecidos linfóides associados ao intestino e o muco que recobre e protege o epitélio. Os tecidos linfóides associados ao muco, às células epiteliais e às bactérias interagem em equilíbrio delicado e dinâmico,

assegurando uma função eficiente do sistema, como fonte de saúde, sendo que os alimentos, por sua vez, podem ser selecionados para favorecer essas condições no intestino.

Para a fibra insolúvel a porosidade e tamanho da partícula e a superfície disponível à bactéria são fatores determinantes e podem controlar a fermentação. Quando a acessibilidade não é limitante, outros parâmetros, como fatores estruturais dos polissacarídeos podem se tornar limitantes. A natureza do monômero, o tipo de ligação glicosídica, a presença e distribuição ao longo da cadeia de alguns grupos funcionais podem também modular a utilização dos monômeros pela bactéria. Alguns polissacarídeos extraídos das algas (alginatos e carragena) são pouco fermentáveis, enquanto que seus resíduos constituintes (monômeros, dímeros) são fermentados (Bobin-Dubigeon et al., 1997).

O tempo de trânsito certamente afeta o processo fermentativo, podendo também influenciar na quantidade e natureza do substrato disponível para fermentação. O trânsito intestinal acelerado diminui o pH, aumenta a quantidade dos substratos que alcançam o cólon, a saída das fezes e a excreção da biomassa fecal. Outros fatores como meio ambiente presente no cólon (pH, pressão de hidrogênio), a densidade e atividade da microbiota, também podem ter influência na utilização relativa dos diferentes carboidratos (El Oufir et al., 1996).

O mecanismo fisiológico de ação para diferentes componentes fibrosos na atividade motora gastrointestinal vem sendo muito estudado com a finalidade de estabelecer sua definição adequada. Entretanto, para alguns autores como Connel (1978), a aceleração do trânsito intestinal está relacionada aos componentes da fibra alimentar que possuem capacidade de hidratação, pois eles causam o aumento no volume do bolo alimentar, por sua vez, atribuído à diferença na resposta motora às características físicas e químicas dos componentes fibrosos. Lewis (1978) acredita que existe relação entre a granulometria das

partículas fibrosas e o volume do resíduo seco fecal, e considerou que a fibra de maior granulometria, possivelmente exerce maior influência no trânsito do bolo alimentar.

A natureza química e a estrutura da fibra alimentar são características importantes na determinação do seu comportamento na luz intestinal (López et al., 1997). A acessibilidade física das enzimas à matriz do polímero é o primeiro fator limitante, uma vez que muitas bactérias ganham acesso físico e se aderem à parede celular para digeri-la, enquanto que algumas bactérias podem liberar enzimas extracelulares nas proximidades e ativar a degradação das paredes. Supõe-se que as bactérias colônicas possuam grande espectro de atividade enzimática. O grau de atividade, em particular da atividade degradativa de polissacarídeos, pode ser induzido pela exposição do substrato, além de exibir utilização preferencial de certos substratos pela microbiota há evidências de existir repressão de síntese enzimática por produtos finais de reação. Portanto, a fermentação pode ser caracterizada pela faixa, extensão, número de sítios de fermentação e produtos da fermentação, sendo que os fatores de controle da fermentação estão relacionados ao substrato disponível, à microflora e sua atividade e ao hospedeiro (Guillon & Champ, 2000).

Uma propriedade extremamente importante das fibras alimentares é sua fermentabilidade pela microbiota intestinal, pela fermentação anaeróbica que ocorre no intestino humano, entre o ceco e cólon proximal (Pacheco & Sgarbieri, 2001). Esse processo resulta na formação de ácidos graxos de cadeia curta.

2.1.3. Microbiota, fermentação e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

A população de bactérias no ceco e no cólon humanos é numericamente expressiva, com pelo menos 10^{10} ou 10^{11} unidades formadoras de colônia (ufc) por grama de peso seco. Com massa de digesta estimada em 250-750g, o cálculo total da microbiota pode chegar a 10^{13} ufc. Mais de 50 gêneros e acima de 400 espécies de microrganismos têm sido identificados em fezes humanas (Gibson & Roberfroid, 1995; Hill, 1995).

Os microrganismos dominantes em termos de número são anaeróbios incluindo bacteróides, bifidobactéria, eubactéria, estreptococos e lactobacilos, enquanto que outros como enterobactérias, também podem ser encontrados em proporção reduzida. Geralmente os bacteróides (incluindo aqueles que utilizam polissacarídeos) são mais numerosos e podem compreender mais de 30% do total (Gibson & Roberfroid, 1995).

As fibras alimentares por servirem de substrato fermentativo são consideradas as maiores fontes de energia para as bactérias que habitam o cólon. O processo de fermentação culmina com a produção de AGCC: acético, propiônico e n-butírico; que exercem efeito na mucosa e na função colônica (McDougall et al., 1996; Kim, 1998), além de proporcionar substratos para a lipogênese, glucogênese e cetogênese, sendo que o butirato é a principal fonte para os colonócitos, por ser de fundamental importância para o crescimento e proliferação das células normais do epitélio colônico (Cambrodón & Martín-Carrón, 2001).

Fatores determinantes com relação à produção de AGCC pela fermentação bacteriana estão completamente elucidados. Alguns tipos de componentes fibrosos têm sido associados à maior produção de um tipo específico de ácido graxo de cadeia curta. O amido é geralmente associado com a grande proporção de ácido butírico, pectinas com grande quantidade de ácido acético, enquanto que arabinogalactana, galactomanana e o amido estão relacionados com grande proporção de ácido propiônico. O tipo de substrato fornecido à bactéria para fermentação pode prever o perfil de AGCC gerados, pois diferentes fibras são fermentadas em diferentes graus e produzem diferentes razões de AGCC (Guillon & Champ, 2000; Aprikin et al., 2003).

Os gases e ácidos orgânicos voláteis produzidos na fermentação intestinal da fibra alimentar pelas bactérias que habitam o cólon (Guillon & Champ, 2000), podem afetar o metabolismo microbiano; estes gases podem ser expelidos como flato ou pelo pulmão, após

absorção pelo epitélio (Cummings & Englyst, 1987). Estes gases e ácidos orgânicos voláteis produzidos são absorvidos e utilizados no metabolismo aeróbio do organismo humano, como fonte de energia suplementar, responsáveis por algumas respostas fisiológicas atribuídas às fibras (Schneeman, 1986). A microbiota pode metabolizar proteínas e produtos não-digeríveis de proteínas contendo compostos sulfurados, produtos da reação de Maillard e glicoproteínas endógenas e exógenas. Alguns organismos crescem com os produtos intermediários de fermentação como H_2 , lactato, succinato, formato, etanol e convertem estes a produtos finais, como AGCC. Outros organismos metabolizam CO_2 e CH_4 ou convertem CO_2 em acetato. A excreção do CH_4 pela respiração se reflete na atividade metanogênica do cólon (Pitt et al., 1980).

Os AGCC (acetato, butirato e propionato) atuam como fonte de energia para os colonócitos, estimulando o trofismo intestinal e a reabsorção de água e eletrólitos pelas células do intestino (Roediger & Moore, 1981; Roberfroid, 1993). Sendo a média de energia líquida para manutenção, por volta de 15-24% para suínos, nas fases de crescimento e acabamento (Dierickl, 1991; Yen et al., 1991; McBurney & Sauer, 1993), e de 5 a 10% para o homem (Nordgaard & Mortensen, 1995). Além disso, os AGCC também são capazes de inibir o crescimento de algumas bactérias patogênicas, tais como *Salmonella* e *Clostridium* (Hentges et al., 1992) em ratos, e as bactérias *Escherichia coli* e *Clostridium* em humanos (Roediger & Moore, 1981; Roberfroid, 1993) e também em porcos (May et al., 1994), os quais são microorganismos causadores de diarreia.

Os diferentes AGCC apresentam desempenhos individuais e específicos, sendo utilizados pelo organismo em diferentes rotas metabólicas. O acetato é transportado para o fígado e posteriormente serve como substrato energético nos tecidos do músculo. O propionato é convertido em glicose no fígado. Butirato é usado primeiramente pelo colonócitos e fornece energia adicional para suas atividades metabólicas (Roediger, 1982; Démigné & Rémésy, 1985), estimulando a proliferação das células epiteliais (Bugaut, 1987), e a motilidade intestinal (Cherbut, 2003).

Em humanos adultos, a produção individual dos AGCC no cólon é tão importante quanto a sua distribuição ao longo do intestino grosso. As fermentações ocorrem predominantemente no cólon proximal, sendo os AGCC posteriormente transportados para o cólon distal, metabolizados no fígado e no dos tecidos periféricos do organismo (Suzuki, Hara, 2004). Pacientes com colostomia apresentam declínio nos níveis de AGCC no intestino grosso. O cólon distal é o local com grande incidência de doenças orgânicas, sendo então a presença do butirato nesta região considerada de extrema importância (Topping & Clifton, 2001).

As características físicas da fibra têm sido relacionadas com a produção de AGCC, ou seja, quanto menor o tamanho da partícula, maior solubilidade, e conseqüentemente maior sua degradação e fermentabilidade, principalmente pelos lactobacilos e bifidobactérias (Roediger & Moore, 1981; Roberfroid, 1993), resultando em aumento da proliferação bacteriana no intestino grosso proximal onde a concentração de substrato é maior (Macfarlane, Gibson & Cummings, 1992), outras características físicas como a capacidade de retenção de água, alta viscosidade; podem diminuir a absorção de carboidratos e conseqüentemente reduzir a taxa glicêmica.

2.1.4. Efeito da fibra no índice glicêmico

A ingestão de fibras implica na redução da glicemia pós-prandial e, conseqüentemente, em menor secreção de insulina pelo pâncreas, contribuindo para o controle de glicemia em indivíduos diabéticos (Bourdon et al., 1999). Os polissacarídeos solúveis geralmente são fermentados com maior rapidez, reduzindo a necessidade de insulina exógena ou baixando o nível médio de glicose do sangue (De Leeuw Jongbloed & Verstegen, 2004; De Leeuw et al., 2005). Os alimentos com menor índice glicêmico são aqueles que possuem quantidade expressiva de parede celular resistente como o feijão, lentilha e a ervilha. Se o produto não for hidrolisado durante o tratamento industrial, como acontece com a aveia, sua forma íntegra pode afetar a resposta metabólica em conseqüência de uma alta viscosidade. Estas fibras são constituídas de monômeros neutros (glicose, para

β -glicanas e galactose e manose, para goma guar), incapazes de interagir quimicamente com moléculas endógenas e exógenas do metabolismo (Guillon & Champ, 2000).

Vários estudos demonstraram que a viscosidade pode interferir na absorção da glicose, via mecanismos como: esvaziamento gástrico lento, diminuição da acessibilidade da α -amilase ao substrato, baixa absorção da glicose produzida da hidrólise do amido, tanto devido à baixa difusão da glicose como pelo aumento da camada de água na superfície do intestino delgado. Muitos mecanismos que envolvem o efeito da fibra na resposta glicêmica já são compreendidos. Envolvem múltiplos mecanismos e dependem de fatores como a estrutura do alimento (integridade da parede celular em alimentos não-refinados) e das características intrínsecas da fibra, como a capacidade de aumentar a viscosidade da digesta (Leclère et al., 1994).

Alimentos ricos em fibra são recomendados para indivíduos diabéticos, os quais podem reduzir a resposta glicêmica para alimentos e conseqüentemente a necessidade de insulina. Muitos dados de índice glicêmico, na maior parte de alimentos amiláceos não refinados, exibem tais efeitos. Certamente neste tipo de alimento, estão incluídas as paredes celulares, se estas não forem quebradas durante o processamento da matéria-prima ou a mastigação. As fibras protegem estruturalmente as moléculas de amido, as quais estão presentes dentro das células vegetais, até o momento da ação dos ácidos e enzimas do estômago e/ou da atividade microbiana no intestino grosso (Guillon & Champ, 2000).

A fibra alimentar é considerada como um dos ingredientes que pode contribuir para a diminuição da hiperglicemia pós-prandial (Rodriguez-Moran, Guerrero-Romero, Lazcano-Burciaga, 1998), além de influenciar na redução da atividade metabólica da microbiota em vários parâmetros como: aumento da massa fecal, diminuição do tempo de trânsito intestinal, diluição da população bacteriana e no aumento da excreção de ácidos biliares (Gorbach & Goldin, 1992; Dongowski & Lorenz, 2003).

2.1.5. Ácidos biliares e o efeito da fibra alimentar no seu metabolismo

Os ácidos biliares são sintetizados pelos hepatócitos, a partir do colesterol (Figura 3), do qual adquirem seu núcleo esteróide. Os principais ácidos biliares sintetizados pelo fígado são denominados ácidos biliares primários. Esses são o ácido cólico (com 3 grupos hidroxila) e o ácido quenodesoxicólico (com 2 grupos hidroxila). As presenças dos grupos carboxila e hidroxila tornam os ácidos biliares muito mais solúveis na água do que no colesterol do qual são sintetizados (Berne & Levy, 2004).

As bactérias que colonizam normalmente o aparelho digestivo realizam a desidroxilação dos ácidos biliares para formar ácidos biliares secundários. Os principais ácidos secundários são os ácidos desoxicólico (proveniente da desidroxilação do ácido cólico) e o ácido litocólico (proveniente da desidroxilação do ácido quenodesoxicólico). Normalmente os ácidos biliares são conjugados com glicina e taurina. A glicina ou a taurina é ligada por ligação peptídica entre o grupo carbonila de um ácido biliar não-conjugado e o grupo amino da glicina ou taurina. No pH quase neutro do aparelho gastrointestinal, os ácidos biliares conjugados sofrem ionização mais completa e dessa forma, tornam-se mais hidrossolúveis do que os ácidos biliares não-conjugados. Os ácidos biliares conjugados estão presentes, quase que exclusivamente, como sais de vários cátions (principalmente Na^+) e são geralmente denominados sais biliares (Greenberger & Isselbacher, 1998).

Em termos químicos estritos, os ácidos biliares constituem os grupos de ácidos esteroidais. Na sua maioria apresentam-se estruturalmente na forma de anel esteroidal, geralmente saturados contendo 24 carbonos, com cadeia lateral apresentando um grupo carboxila. São os maiores produtos catabólicos do colesterol, facilitando a excreção dos lipídeos, incluindo colesterol. Devido à sua ação detergente, estes metabólitos atuam na absorção dos lipídeos de origem alimentar, incluindo vitaminas lipossolúveis, sendo que a propriedade detergente dos ácidos biliares resulta de uma única estrutura com esqueleto

esterol não-polar, grupos carboxila polares e grupos hidroxila α -orientados (Batta & Salen, 1999).

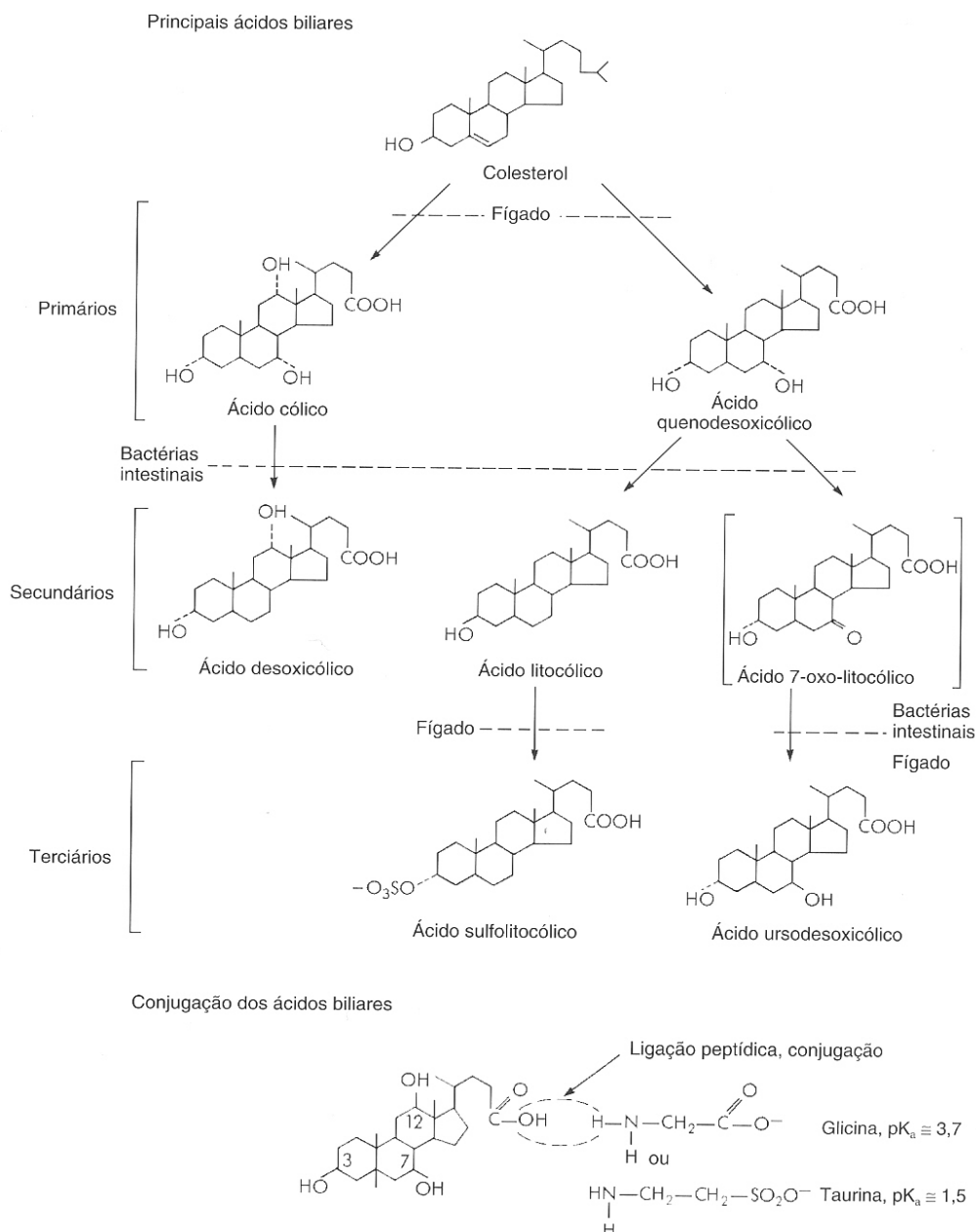


Figura 3. Estruturas e locais de conversão dos principais ácidos biliares primários, secundários e terciários, na bile humana. Na parte inferior da figura é ilustrada a conjugação do ácido cólico com glicina ou taurina (Berne & Levy, 2004).

Os grupos polares são solvatados com moléculas de água enquanto a parte não-polar forma emulsão lipídica. Este efeito detergente é aumentado pela conjugação hepática dos ácidos biliares com a glicina e a taurina antes de serem secretados para a bile. Os ácidos biliares conjugados formam micelas com os fosfolipídios e solubilizam o colesterol dentro da bile (Batta & Salen, 1999).

Os ácidos biliares têm muitas funções fisiológicas, incluindo homeostase do colesterol, absorção de lipídeos e geração de fluxo biliar, que ajuda a excreção e recirculação de drogas, vitaminas e toxinas de origem endógena e exógena (Vlahcevic, Pandak & Stravitz, 1999).

São efetivamente reabsorvidos e transportados de volta para o fígado via sistema portal, por absorção e re-secreção dentro da bile, durante a circulação enteroepática. No intestino, os ácidos biliares primários, como ácido cólico e quenodesoxicólico, que não são reabsorvidos no íleo (aproximadamente 5%), seguem para o cólon. Neste local os ácidos primários estão sujeitos a serem desconjugados e desidroxilados pelas bactérias intestinais, para formar ácidos biliares secundários (ácido desoxicólico e litocólico) (Batta & Salen, 1999).

Existem evidências circunstanciais sugerindo que os ácidos biliares secundários, em particular o ácido biliar 7 α -desidroxilado e o ácido desoxicólico agem como co-carcinógenos no câncer de cólon. Sendo assim, tem sido relatado um aumento de ácido desoxicólico no soro de pacientes com câncer de cólon (Mudd et al., 1980).

A capacidade das fibras de absorver ácidos biliares; leva a uma dupla perda de colesterol. A absorção intestinal de colesterol depende da disponibilidade de sais biliares e fosfolipídeos para a formação de micelas. Se os níveis de ácidos biliares estão reduzidos, o resultado seria a conseqüente queda na formação de micelas (Story, 1981).

Em sujeitos saudáveis, somente pequenas quantidades de ácidos biliares são encontradas na circulação periférica e urina. Na ocorrência de doenças hepatobiliares e intestinais, podem se apresentar distúrbios de síntese, metabolismo e remoção dos ácidos pelo fígado. Adicionalmente, em tais circunstâncias podem concorrer distúrbios absorptivos do intestino que poderão afetar a concentração e o perfil dos ácidos biliares no soro sanguíneo, fígado, vesícula biliar, urina e fezes. A análise dos ácidos biliares pode ser útil na avaliação das funções intestinais, nos diagnósticos de doenças correlatas, como coletais e câncer de cólon e fígado, e ainda para monitorar as terapias de tais doenças (Yousef & Tuchweber, 1997; Ochsenkuhn et al., 1999; De Kok et al., 1999; Monte et al., 2000; Batta & Salen, 1999).

As fibras se ligam aos sais biliares no intestino, diminuindo sua reabsorção, o que resulta em menos colesterol disponível no fígado para a síntese de lipoproteínas. As fibras solúveis são quase completamente fermentadas no cólon, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, os quais podem inibir a síntese hepática de colesterol e incrementar a depuração de LDL. Este efeito pode ser atribuído a absorção de ácidos biliares, após sua desconjugação pelas bactérias intestinais, sendo excretado pelas fezes (Glore, Treeck & Knehans, 1994), na sua melhor forma catabólica (Bata & Salen, 1999) diminuindo o pool de ácidos biliares no ciclo entero-hepático. Entretanto, os ácidos biliares são altamente complexos, principalmente em função do intensivo ataque bacteriano durante o trânsito intestinal (Eneroth et al., 1966; Tohma et al., 1986).

De modo geral, não havendo reciclagem dos ácidos biliares no tubo digestivo, o organismo mobiliza o colesterol para formar novos ácidos biliares, indispensáveis no metabolismo dos lipídeos; resultando na diminuição da taxa de colesterol sérico. O quiabo contém um tipo de carboidrato complexo (pectina); sendo que a pectina dissolvida em água tem a capacidade de formar uma massa gelatinosa, viscosa que absorve os ácidos biliares no tubo digestivo, eliminando-os com as fezes.

2.2. Quiabo (*Hibiscus esculentus* L.) – Definição e propriedades

O quiabo é uma planta de ciclo anual da família das Malváceas, originário da Etiópia (África oriental) típica de clima tropical (Macrae, Robinson & Sadler, 1993). Hoje a planta já é cultivada em área subtropical e tropical, particularmente na parte sul dos Estados Unidos, Índia, e oeste da África central (Oyelade, Ade-Omowaye & Adeomi, 2003). A planta também é conhecida como gumbo na África, bhindi na Índia e okra nos EUA (Ndjouenkeu et al., 1996). O caule, semilenhoso e ereto pode atingir 3 metros de altura, com flores hermafroditas, onde a autopolinização é mais freqüente que a polinização cruzada. Os frutos são alongados tipo cápsula de ponta afilada, com muitas sementes e com coloração externa verde escura (Macrae, Robinson & Sadler, 1993). O controle da plantação com herbicida deve ser controlada, pois se houver contaminação do solo, comprometerá a qualidade nutricional do quiabo (Aladesanwa, 2005).

No Brasil, seu uso permaneceu restrito aos negros até a colonização das regiões das minas, onde eles trabalhavam como escravos, quando finalmente foi incorporada à dieta dos portugueses e mestiços. Com isso, Minas Gerais é até hoje o grande produtor e consumidor de quiabo no Brasil. As temperaturas ideais para o cultivo do quiabo estão entre 22 e 25°C. A colheita é prolongada por alguns meses. No país, a produtividade normal é de 15.000 a 22.000 kg/ha, sendo que no inverno esta produtividade diminui, pois o quiabeiro é prejudicado pelo frio (Ruralnews, 2001).

O fruto imaturo também tem sido usado na medicina popular como diurético (Ndjouenkeu et al., 1996), apresentando qualidades medicinais e terapêuticas reconhecidas, como o efeito laxante. Às sementes, são atribuídos benefícios como estimulante estomacal e anti-espasmódico (Anon, 2003). O chá feito com suas folhas, também é utilizado para o tratamento de bronquites e problemas pulmonares, em geral. Seu valor energético é de cerca de 36kcal/100g. Em sua composição, encontram-se presentes proteínas, lipídeos, carboidratos, as vitaminas A, B1, B2, C, ácido nicotínico, os minerais, cálcio, ferro,

magnésio, fósforo, sódio, potássio e uma boa quantidade de fibras não digeríveis (Ruralnews, 2001).

A mucilagem presente no quiabo é um polissacarídeo ácido associado a proteína e mineral; sua hidrólise revelou que este polissacarídeo é composto por ácido galacturônico, galactose, ramanose e glicose (Woolfe, Chaplin & Otchere, 1977), assim como a pectina que é um polímero de ácido galacturônico, com cadeias laterais contendo açúcares como glicose, galactose e ramanose e grupos metoxi (-OCH₃), o qual é metabolizado pela microflora intestinal gerando gás metano (Brody, 1996). Este polissacarídeo está sendo utilizado em tratamento de doenças de pele (Deters, Lengsfeld & Hensel, 2005) e adesão da bactéria *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica humana (Lengsfeld et al., 2004).

O quiabo pode ser usado fresco ou desidratado; em forma de pó possui propriedades antioxidantes que podem ser utilizadas para estabilizar a banha e o óleo de soja. Às substâncias mucilaginosas têm sido atribuídas propriedades emulsificantes, sendo ainda empregadas em sobremesas cremosas e queijos. Também têm sido usadas na inibição do crescimento de cristais de sacarose e como excelente fonte de potássio e provitamina A (Macrae, Robinson & Sadler, 1993).

Algumas propriedades físico-químicas dos polissacarídeos isolados da mucilagem do quiabo, como as características reológicas, já foram estudadas (Woolfe, Chaplin & Otchere, 1977; Ndjouenkeu et al., 1996). Sendo que dentro das propriedades funcionais da mucilagem do quiabo estão a capacidade espumante e geleificante (Bhat & Tharanathan, 1987).

Na literatura não há registro de estudo do quiabo como fonte de fibra alimentar e conseqüentemente sua atividade fisiológica e agente prebiótico para aumento da população de microorganismo probiótico no intestino de humanos e animais.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Utilizar a mucilagem do quiabo (*Hibiscus esculentus* L.) como complemento de meio de cultura para bactérias probióticas, para verificar se há promoção de crescimento de lactobacilos e bifidobactérias, Posteriormente avaliar, de forma comparativa com a inulina, o efeito fisiológico que a fibra alimentar da farinha de polpa do quiabo exerce no metabolismo de ratos wistar normais e diabéticos.

3.2. Específicos

- 1) Obter e caracterizar quimicamente a mucilagem e a farinha da polpa do quiabo.
- 2) Efetuar ensaio *in vitro* para verificar o efeito bifidogênico da mucilagem.
- 3) Realizar ensaio *in vivo* com ratos wistar, para estudar o efeito da farinha do quiabo:
 - a) No trânsito intestinal, na flora e na morfologia intestinal;
 - b) Na produção de AGCC e lactato, cecal e colônico;
 - c) Nos níveis de ácidos biliares fecais.
- 3.1) Induzir o diabetes nos ratos wistar com estreptozotocina e verificar:
 - a) A possível existência de propriedades protetoras das fibras da farinha do quiabo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima

Quiabos frescos (70 kg de *Hibiscus esculentus* L.) foram adquiridos em varejão de Campinas, SP. A inulina (Raftiline®HP-Gel) foi cedida pela Clariant S.A. (São Paulo, Brasil).

4.2. Métodos

4.2.1. Método de preparação da polpa

Os frutos foram lavados, secos manualmente e suas sementes retiradas. Massas conhecidas de polpa foram processadas em tacho encamisado (FH038) em água a 90°C/4 minutos e resfriadas em túnel de congelamento (FH045) durante 60 min. Depois de congeladas foram mantidas em câmara fria (KFB-200) até o momento da liofilização (liofilizador-Stokes). O material liofilizado foi moído (moinho-TE-631/1) e posteriormente peneirado para obter farinha com granulometria de 60mesh.

4.2.2. Método de extração da mucilagem da polpa

O volume de 1000mL de água destilada foi adicionado em 50 g de quiabo liofilizado, agitado (Contrac-Mod.1000) durante 5 minutos e centrifugada (4.068xg/10 min.). A solução viscosa foi decantada, e no resíduo adicionados 250mL de água por mais quatro vezes, subsequente e centrifugado e os sobrenadantes obtidos em todas as etapas foram liofilizado.

4.2.3. Caracterização química da mucilagem de quiabo: umidade, cinzas, proteína bruta (AOAC, 2000), açúcares totais (Lane & Eynon, 1934), lipídeos (Bligh & Dyer, 1959).

4.2.4. Caracterização química da farinha de quiabo: umidade, cinzas, proteína bruta, fibra alimentar total, solúvel e insolúvel (AOAC, 2000), lipídeos (Bligh & Dyer, 1959).

4.2.5. Determinação de aminoácidos na mucilagem e polpa do quiabo: Feita mediante hidrólise ácida, em HPLC utilizando coluna de troca catiônica e os aminoácidos quantificados após derivatização pós-coluna com ninidrina, usando-se como referência solução padrão de aminoácidos de Pierce (Spackman, Stein & Moore, 1958). O triptofano foi determinado pelo método de Spies (1967). As análises foram realizadas em triplicata.

4.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Para avaliação das propriedades biológicas do quiabo foram realizados testes preliminares de cultura em tubos para crescimento de bactérias lácteas. Posteriormente foram realizados ensaios com ratos para avaliar alguns parâmetros do trato gastrointestinal e resposta glicêmica.

4.3.1. Ensaio *in vitro* com cultura de bactérias

Culturas liofilizadas de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium lactis* Bb-12, foram cedidas pela Chr Hansen (Valinhos, Brasil). Para re-hidratação das culturas foi adicionado 0,04g de cultura liofilizada em 100 mL de meio MRS (De Man, Rogosa, Sharpe, 1960) para La-5 e de meio MRS-modificado para Bb-12. Desta suspensão foram retiradas alíquotas e congeladas em biofreezer a -70°C . A quantidade de inóculo utilizado foi de 2% (v/v).

4.3.2. Protocolo experimental

Como controle do crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La-5, utilizou-se o meio formulado MRS e para a cultura de *Bifidobacterium lactis* Bb-12, utilizou-se como controle de crescimento, o MRS-modificado (MRSm); este meio foi enriquecido com L-cisteína (Sykes & Skinner, 1973). A solução de cisteína-HCl com concentração final para o meio de 0,05g/100mL, foi esterilizada em sistema de filtro (Corning®) em membrana com porosidade de 0,22 μm , antes de ser adicionada ao caldo MRS previamente autoclavado (121 $^{\circ}\text{C}$ /15 min.). Para os ensaios denominados 1, 2 e 3 (Tabela 1) a glicose do meio foi substituída pela mucilagem do quiabo.

Na formulação dos meios MRS e MRS-m, o pH foi ajustado para 5,5 para La-5 e em 6,5 para Bb-12, em seguida autoclavados a 121°C durante 15 minutos juntamente com a solução de 0,5; 1,0; e 2,0% de mucilagem. Os meios foram distribuídos em tubos com volume de 30 mL, inoculados 2% (v/v) com as culturas probióticas e incubados por 8 horas a 37°C. Após o período de incubação os tubos foram agitados e as leituras foram efetuadas no espectrofotômetro em comprimento de onda de 630nm.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados no estudo.

Composição	Controle	Ensaio-1	Ensaio-2	Ensaio-3
	(%)	(%)	(%)	(%)
Peptona	1,00	1,00	1,00	1,00
Extrato de carne	0,80	0,80	0,80	0,80
Extrato de levedura	0,40	0,40	0,40	0,40
Glicose	2,00	-	-	-
Mucilagem de quiabo	-	0,50	1,00	2,00
Sorbitano monooleato	0,10	0,10	0,10	0,10
Fosfato dipotássio	0,20	0,20	0,20	0,20
Acetato de sódio.3H₂O	0,50	0,50	0,50	0,50
Citrato de amônia	0,20	0,20	0,20	0,20
Sulfato de magnésio.7H₂O	0,02	0,02	0,02	0,02
Sulfato de manganês.4H₂O	0,005	0,005	0,005	0,005

Fonte: De Man, Rogosa, Sharpe, (1960).

4.3.3. Medidas de intensidade de crescimento

O crescimento de *Bifidobacterium Lactis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5 foi monitorado turbidimetricamente por medidas de densidade óptica a 620 nm (Pacher & Kneifel, 1996) em espectrofotômetro (modelo B390 Micronal). As leituras das absorbâncias dos tratamentos foram convertidas em porcentagem, assumindo-se como 100% a leitura de absorbância do controle.

4.4. Ensaio *in vivo* com ratos Wistar

4.4.1. Preparo das dietas experimentais: Na tabela 2, encontram-se os valores referentes aos ingredientes utilizados na preparação das dietas utilizadas nos ensaios biológicos. As dietas foram preparadas de acordo com as recomendações da AIN-93 G (Reeves et al., 1993).

Tabela 2. Composição das dietas utilizadas no estudo.

Ingredientes	DIETAS		
	Celulose (g/kg dieta)	Inulina (g/kg dieta)	Farinha quiabo (g/kg dieta)
Caseína (82% de proteína)	207,00	207,00	181,13
Amido milho (87,6%)	397,49	397,49	356,89
Amido dextrinizado	132,00	132,00	132,00
Sacarose (99,5%)	100,00	100,00	100,00
Óleo soja	70,00	70,00	66,00
Celulose	50,00	-	-
Inulina	-	50,00	-
Farinha de quiabo	-	-	152,53
AIN-93 mix mineral	35,00	35,00	35,00
AIN-93 mix vitaminas	10,00	10,00	10,00
L-cistina	3,00	3,00	3,00
Bitartarato de colina	2,50	2,50	2,50
Tetrabutylhidroquinona	0,0014	0,0014	0,0014

AIN-93 G (Reeves et al., 1993)

4.4.2. Protocolo experimental

Foram utilizados 117 ratos machos linhagem *wistar* recém-desmamados (60-70 g), livres de patógenos específicos (SPF), provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP. Os ensaios transcorreram no Laboratório de Ensaio Biológico (LEB) do

Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN) na Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA).

Os 72 ratos utilizados para o estudo de contagem de crescimento bacteriano no intestino, análises morfológicas da mucosa intestinal, e para determinação de lactato e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no ceco e cólon, foram divididos em três grupos com 21 animais e classificados como grupos: CC: controle celulose, CI: controle inulina e EQ: experimental quiabo (fibra proveniente da farinha de polpa quiabo), e 9 ratos recém desmamados foram utilizados como referência (RD). Os outros 45 ratos foram destinados ao ensaio com indução de diabetes.

Os animais foram alojados em gaiolas de crescimento individual, a temperatura controlada entre 20 e 21°C e com umidade relativa entre 40 e 60% e 12 horas ciclo claro/escuro, início da luz às 6 horas. O tempo total do experimento teve duração de quatro semanas. O esquema utilizado no ensaio experimental encontra-se no fluxograma apresentado na Figura 4.

O procedimento envolvendo os animais foi conduzido conforme a Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) da Unicamp (protocolo nº 385-1). Durante todo o período experimental os animais foram pesados periodicamente. Determinadas a ingestão alimentar, hídrica e excreção fecal. Durante os últimos cinco dias do período experimental, amostras fecais frescas foram coletadas e estocadas a -20°C, para determinação da concentração de água nas fezes e conseqüentemente o peso seco.

4.4.2.1. Trânsito intestinal

Para visualizar a propulsão intestinal, foi administrada através de gavagem 0,1mL de solução de Evans-blue (50mg/mL de solução salina). O tempo de trânsito intestinal total foi determinado pelo tempo transcorrido entre a ingestão do corante e seu primeiro aparecimento nas fezes (Vahouny et al., 1980; Tanila, Kauppila & Taira, 1993)

4.4.2.2. Densidade Fecal

No 20º e 21º dia, imediatamente após defecação, as fezes frescas coletadas de cada rato foram reunidas por grupo, pesadas e colocadas em proveta contendo 10 mL de solução salina 0,09% (p/v). Em seguida foi medido o deslocamento do volume para cálculo de densidade da excreta úmida.

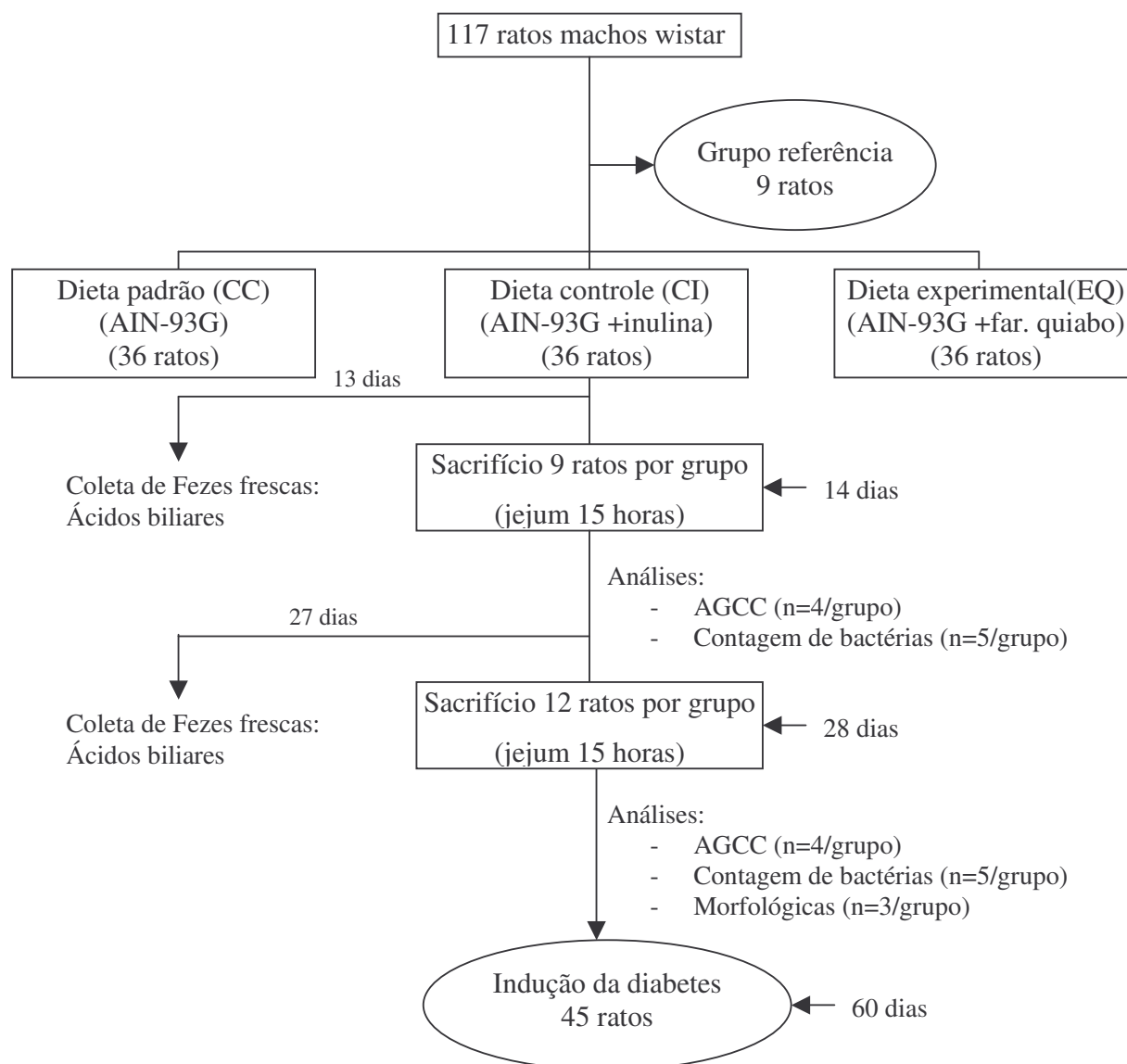


Figura 4. Fluxograma do protocolo experimental utilizado para o ensaio *in vivo*.

4.4.2.3. Final do período experimental

Nos 14º e 28º dia, os animais permaneceram em jejum durante 15 horas, subseqüentemente anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol; 5,0 mg/100g de massa corpórea), coletando-se o sangue através de punção cardíaca. Após laparotomia, 15 cecos (5/grupo), foram extraídos e imediatamente armazenados em jarra de anaerobiose para contagem microbiológica. Outros 12 cecos (4/grupo), juntamente com os respectivos cólons, foram imediatamente pesados para determinar a massa total. Os conteúdos cecal e colônico foram coletados e imediatamente processados para análise de AGCC. O conteúdo fecal foi considerado o material (peletes) que se encontrava presente no cólon.

4.4.2.4. Medidas intestinais

O intestino delgado e o cólon foram medidos na posição vertical, sendo que em sua extremidade inferior foi colocado um peso padronizado em 10 gramas (Qu et al., 1996), para evitar contração do tecido.

4.5. Contagem e classificação da microflora intestinal

A coleta do conteúdo cecal foi realizada utilizando-se pinças e tesouras estéreis. O material foi recolhido em placas de petri estéreis e encaminhado imediatamente ao laboratório de microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Para transporte das amostras foram utilizadas jarras de anaerobiose contendo o kit Anaerobac (Probac do Brasil) para garantir atmosfera anaeróbica. Alíquota de 1,0g de conteúdo cecal foi pesada e transferida assepticamente, com espátula estéril, para um tubo de ensaio contendo 9,0mL de diluente, conforme metodologia de Tanaka & Mutai (1980). Foram realizadas em seguida as diluições decimais necessárias e o plaqueamento em superfície (0,1mL) nos meios específicos para cada microrganismo, conforme descrito a seguir:

Para contagem de bifidobactérias - *Bifidobacterium* Medium 25 (BIM-25; Munoa & Pares, 1988), procedeu-se à incubação a 37°C/72h em jarra anaeróbia (sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbia; GasPak Anaerobic System BBL 70304, Gas Generating

Kit Oxoid BR 38, Anaerocult A MERCK 13829). Para os lactobacilos utilizou o LBS Agar (Rogosa SL Agar; BBL 11327, DIFCO 0480, MERCK 5413, OXOID CM 627) (Yoshioka, Iseki & Fujita, 1983), com incubação a 37°C/48h. Para contagem de anaeróbios totais, utilizou-se o meio de Viande & Levures modificado com 0,2% Glucose (MVL-G; Tanaka & Mutai, 1980) e incubado a 37°C/48h. Para as enterobactérias utilizou-se o Deoxycholate Hydrogen Sulfide Lactose (DHL): Agar (MERCK 11435; Yoshioka, Iseki & Fujita, 1983), incubação a 37°C/24h. Finalmente para os enterococos o meio utilizado foi o KF Streptococcus Agar (DIFCO 0496, MERCK 10707, BBL 11313, OXOID CM 701) (Yoshioka, Iseki & Fujita, 1983) e incubação a 37°C/48h.

4.6. Estudo morfológico

No final do período experimental de 4 semanas os animais designados para o estudo morfológico foram mantidos em jejum durante 15 horas e subsequentemente anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol; 5,0mg/100g de massa corpórea). Após laparotomia, fragmentos de 2,5 cm do íleo e cólon foram seccionados no plano transversal, fixados em formalina 10% tamponada com 0,1M e pH 7,4 durante 24 horas à temperatura ambiente. Após este período os tecidos foram cortados em anéis (obtendo-se três unidades de 0,5 cm de cada segmento) e lavados em água corrente e tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e posteriormente desidratados com etanol a 70, 80, 95 e 100%, permanecendo em cada álcool durante 30 min. A segunda etapa consistiu na diafanização do álcool 100% + xilol 100% por 30 minutos. Subsequentemente, cada preparação foi deixada 2 vezes em xilol/15 min., xilol + parafina/30 min., e finalmente em parafina/60 min. Nestas duas últimas etapas envolvendo parafina, a temperatura foi de 56°C, sendo o tecido imerso em parafina na posição vertical. Cada bloco gerou 4 lâminas, com 3 cortes de 6µm, espaçados entre si por distâncias de 100µm, e gerando o total de 36 cortes para cada animal. Somente 3 lâminas de cada conjunto foram coradas pelo sistema hematoxilina-eosina (Bancroft & Stevens, 1982).

O exame dos preparados histológicos foi realizado com a finalidade de medir a altura das vilosidades do íleo e cólon. Para tanto, utilizou-se o sistema de análise de

imagem computadorizada em fotomicroscópio (NIKON ECLIPSE E800). Em cada corte histológico foram definidos três campos para serem medidos com emprego de objetiva de 10x para o íleo e 2x para o cólon, gerando ao final, 81 medidas para cada grupo. Através deste método, cujo plano de corte favoreceu a observação de toda a estrutura das vilosidades da base ao ápice, os campos escolhidos foram projetados na tela do computador e as medidas feitas por programa específico (IMAGE-Pro Plus 2001), capturada em alta resolução (cool SNAP-Pro color An Integrated solution). As análises morfológicas das vilosidades do íleo e cólon foram realizadas no Laboratório de Histologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

4.7. Determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e lactato no ceco e cólon

Os AGCC e lactato nos conteúdos cecal e fecal foram identificados e quantificados simultaneamente por CLAE (cromatógrafo VARIAN, modelo 9012; detector UV modelo: 9050) no comprimento de onda 210nm, utilizando coluna Varian Micropak de troca catiônica (300 x 6,5mm, nº11418926). O volume de amostra injetado foi de 20µL. Utilizou-se como fase móvel ácido sulfúrico 2,5mM, temperatura ambiente, com fluxo de 0,4mL/min., (Canale, Valente & Ciotti, 1984; Guerrant, Lambert & Moss, 1982). Os ácidos orgânicos foram quantitativamente identificados pela comparação dos tempos de retenção e das áreas dos picos da amostra, com os padrões.

4.8. Quantificação de ácidos biliares fecais

Foram pesados 10-15mg de fezes liofilizadas, adicionado o padrão interno (ácido 5β-colânico, 5µg) e 200µL de n-butanol seguido por 50µL de ácido clorídrico e aquecido a 60°C/4horas. No produto resultante da reação de esterificação, foram adicionados 100µL da mistura hexametildisilazano:trimetilclorosilano:piridina, na proporção de 3:1:9. No trimetilsilil (TMS) formado foram adicionados 100 µL de hexano, seguidos de centrifugação (3000x g/5 min.) para separar os fragmentos fecais. Foram retirados 2µL da fração hexano (sobrenadante) e injetados em cromatógrafo gasoso (VARIAN, modelo 9012; detector de ionização de chama, FID-modelo 9050; coluna com fase LM-1, SE-30,

30m, di:0,32mm e filme de 0,5 μ m; gás carreador: H₂). O cromatógrafo gasoso operou nas seguintes condições: injetor e detector, nas temperaturas de 260-290°C, respectivamente. Após injeção, a temperatura foi mantida a 100°C por 2 min. A programação foi na faixa de 35°C/min, para uma temperatura final de 278°C (Batta et al., 1997, 1999).

4.9. Indução do diabetes utilizando estreptozotocina (STZ)

Ao final de dois meses alimentados com dietas experimentais (Figura 5) os 45 ratos permaneceram em jejum de 15 horas, subsequentemente foram pesados para calcular a dose de droga baseada na massa corpórea. O diabetes foi induzido (Riva et al., 1998) em 10 animais de cada grupo, utilizando a estreptozotocina (60mg kg⁻¹, i.p.) em 50 mmol/L de tampão citrato de sódio, pH 4,5; os 5 animais restantes de cada grupo receberam citrato de sódio, pH 4,5 na mesma proporção. Meia hora depois de iniciado o procedimento, a dieta foi oferecida aos animais. Após 24 e 48 horas, verificou-se a incidência de diabetes nos animais, utilizando tiras teste para pesquisa de glicose na urina (GLUKOTEST-ROCHE).

Após a indução do diabetes foram descartados os animais que morreram durante o procedimento, e o restante foi dividido em seis grupos denominados de: CCN: controle celulose normal (n=5), CCD: controle celulose diabético (n=5), CIN: controle inulina normal (n=5), CID: controle inulina diabético (n=6), EQN: experimental quiabo normal (n=5) EQD: experimental quiabo diabético (n=6). Os grupos foram constituídos por animais de peso médio semelhante, individualmente alojado em gaiolas metabólicas. A temperatura ambiente foi controlada entre 20 e 21°C, umidade relativa entre 40 e 60% e ciclos 12 horas claro/escuro, iniciando a luz às 6 horas. Os animais permaneceram quatro semanas, sendo alimentados com as dietas experimentais.

4.9.1. Parâmetro ponderal, coletas de amostras de sangue e urina

Os animais foram pesados a cada dois dias e diariamente se controlou a ingestão de alimentos e água. A urina foi coletada sob camada de tolueno e seu volume verificado todos

os dias. O sangue caudal foi coletado semanalmente para determinação da glicose sangüínea e para testes de tolerância a glicose.

4.9.2. Teste de tolerância à glicose (TTG)

O teste de tolerância à glicose (TTG) (Mello & Luciano, 1995) indica a capacidade do organismo em utilizar uma quantidade específica de glicose, calculada em razão (g/kg de massa corpórea) (Krause & Mahan, 1996). A taxa de glicose sangüínea foi medida antes e após 30, 60 e 120 minutos da ingestão da solução de glicose, através de uma pequena incisão na cauda, sendo que a gota de sangue foi imediatamente colocada sobre a área específica da tira teste, a qual foi posteriormente inserida no aparelho apropriado (PRECISION Q.I.D-MediSense) e o resultado lido após 20 segundos.

O TTG foi realizado nos ratos uma semana antes da indução do diabetes e no 7º, 14º e 21º dia após a indução (Figura 5). Os animais permaneceram em jejum durante 15 horas antes do TTG, pesados e subseqüentemente divididos em doze grupos, sendo seis grupos normais denominados: **CCNS**: controle celulose normal sem fibra; **CCNF**: controle celulose normal com fibra; **CINS**: controle inulina normal sem fibra; **CINF** : controle inulina normal com fibra; **EQNS** :experimental quiabo normal sem fibra; **EQNF** :experimental quiabo normal com fibra e seis grupos com animais diabéticos denominados: **CCDS**: controle celulose diabético sem fibra; **CCDF**: controle celulose diabético com fibra; **CIDS**: controle inulina diabético sem fibra; **CIDF**: controle inulina diabético com fibra; **EQDS**: experimental quiabo diabético sem fibra; **EQDF**: experimental quiabo diabético com fibra. A solução de glicose (200g/L) foi administrada mediante gavagem com a dose final de 2g/kg de massa corporal (Prada et al., 2001), para os grupos denominados “SEM FIBRA”, enquanto que para os grupos denominados “COM FIBRA”, além da mesma concentração de glicose, foi adicionada também a fibra na concentração de 5%, sendo que a fibra do quiabo foi a fração mucilagenosa, considerada solúvel. Mesmo sendo insolúvel a fibra de celulose também foi adicionada no CCNF e CCDF.

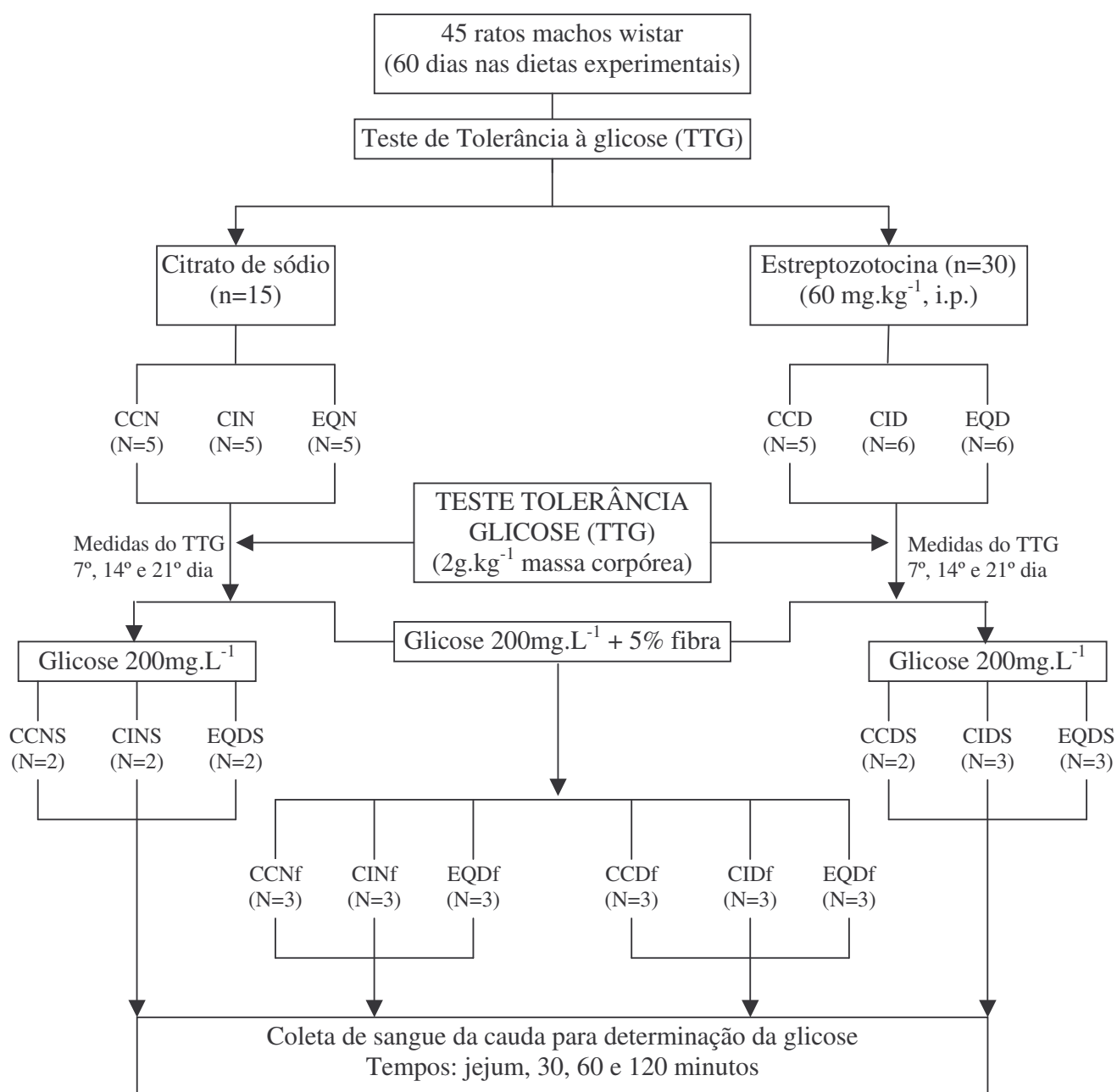


Figura 5. Fluxograma do protocolo experimental utilizado para a indução do diabetes e do teste de tolerância à glicose

4.9.3. Final do período experimental

No 28º dia os animais permaneceram em jejum durante 12 horas e subseqüentemente foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol; 5,0 mg/100g de massa corpórea) o sangue caudal foi coletado para determinação da glicemia e após o sacrifício dos animais outra alíquota de sangue foi coletada através de punção cardíaca, para a determinação de insulina. Foi realizada a laparotomia para retirar os tecidos gordurosos epididimários e peri-renais. Foram retirados também; intestino delgado, intestino grosso, ceco, fígado, estômago, pulmões, pâncreas, baço, coração, cujos pesos foram registrados.

4.9.3.1. Determinação da glicose sangüínea

Foi realizada no sangue coletado da cauda do animal antes do sacrifício, utilizando o aparelho PRECISION Q.I.D-MediSense® (Abbott Laboratories, EUA).

4.9.3.2. Determinação da insulina sérica

Foi determinada pelo método de radioimunoensaio utilizando-se *kits* Coat-a-Count® (Diagnostic Products Corporation, EUA), no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia – UNICAMP.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias dos resultados foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao apresentar diferenças entre os resultados, foi aplicado o teste de Tukey (Cockran & Cox, 1957), utilizando-se o programa Statistica® para Windows, versão 6.0 (StaSoft, Inc.). As diferenças foram consideradas significativas seguindo o nível de significância de $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS e DISCUSSÃO

6.1. Caracterização química da mucilagem e da polpa de quiabo

Os macro-componentes da mucilagem e da farinha de quiabo estão representados na Tabela 3. Os resultados obtidos demonstram que os teores de proteína na mucilagem permaneceram elevados em torno de 17,63%. Esses resultados indicam que pode ter ocorrido uma forte associação entre as proteínas e os polissacarídeos, pelo fato da mucilagem arrastar a fração protéica.

Na farinha de quiabo o teor de fibra alimentar total foi de 37,01%, ocorrendo uma distribuição bastante equilibrada dos tipos de fibra, sendo 50% de fibra alimentar solúvel e 50% de insolúvel.

Tabela 3. Composição centesimal e de aminoácidos da mucilagem e da farinha da polpa do quiabo liofilizado. Valores médios de três repetições ($\pm$ desvio padrão).

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL*			AMINOÁCIDOS*					
	(g/100 g amostra)			(g/100 g amostra)			(g/100 g amostra)	
	mucilagem	Polpa		Mucilagem	Polpa		mucilagem	polpa
Proteín	17,63 $\pm$ 0,12	19,15 $\pm$ 0,16	ASP	4,80 $\pm$ 0,18	5,77 $\pm$ 0,20	MET	N.D.	N.D.
Lipídeos	4,31 $\pm$ 0,06	3,66 $\pm$ 0,24	THE	0,30 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,02	ILE	0,20 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,01
Cinzas	7,53 $\pm$ 0,11	9,08 $\pm$ 0,25	SER	0,41 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,05	LEU	0,14 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,01
FAT	-	37,01 $\pm$ 0,07	GLU	2,06 $\pm$ 0,10	1,22 $\pm$ 0,12	TYR	0,13 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,03
FAS	20,45 $\pm$ 0,10	18,24 $\pm$ 0,03	PRO	1,20 $\pm$ 0,18	1,84 $\pm$ 0,22	PHE	0,27 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,04
FAI	-	18,95 $\pm$ 0,03	GLY	1,22 $\pm$ 0,08	0,28 $\pm$ 0,03	LYS	0,21 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,02
Açúcares total	50,08 $\pm$ 0,25	30,45 $\pm$ 0,35	ALA	0,73 $\pm$	0,92 $\pm$ 0,05	HIS	0,18 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,02
			CYS	N.D.	N.D.	TRP	0,18 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02
			VAL	0,40 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,03	ARG	1,32 $\pm$ 0,05	1,37 $\pm$ 0,04

*Resultados expressos em base seca

FAT: fibra alimentar total; FAS: fibra alimentar solúvel; FAI: fibra alimentar insolúvel; ND: não detectado.

O rendimento de mucilagem, segundo o procedimento adotado (4.2.2) foi de 52%. O teor de açúcares totais presentes na mucilagem foi de 50,08%, este resultado está de acordo com o reportado por Woofle, Chaplin & Otchere (1977) que foi de 50,52%. Já a fibra alimentar solúvel foi calculada pela diferença na composição centesimal e resultou em 20,45%. O perfil dos aminoácidos tanto da mucilagem como da polpa (Tabela 3) mostraram escore químico apontando como limitantes os sulfurados (cistina e metionina). O ácido aspártico e a prolina foram os aminoácidos mais proeminentes.

6.2. Resultados do ensaio in vitro para culturas de bactérias

Nos estudos de crescimento in vitro, onde a fonte de glicose foi substituída pela mucilagem do quiabo, todos os tratamentos diferiram entre si estatisticamente ($P < 0,05$), para os tipos de células La-5 e Bb-12 (Figura 6). A tendência foi, entretanto, mostrar um máximo efeito na substituição de 1%. Quando o meio MRS continha 1,0% de mucilagem, o crescimento foi 17,57% superior ao do controle. Quando a substituição foi de 2,0%, os valores caíram em 11% com relação ao controle, podendo indicar a presença de algum composto inibitório do crescimento bacteriano, cujo limite de tolerância poderia ser ultrapassado com esta concentração mais elevada. Outra explicação para o observado poderia ser a possível dificuldade destes microorganismos em hidrolisar a fibra solúvel, tornando-se esta uma fonte de carbono limitante. A concentração de 0,5% de substituição apresentou resultado limitante, pois a taxa foi 19% inferior à do grupo controle, ou seja, apresentando aproximadamente 81% de crescimento.

Quanto as bifidobactérias, os resultados foram mais expressivos (Figura 6), principalmente na concentração de 1,0% de mucilagem. Para este nível de substituição o número de células foi 70% superior ao controle MRS-m. Foi observado um declínio no crescimento quando utilizou a taxa 2% de mucilagem, pois os valores médios encontrados foram de somente 42% superior ao MRS-m. Para valores de 0,5% de substituição com a mucilagem os valores médios foram superiores em apenas 20,27%.

As linhagens de *Lactobacillus acidophilus* podem fermentar vários carboidratos, sendo que a glicose utilizada no meio de cultura é facilmente metabolizada. Já as bifidobactérias além da glicose, são capazes de utilizar a galactose, lactose e frutose como fonte de carbono (Gomes & Malcata, 1999). Os resultados desse estudo indicam que o meio de cultura enriquecido com mucilagem foi efetivamente positivo para o crescimento destes microorganismos uma vez que a mucilagem é rica em glicose, ramanose, ácido galacturônico e galactose, além de outros nutrientes como proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais.

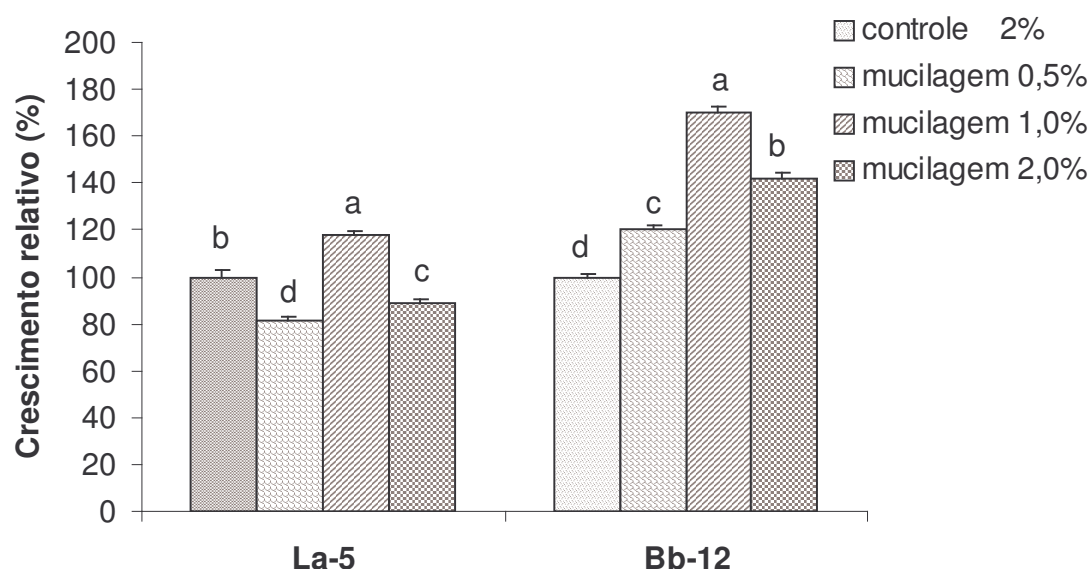


Figura 6. Crescimento relativo de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium lactis* Bb-12 em meios MRS e MRSm, com a fonte de glicose substituída pela mucilagem extraída do quiabo. Os valores são representados pela média $\pm$ desvio-padrão de três repetições analíticas. A análise estatística foi feita para os microrganismos individualmente, sendo que barras com letras diferentes representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

Os resultados da Figura 6 apontaram positivamente para a viabilidade de realizar o teste *in vivo* utilizando o quiabo como fonte de fibra solúvel, uma vez que o ensaio *in vitro* promoveu aumento significativo na produção de células para ambos microorganismos, principalmente para as bifidobactérias.

6.3. Resultados do ensaio *in vivo* com ratos Wistar

Os resultados da Tabela 4 demonstraram que o consumo da dieta para o grupo CC foi maior estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao CI e EQ. O grupo EQ apresentou uma ingestão 15% menor que o CC, com a mesma eficiência alimentar de 0,33, ou seja, tão eficiente quanto a dieta preconizada pela AIN93G. Já o grupo CI ingeriu 10% a menos de dieta em relação ao CC, mas alcançou um índice de 0,36 na eficiência alimentar, sendo que a eficiência alimentar elevada é um indicativo de um melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta. O menor consumo de dieta pelo grupo EQ poderia ser devido a um efeito de saciedade maior, em virtude das características próprias da fibra solúvel do quiabo.

No trabalho de Kim (2002), o índice de eficiência alimentar para animais alimentados com dieta com 5% de celulose foi 0,27 (ingestão de 19g/dia), enquanto que com 5% de inulina, a eficiência foi de 0,29, com ingestão de 16,7g/dia; ou seja, podemos verificar que a inulina resultou em consumo de dieta 12% menor que o da celulose, próximo do valor encontrado neste experimento.

No estudo de Sigleo, Jackson & Vahouny (1984), foi relatado que ratos alimentados com dieta contendo 10% de celulose apresentaram consumo maior do que outros alimentados com pectina, mas não apresentando diferenças significativas na eficiência alimentar. Todavia, outro estudo (Levrat, Remesy & Demigne, 1991) reportou que níveis de inulina de 5 a 10% não afetam significativamente a ingestão da dieta, bem como o ganho de peso.

Tabela 4. Efeitos das fibras no ganho de peso no consumo de dieta e na eficiência alimentar.

GRUPOS	Peso corporal inicial (g)	Ganho de peso (g/dia)	Consumo alimentar (g/dia)	Eficiência alimentar (ganho/g dieta)
CC	86,22±3,41 ^a	6,05 ^a	18,43±0,80 ^a	0,33 ^b
CI	90,39±5,42 ^a	5,90 ^a	16,57±0,68 ^b	0,36 ^a
EQ	89,14±9,36 ^a	5,24 ^b	15,69±0,64 ^b	0,33 ^b

CC: controle celulose; **CI:** controle inulina; **EQ:** experimental quiabo. Valores médios, n=18. Valores nas mesmas colunas com letras diferentes são significativamente diferentes, P<0,05.

A massa seca da excreta fecal (Tabela 5) foi superior no grupo alimentado com CC. Apesar dos três grupos apresentarem diferenças significativas entre si, no grupo CI a excreção fecal foi duas vezes menor (P<0,05), comparada ao grupo CC. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Kim (2002), que relatou que a massa fecal seca de ratos alimentados com celulose foi também duas vezes maior que a daqueles alimentados com inulina.

É relevante ressaltar que a fibra do quiabo usada nesse estudo apresenta 50% de fibra insolúvel e 50% de solúvel, e sua excreção fecal (Tabela 5) do grupo EQ está estatisticamente menor (P<0,05) que CC e maior (P<0,05) que CI. Sendo o percentual referente à média do tratamento no 14º e 28º (grupo RD considerado 100%) a contagem de bifidobactérias foram CC: 76,49%; CI: 87,35%; EQ: 80,96% e para os lactobacilos foram de CC: 95,60%; CI: 107,95%; EQ: 105,66%, estes resultados estão de acordo com o estudo de Shimotoyodome et al. (2005), que reportaram que a fibra solúvel apresenta baixa excreta fecal e alta fermentabilidade e a fibra insolúvel apresenta alta excreta fecal e baixa fermentabilidade; e o uso combinado das duas (1:1) apresenta resultados mais favoráveis, demonstrando que a vantagem de uma compensa a desvantagem da outra, de maneira complementar.

Quanto ao tempo de trânsito intestinal (Tabela 5), o CI e EQ apresentaram-se iguais entre si, mas inferiores ao grupo CC ($P<0,05$), sendo o tempo de trânsito menor para o CI e EQ, tanto na 1ª como na 2ª etapa do experimento. Embora fosse de esperar que a fibra insolúvel tivesse um tempo de trânsito menor, nossos resultados estão de acordo com os do estudo de Kim (2002), no sentido de que, na dieta contendo 5% inulina, o tempo do trânsito intestinal foi menor (8,37h.) do que na dieta com 5% de celulose (11,53h.). Sigleo, Jackson & Vahouny (1984) e Tetsuguchi et al. (1998) também relataram que ratos alimentados com dieta contendo celulose apresentavam tempos de trânsito intestinal maiores.

Entretanto, para alguns autores como Connell (1978), a aceleração do trânsito intestinal está diretamente relacionada aos componentes da fibra alimentar que possuem capacidade de hidratação. Estes resultados vêm de encontro ao conteúdo de umidade que foi em torno de 62% para os grupos CI e EQ, indicando fezes mais hidratadas em relação ao grupo CC (43%). Este comportamento reflete maior capacidade de absorção de água, facilitando a evacuação, podendo ser considerado como fator benéfico ao hospedeiro.

Tabela 5. Efeito de diferentes fontes de fibra na excreção fecal e no trânsito intestinal.

Grupos	Umidade fecal (%)	Densidade fecal (g/mL)	Excreção fecal (g fezes secas/24h)	TI (h) (13ºdia)	TI (h) (27ºdia)
CC	43,20±0,17 ^b	0,9359±0,02 ^a	1,39±0,05 ^a	10,32±0,48 ^a	9,43±0,02 ^a
CI	61,98±0,64 ^a	0,8870±0,05 ^{ab}	0,62±0,01 ^c	8,43±0,61 ^b	8,56±0,42 ^b
EQ	62,72±0,94 ^a	0,8175±0,03 ^b	0,87±0,02 ^b	7,07±0,15 ^b	8,20±0,40 ^b

TI: Trânsito intestinal; **CC:** controle celulose; **CI:** controle inulina; **EQ:** experimental quiabo. Valores médios, n=10. Valores na mesma coluna com diferentes índices são significativamente diferentes, $P<0,05$.

Para os ratos sacrificados no 14º e 28º dia, os órgãos fígado, baço e coração foram avaliados em relação à massa e contornos somente para efeito de controle, para verificar se a dieta interferiria ou provocaria alguma macro-alteração dos órgãos. Nos resultados (Tabelas 6 e 7) observamos que a dieta não provocou nenhuma alteração no tamanho do

fígado, baço e coração. No estudo de Kelly-Quagliana, Nelson & Buddington (2003), ratos alimentados com dieta de celulose 10% e inulina 10%, não apresentaram diferenças no tamanho do baço.

Tabela 6. Efeito de diferentes fontes de fibra na massa do fígado, baço e coração de ratos alimentados com dieta padrão e experimental, durante 14 dias.

Tecidos	CC	CI	EQ
(g/100g peso corporal)			
Fígado	3,84±0,17 ^a	4,10±0,13 ^a	3,76±0,10 ^a
Baço	0,34±0,04 ^a	0,33±0,04 ^a	0,32±0,04 ^a
Coração	0,41±0,06 ^a	0,42±0,03 ^a	0,41±0,02 ^a

CC: controle celulose; **CI:** controle inulina; **EQ:** experimental quiabo. Valores médios, n=9. Valores na mesma linha com índices diferentes são significativamente diferentes, P<0,05.

Tabela 7. Efeito de diferentes fontes de fibra na massa do fígado, baço e coração de ratos alimentados com dieta padrão e experimental, durante 28 dias.

Tecidos	CC	CI	EQ
(g/100g peso corporal)			
Fígado	3,52±0,13 ^a	3,70±0,12 ^a	3,47±0,11 ^a
Baço	0,24±0,02 ^a	0,24±0,02 ^a	0,28±0,01 ^a
Coração	0,34±0,03 ^a	0,34±0,03 ^a	0,35±0,03 ^a

CC: controle celulose; **CI:** controle inulina; **EQ:** experimental quiabo. Valores médios, n=9. Valores na mesma linha com índices diferentes são significativamente diferentes, P<0,05.

Com relação aos outros parâmetros (Tabelas 8 e 9) os resultados não apresentaram diferenças estatísticas. Nos estudos de Kim & Shin. (1998) e Kim (2002), para uma dieta com 5% de celulose e 5% de inulina, os pesquisadores não encontraram diferença estatística para os mesmos parâmetros avaliados.

Tabela 8. Efeito de diferentes fontes de fibra na massa tecidual e do conteúdo gastrointestinal de ratos alimentados com dieta padrão e experimental, durante 14 dias.

Parâmetros	CC	CI	EQ
	(g/100g peso corporal)		
Tecido estomacal	0,42±0,03 ^b	0,48±0,05 ^b	0,57±0,01 ^a
Tecido intestino delgado	1,22±0,23 ^b	1,72±0,38 ^b	2,53±0,22 ^a
Tecido cecal	0,22±0,01 ^a	0,40±0,11 ^a	0,33±0,10 ^a
Tecido colônico	0,58±0,08 ^a	0,63±0,20 ^a	0,62±0,10 ^a
Conteúdo estomacal	0,22±0,09 ^a	0,27±0,15 ^a	0,31±0,10 ^a
Conteúdo intestino delgado	1,32±0,17 ^a	1,09±0,15 ^a	1,41±0,08 ^a
Conteúdo cecal	0,77±0,16 ^a	1,04±0,11 ^a	1,07±0,22 ^a
Conteúdo colônico	0,41±0,09 ^a	0,60±0,10 ^a	0,63±0,16 ^a
PH cecal	7,00±0,11 ^a	6,70±0,02 ^a	6,74±0,18 ^a

CC: controle celulose; **CI:** controle inulina; **EQ:** experimental quiabo. Valores médios, n=9. Valores na mesma linha com índices diferentes são significativamente diferentes, P<0,05.

Tabela 9. Efeito de diferentes fontes de fibra na massa tecidual e do conteúdo gastrointestinal de ratos alimentados com dieta padrão e experimental, durante 28 dias.

Parâmetros	CC	CI	EQ
	(g/100g peso corporal)		
Tecido estomacal	0,38±0,06 ^a	0,38±0,01 ^a	0,44±0,01 ^a
Tecido ID	1,17±0,01 ^{ab}	1,01±0,01 ^b	1,47±0,21 ^a
Tecido cecal	0,20±0,01 ^b	0,32±0,05 ^a	0,27±0,07 ^a
Tecido colônico	0,52±0,06 ^a	0,47±0,08 ^a	0,50±0,05 ^a
Conteúdo estomacal	0,27±0,13 ^a	0,15±0,03 ^a	0,25±0,07 ^a
Conteúdo intestino delgado	1,12±0,16 ^a	1,46±0,04 ^a	1,57±0,29 ^a
Conteúdo cecal	0,81±0,14 ^b	1,38±0,11 ^a	1,30±0,16 ^a
Conteúdo colônico	0,50±0,08 ^{ab}	0,37±0,02 ^b	0,51±0,05 ^a
PH cecal	7,10±0,19 ^a	6,90±0,18 ^a	7,24±0,09 ^a

CC: controle celulose; **CI:** controle inulina; **EQ:** experimental quiabo. Valores médios, n=9. Valores na mesma linha com índices diferentes são significativamente diferentes, P<0,05.

No trabalho de Dongowski et al. (2002), estudando a fibra alimentar da cevada, os autores observaram que os tecidos cecal e colônico apresentaram massas com valores superiores e atribuíram este efeito à viscosidade da fibra bem como ao transporte de maior quantidade de material nas partes inferiores do intestino. Eles observaram também aumento da motilidade do ceco e cólon e maior espessura das paredes destes tecidos.

Os valores dos pH nos conteúdos cecais não diferiram significativamente entre os grupos. Os valores de pH têm sido relacionados com a fermentação da fibra (Suzuki & Hara, 2004), ou seja, estão diretamente relacionados à concentração de ácidos orgânicos; principalmente acetato e lactato (Gibson et al., 1995; Hara, Konishi & Kasai, 2000).

Podemos observar tanto no 14º (Tabela 10) como 28º dia (Tabela 11) de alimentação dos grupos experimentais, o comprimento do intestino delgado do grupo EQ mostrou desenvolvimento significativamente superior ($P < 0,05$) ao dos grupos de referência (CC e CI). Isto poderia ser atribuído a uma maior atividade fermentativa e capacidade de absorção de água da fibra do quiabo.

Tabela 10. Efeito de diferentes fontes de fibra no comprimento do intestino delgado, ceco e cólon de ratos alimentados com dieta padrão e experimental, durante 14 dias.

Trato gastrointestinal	CC	CI	EQ
	(cm/100g peso corporal)		
Intestino delgado	62,79±8,07 ^b	66,70±3,28 ^b	81,19±4,86 ^a
Ceco	1,86±0,29 ^b	2,54±0,23 ^a	2,52±0,28 ^a
Cólon	9,00±0,47 ^a	9,51±0,64 ^a	10,15±0,89 ^a

CC: controle celulose; **CI:** controle inulina; **EQ:** experimental quiabo. Valores médios (n=9), na mesma linha com índices diferentes são significativamente diferentes, $P < 0,05$.

Com relação ao aumento do comprimento do ceco, os grupos CI e EQ apresentaram-se iguais estatisticamente e com valores superiores ao CC no 14º e 28º dia. Nenhuma diferença foi registrada no comprimento do cólon entre os grupos em nenhum

período. Estudos morfológicos relatam que o consumo de FA está associado com mudanças na estrutura do intestino delgado, as quais incluem alterações no comprimento e peso, além de modificações da mucosa (Sigleo, Jackson & Vahouny, 1984; Brown, Kelleher & Losowsky, 1979).

Tabela 11. Efeito de diferentes fontes de fibra no comprimento do intestino delgado, ceco e cólon de ratos alimentados com dieta padrão e experimental, durante 28 dias.

Trato gastrointestinal	CC	CI	EQ
	(cm/100g peso corporal)		
Intestino delgado	45,36±1,90 ^b	47,18±2,98 ^b	57,14±4,96 ^a
Ceco	1,35±0,27 ^b	2,00±0,20 ^a	1,99±0,15 ^a
Cólon	7,58±0,38 ^a	7,95±0,42 ^a	8,33±1,52 ^a

CC: controle celulose; CI: controle inulina; EQ: experimental quiabo. Valores médios (n=9), na mesma linha com índices diferentes são significativamente diferentes, P<0,05.

6.4. Contagem e classificação da microflora intestinal

A colonização bacteriana do trato gastrointestinal do recém-nascido começa durante o parto. O processo de estabelecimento da microflora é lento e gradual. A implantação de diferentes cepas bacterianas ocorre de forma controlada pelo intestino, sempre estabelecendo novos grupos bacterianos. O conteúdo de oxigênio no intestino do recém-nascido promove a expansão das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, tais como as enterobactérias, enterococos entre outras. À medida que as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas consomem oxigênio, o meio torna-se mais adequado para as bactérias anaeróbias, tais como os lactobacilos e bifidobactérias, formando um ecossistema. O intestino grosso é o local onde ocorrem todos os processos de reabsorção, onde os resíduos alimentícios permanecem de 16 a 68 horas, é também a região onde está presente a maior carga microbiana do corpo (Schapiro, Cummins & Luckey, 1965).

Em humanos, a densidade da bactéria no estômago é de 100 bactérias por grama contra um bilhão por grama no intestino grosso (Figura 7), sendo que no intestino grosso o grupo de bactérias mais numeroso é o anaeróbico, que representa 90%, incluindo bacteróides e bifidobactérias seguido pelas eubactérias (Mitsuoka & Kaneuchi, 1977). Na faixa de 1 a 5% são anaeróbios facultativos, como lactobacilos, enterococos e coliformes (Haenel, 1970). Todos estes grupos se encontram em constante conflito e o balanço da flora intestinal depende das condições ambientais e fisiológicas do indivíduo e a fatores externos, como a dieta alimentar e terapias com antibióticos (Rasic & Kurmann, 1983).

O equilíbrio da flora intestinal exerce um efeito protetor contra infecções intestinais (Savage, 1977). As bifidobactérias representam papel importante na limpeza do ambiente intestinal, sendo necessário que seja o grupo dominante na microflora. Apesar da pequena porcentagem de microorganismo patogênico essa incidência é de grande importância, pois serve de alerta para o sistema imunológico, reativando as defesas locais, em cada parte do trato digestivo (Rasic & Kurmann, 1983).

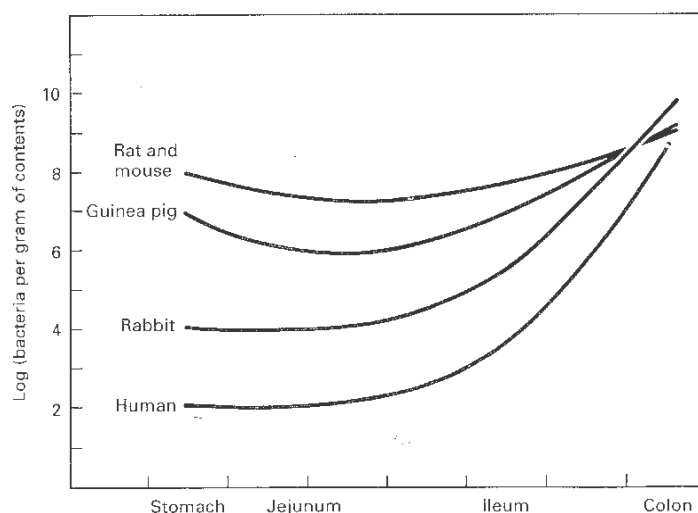


Figura 7. Concentração aproximada de bactéria em várias regiões do trato gastrointestinal (Rowland, 1988).

A microflora normal e saudável impede a invasão de patógenos, sendo estes inibidos e destruídos pela atividade da flora na produção de antígeno, estimulando constantemente o sistema imune. Outros fatores que incidem na resistência a infecções intestinais são: a competição por nutrientes essenciais (Savage, 1977) e o efeito antagônico pelo qual o grupo microbiano representa papel primordial como os *Lactobacillus acidophilus*. Esse gênero de microorganismo tem demonstrado produzir vários tipos de antibióticos, tais como a acidofilina (Vakil & Shahani, 1964) e acidolina (Hamdan & Mikolajcik, 1974). As bifidobactérias, além de apresentar efeito bactericida participam na síntese das vitaminas B1, B2, B6, B12, ácido fólico, biotina, niacina, ácido pantotênico e da vitamina K.

Na Tabela 12 estão representados os microrganismos quantificados neste estudo bem como suas principais funções. Embora a fibra não forneça a energia ou compostos classicamente conhecidos como nutrientes, ela é componente indispensável das dietas. Quando a fibra está ausente na alimentação, as funções da mucosa do trato gastrointestinal são reduzidas e os riscos de translocação de bactérias para o sangue, ou septicemia, são maiores (Spaeth et al., 1990; Szilagyi, 1998).

Tabela 12. Relação dos microrganismos quantificados neste estudo, seus efeitos benéficos e tóxicos no intestino.

MICROORGANISMOS	EFEITOS BENÉFICOS	EFEITOS TÓXICOS
Bífidobacterias	Sínteses Vitaminas Digestão Absorção Previne infecção Estimula imunidade	-
Enterococos	Previne infecção Estimula imunidade	-
Lactobacilos	Digestão Absorção Previne infecção Estimula imunidade	-
Anaeróbios totais Enterobactérias	-	Putrefação intestinal Toxinas microbianas Carcinógenos Patógenos

Após o 14º dia, as concentrações de bifidobactérias no conteúdo cecal não apresentaram diferenças significativas (Figura 8) entre os grupos, conservando a população presente no grupo de referência recém-desmamados (RD). A contagem dos lactobacilos do grupo controle inulina (CI) foi superior ($P < 0,05$) aos demais e estatisticamente igual ao grupo experimental quiabo (EQ). Com relação ao enterococos, os grupos apresentaram contagens superiores com relação ao grupo (RD) embora as enterobactérias e os anaeróbios totais apresentaram a mesma proporção para todos os grupos estudados. Portanto, a única alteração observada em relação à contagem de microorganismos no 14º dia foi um número maior de lactobacilos para os grupos CI e EQ no conteúdo cecal. As demais populações não apresentaram variação ao longo deste período.

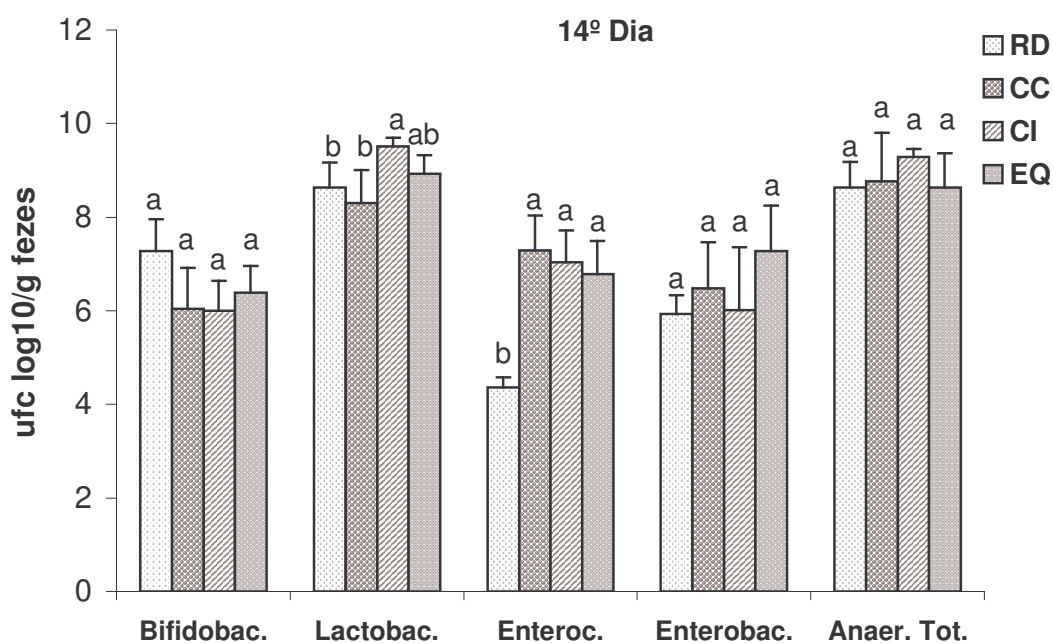


Figura 8. Efeito de diferentes fontes de fibras sobre a microbiota intestinal de ratos, após 14 dias de experimento. Os valores são médias $\pm$ desvio-padrão ($n=5$). Barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$); **RD**: grupo de referência recém-desmamados; **CC**: controle celulose; **CI**: controle inulina; **EQ**: experimental quiabo.

Já com relação ao 28º dia (Figura 9) as bifidobactérias dos grupos CC e EQ diminuíram quando comparadas às contagens do grupo RD, permanecendo estatisticamente igual apenas para o grupo CI. Os lactobacilos dos grupos CI e EQ foram superiores ($P<0,05$) aos demais e estatisticamente iguais entre si. Os grupos CC, CI e EQ apresentaram contagens de enterococos superiores ao RD, sendo o número de enterobactérias do grupo EQ igual ao CI. Por último, os anaeróbios totais apresentaram uma redução significativa para o grupo CC. Entretanto, para a correta interpretação dos níveis de microorganismos patogênicos, deve ser levado em consideração o fato de que os animais do grupo de referência recém-desmamados (RD) eram livres de bactérias patogênicas (animais SPF), portanto, esperado que estes valores fossem inferiores.

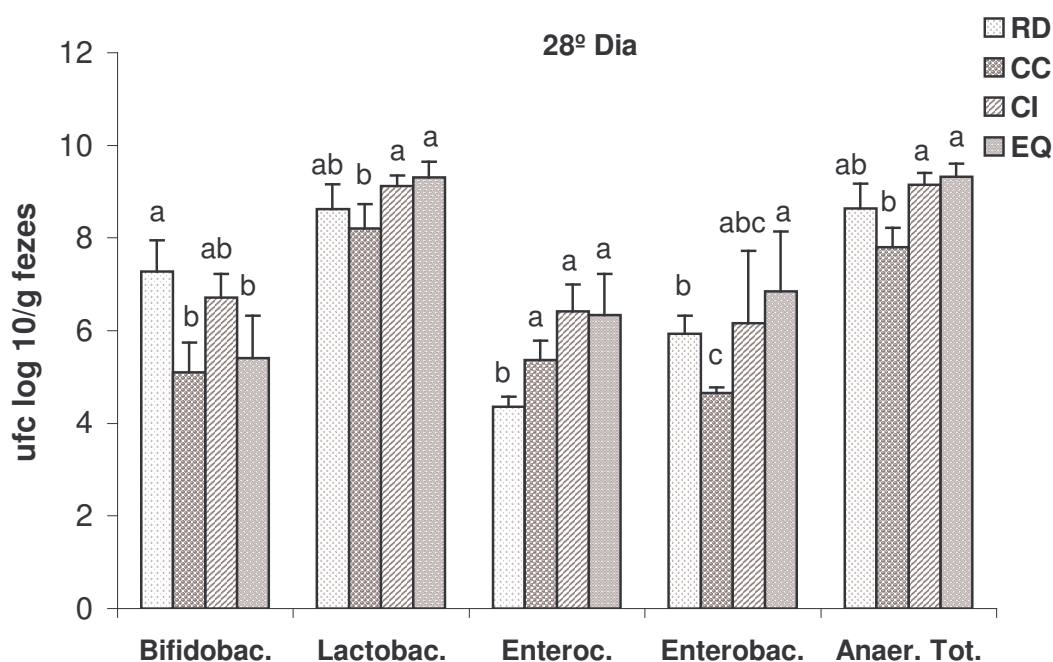


Figura 9. Efeito de diferentes fontes de fibras sobre a microbiota intestinal de ratos, após 28 dias de experimento. Os valores são médias $\pm$ desvio-padrão ($n=5$). Barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P<0,05$); **RD**: grupo de referência recém-desmamados; **CC**: controle celulose; **CI**: controle inulina; **EQ**: experimental quiabo.

Neste estudo, a inulina foi escolhida como controle positivo devido aos resultados relatados por vários estudos com seres humanos, os quais confirmam sua efetividade como estimulante do crescimento de bifidobactérias no intestino grosso (Rao, 1999). Nosso estudo também confirma o crescimento dos lactobacilos, embora a literatura recomende doses maiores para a obtenção de resultados mais expressivos, neste estudo a dose foi limitada a 5% para seguir a dosagem preconizada pela AIN-93G.

A fibra de quiabo (EQ) utilizada neste estudo, em nível de 5%, também demonstrou efetividade, pois seus valores de bifidobactérias e lactobacilos foram estatisticamente iguais aos da inulina pura (CI) e ao grupo RD quais naturalmente apresentam níveis elevados destes microrganismos, pela sua condição de animais recém-desmamados. Conseqüentemente é plausível supor que o aumento da população de microorganismos benéficos resulte na indisponibilização dos sítios de ligação de adesinas, incapacitando ou reduzindo o poder de fixação dos gêneros patogênicos na mucosa intestinal. Sendo assim, e seguindo esta seqüência de funções, podemos supor que a fibra do quiabo pode estimular o sistema imune, mediante a redução indireta da ocorrência de translocação intestinal por patógenos impedindo-os de alcançar a corrente sangüínea. Além da proteção de infecções intestinais por patógenos entéricos como *Salmonella* veiculadas por alimentos que são muito freqüentes. As bifidobactérias e os lactobacilos competem com as bactérias patogênicas, inibindo sua proliferação na luz intestinal e conseqüentemente evitando diarreias, perdas de nutrientes e eventuais necroses do epitélio. A partir de uma microbiota saudável espera-se o desenvolvimento adequado da morfologia intestinal.

6.5. Determinação de ácidos orgânicos no ceco e no cólon por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As fibras alimentares são fermentadas pelas bactérias do ceco e cólon, onde chegam inalteradas. Estas reações podem diminuir o pH intraluminal de 7,0-7,5 a 6,0-6,5 e a temperatura pode aumentar em até 0,7°C. As moléculas mais complexas são desdobradas em hexoses, pentoses e álcoois e já não podem ser absorvidas; assim, são utilizadas como

substratos por colônias de bactérias, que por sua vez, degradam estas moléculas a ácido láctico, H₂O, CO₂, H₂, metano, além dos ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), ocorrendo na proporção de 60:25:14, respectivamente, e perfazem 85% da produção total de ácidos voláteis (Ruppin et. al., 1980; Sellin & Desoigme, 1990).

Os AGCC são absorvidos no cólon metabolizados pelo fígado e outros tecidos periféricos e estimulam a absorção de sódio, cloreto e água no cólon (Hoverstad, 1986). Produzem energia para o hospedeiro, podendo seu valor oscilar entre 1 a 2,5 cal/g sendo que este valor energético da fibra dependerá de sua fermentabilidade (Peris et al. 2002) e da quantidade de fibra alimentar (Ruppin et al., 1980), sendo que 19 a 50mmol/dia são eliminados pelas fezes (Ardawi & Newsholme, 1985). O propionato é utilizado pelo fígado na gliconeogênese, e o acetato utilizado na lipogênese sendo os únicos que chegam aos tecidos periféricos, principalmente o muscular, onde são metabolizados (Rombeau & Kripke, 1990).

As células do corpo são produzidas mediante suplemento oxigênio e nutrientes, que chegam através do sangue. Entretanto, a nutrição dos colonócitos não segue esta regra geral; a maior parte de sua nutrição é produzida na luz intestinal, sendo o butirato responsável por 75% de oxigênio que necessitam (Ardawi & Newsholme, 1985). No fígado, o butirato é metabolizado formando substratos energéticos, como o glutamato e glutamina (Cummings et al., 1987).

Os ácidos graxos de cadeia curta suprem por volta de 50 a 75% da energia requerida pelos colonócitos; esses utilizam primeiro o butirato seguido pelo acetato e propionato (Cummings, 1985; Roediger, 1982); são produzidos também corpos cetônicos, CO₂ e água, que são muito importantes para o funcionamento da mucosa do cólon, já que intervêm em mecanismos como a produção de muco, absorção de íons, formação de bicarbonato e produção de energia. Os AGCC exercem efeitos na motilidade do cólon, pois estimulam o peristaltismo (Yajima, 1985).

Atuam ainda sobre o desenvolvimento das células epiteliais do íleo e do cólon, fornecem uma possível proteção contra o câncer do cólon; e efeitos benéficos sobre a homeostase da glicose e metabolismo dos lipídios.

Estes ácidos são pequenos e conseqüentemente mais solúveis, sendo então absorvidos pelas células da mucosa e vão diretamente para a veia porta pela qual são transportados para o fígado (Krause & Mahan, 1985).

O butirato apresenta efeito trófico sobre o epitélio intestinal, já que estimula sua proliferação tanto no jejuno como no íleo e cólon (Kripke et al., 1989; Sakata & Yajima 1984). Este estímulo que exerce sobre os colonócitos se inverte e se converte em efeito antiproliferativo quando atua sobre os colonócitos neoplásicos (Kim et al., 1989; Whitehead, Young & Bhathal, 1986; Otaka, Singhal & Hakomori, 1989).

Neste estudo foi realizada análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar os teores de lactato e dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) nos conteúdos cecal (Figura 10) e colônico (Figura 11). Os cromatogramas mostraram picos de boa resolução principalmente para acetato e butirato. Os picos referentes ao lactato e propionato saíram muito próximos, mas isto não afetou a identificação bem como a quantificação.

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido usada freqüentemente para quantificar ácidos orgânicos de baixo peso molecular e na identificação e quantificação de ácidos graxos de cadeia curta em vários campos de pesquisa como na microbiologia para prever infecção por bactéria anaeróbica, na ciência da nutrição pode fornecer informações do metabolismo animal (Guerrant, Lambert & Moss, 1982).

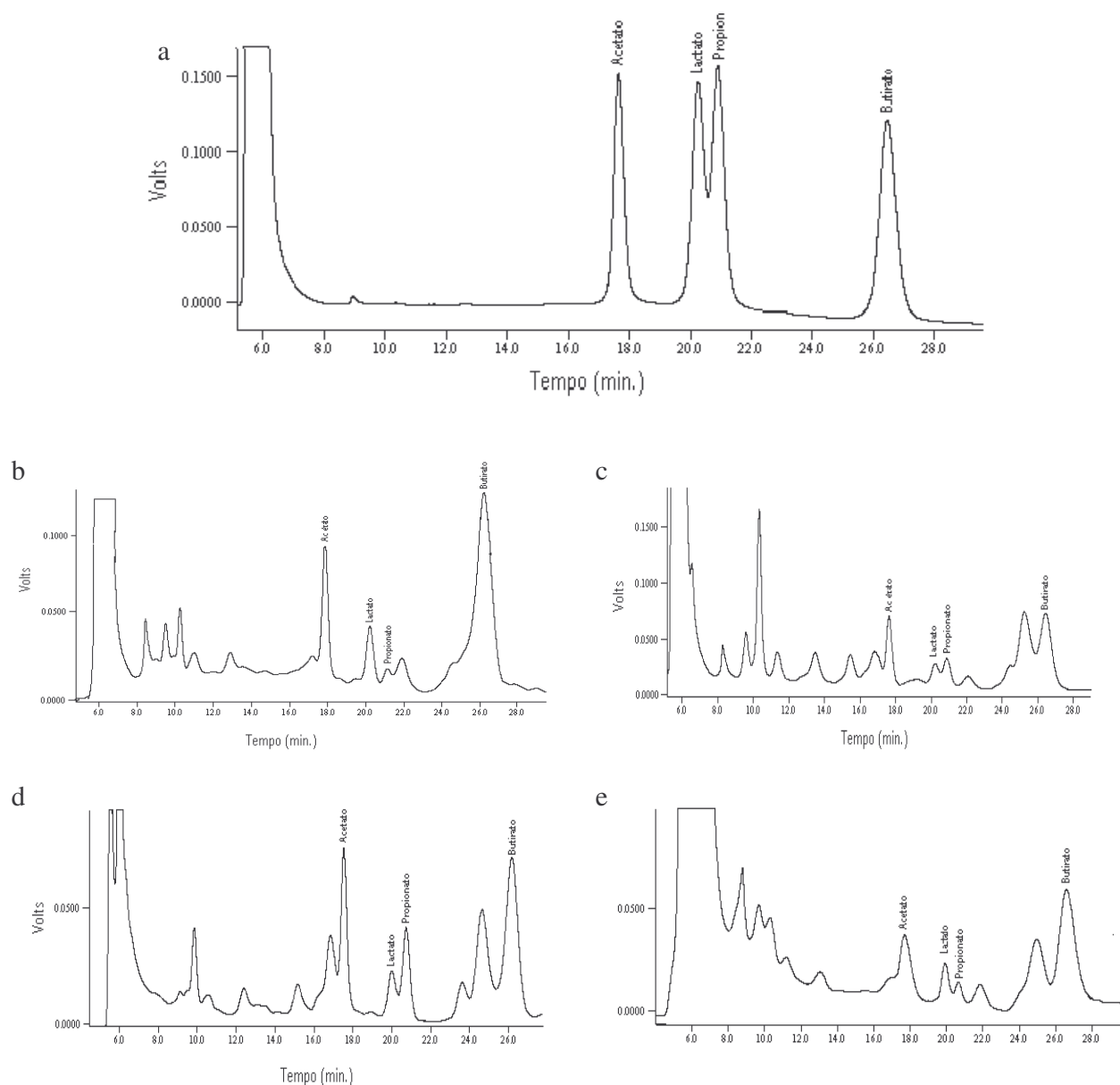


Figura 10. Cromatogramas dos AGCC (acetato, propionato, butirato) e lactato presentes no conteúdo cecal dos ratos; (a) padrões, (b) RD (referência recém-desmamados), (c) controle celulose, (d) CI (controle inulina), (e) EQ (experimental quibo), com os seguintes tempos de retenção: acetato: 17,74 min.; lactato: 20,19 min.; propionato: 20,89 min. e butirato: 26,45 min.

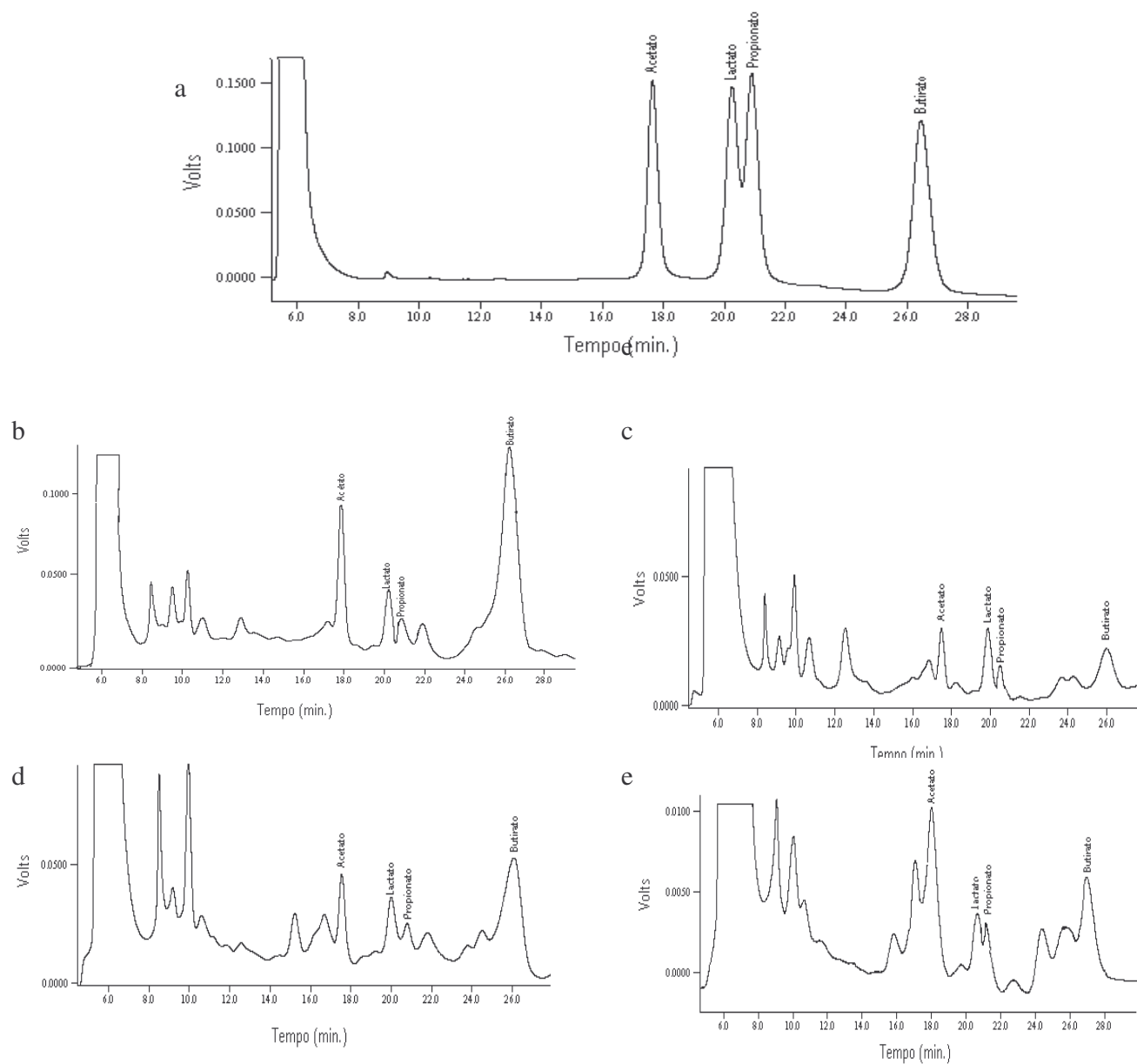


Figura 11. Cromatogramas dos AGCC (acetato, propionato, butirato) e lactato presentes no conteúdo colônico dos ratos; (a) padrões, (b) RD (referência recém-desmamados), (c) controle celulose, (d) CI (controle inulina), (e) EQ (experimental quiabo), com os seguintes tempos de retenção: acetato: 17,74 min.; lactato: 20,19 min.; propionato: 20,89 min.; e butirato: 26,45 min.

Os resultados do conteúdo cecal para os ratos sacrificados no 14º dia (Figura 12) mostram que houve uma redução do acetato presente no ceco, de todos os grupos, em relação à condição inicial do grupo recém-desmamado. O lactato permaneceu o mesmo para o grupo CI em relação ao grupo referência recém-desmamados (RD); já o propionato foi superior no EQ e CI. Com relação ao butirato houve uma redução de sua concentração para todos os grupos quando comparado ao RD.

Após 28 dias de alimentação com as dietas experimentais a análise do conteúdo cecal (Figura 12), evidencia uma redução do acetato presente no ceco de todos grupos em relação à condição inicial (RD). A concentração de lactato não variou para o grupo CI quando comparado ao grupo RD, já o teor de propionato foi superior no CI. Houve uma redução na concentração do butirato para todos os grupos em relação ao grupo RD.

Em relação ao teor de AGCC no cólon, após 14 dias (Figura 13), verifica-se que a concentração de acetato permaneceu a mesma para o grupo EQ em relação ao grupo RD. O teor de lactato permaneceu o mesmo para os grupos CC e EQ e diminuiu no grupo CI quando comparados ao grupo RD; já o nível de propionato foi maior para o grupo EQ e igual para os demais grupos. Com relação ao butirato houve uma redução de sua concentração para todos os grupos em relação ao grupo RD.

Após 28 dias (Figura 13) o conteúdo de AGCC do colón, demonstrou que o teor de acetato permaneceu o mesmo para o grupo EQ comparado à condição inicial do grupo RD. A concentração de lactato permaneceu a mesma para o grupo CI tomando com parâmetro o grupo RD, enquanto a concentração de propionato permaneceu igual em todos os grupos. Os teores de butirato dos grupos CC, CI e EQ diminuíram quando comparados ao grupo RD.

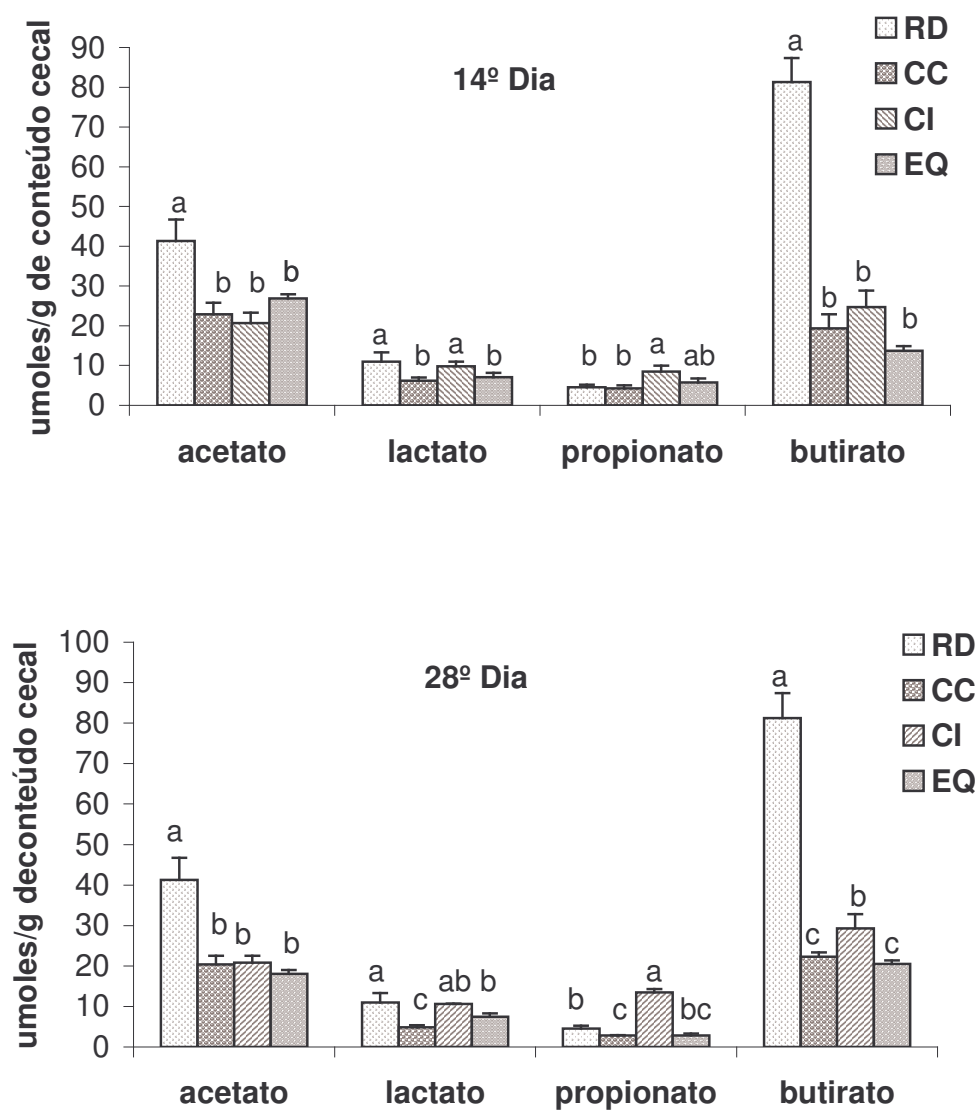


Figura 12. Produção de AGCC e lactato no ceco dos ratos alimentados com diferentes fontes de fibras após 14 e 28 dias de tratamento. Os valores são médias $\pm$ desvio-padrão (n=5). Barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$); **RD**: referência recém-desmamados; **CC**: controle celulose; **CI**: controle inulina; **EQ**: experimental quiabo.

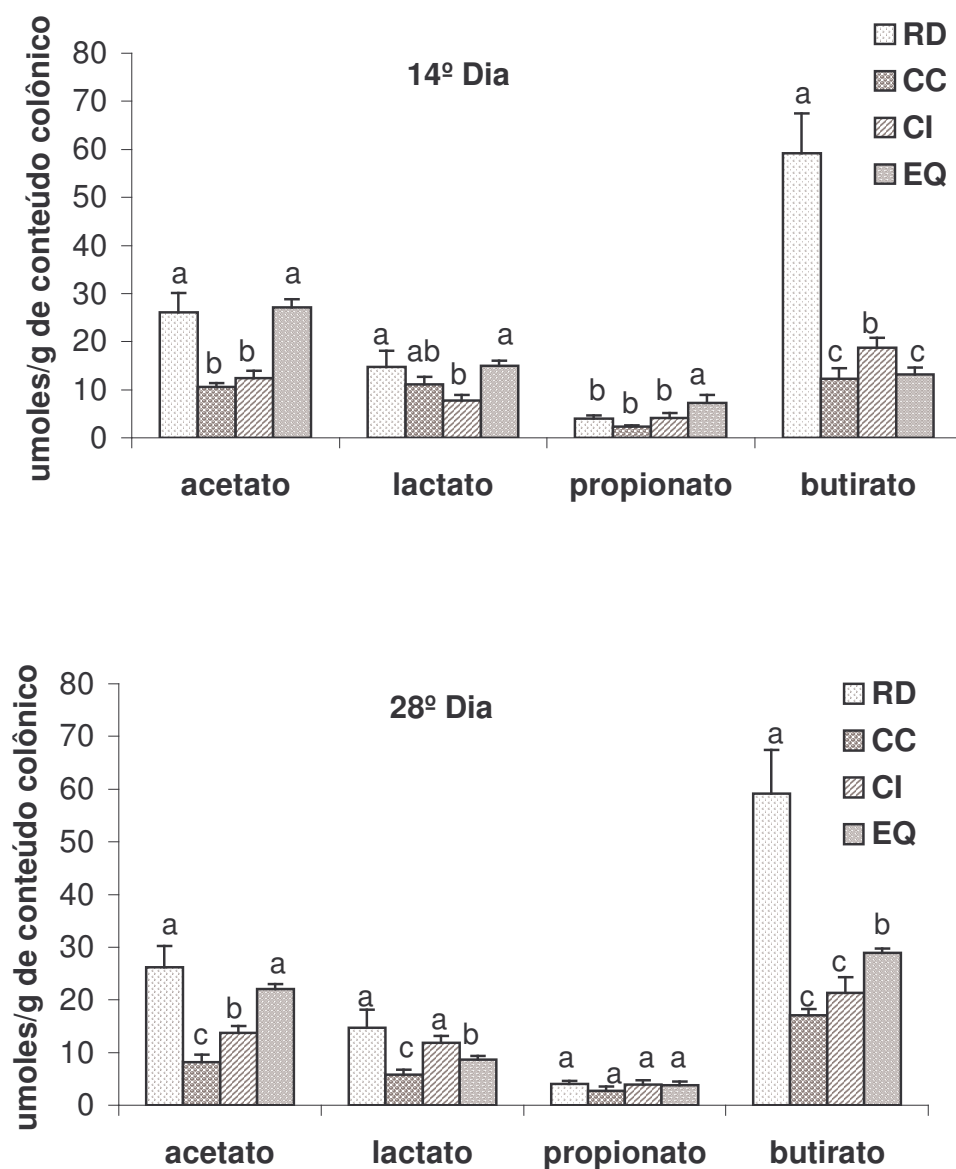


Figura 13. Produção de AGCC e lactato no cólon dos ratos alimentados com diferentes fontes de fibras após 14 e 28 dias de tratamento. Os valores são médias $\pm$ desvio-padrão (n=5). Barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$); **RD:** referência recém-desmamados; **CC:** controle celulose; **CI:** controle inulina; **EQ:** experimental quiabo.

Para todos os grupos de animais após 14 e 28 dias o nível de butirato presente foi inferior ao dos animais recém desmamados. O butirato é o substrato preferido para células da mucosa colônica, além de sua provável propriedade anti-neoplásica, possivelmente por manter a acetilação do DNA na histona nucleossomal (Candido, Reeves & Davie, 1978). Neste estudo assim como no estudo de Franklin et al., (2002), os valores dos AGCC após desmame, diminuíram consideravelmente, o qual pode ter efeito significativo na energia disponível para a massa intestinal. No intestino grosso de suínos estes ácidos podem contribuir com 5 a 28% do requerimento total de energia para manutenção (Friend, Nichoson & Cunningh, 1964), enquanto que para outras espécies são considerados como fonte primária de energia para a massa intestinal, contribuindo em até 70% do requerimento para sua manutenção (Imoto & Namioka, 1978).

Para uma melhor avaliação dos resultados, tem-se os valores do lactato e o total de AGCC presentes no ceco e cólon dos ratos na Figura 14, que mostra as médias destes valores para os tratamentos no 14º e 28º dia. O grupo RD (referência recém-desmamados) foi considerado como 100%.

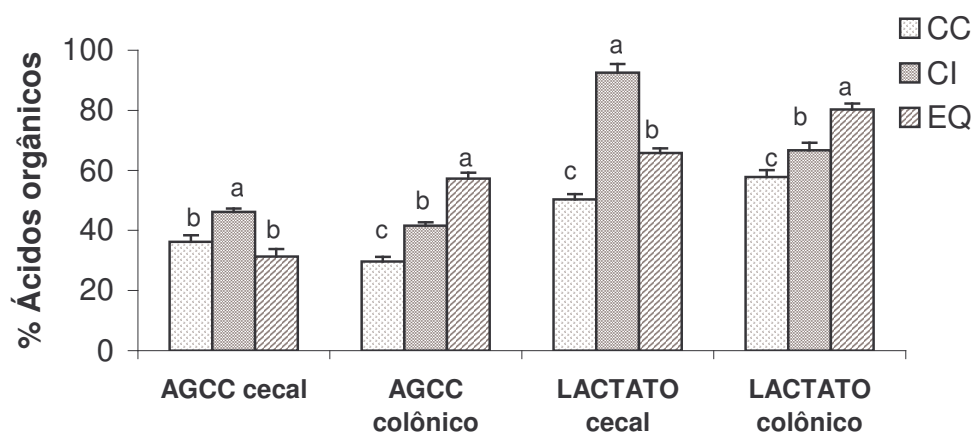


Figura 14. Porcentagem da média dos AGCC e lactato no ceco e cólon dos ratos após 14 e 28 dias de tratamento. Barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$); **CC:** controle celulose; **CI:** controle inulina; **EQ:** experimental quiabo.

Os resultados mostraram que somente os AGCC cecais do grupo EQ foram estatisticamente iguais aos do CC, e o lactato cecal do grupo CI, 26% superior ao EQ e este, por sua vez, 24% superior ao grupo CC. No cólon, os AGCC e o lactato apresentaram valores estatisticamente superiores ao grupo CC ($P < 0,05$), sobretudo ao grupo controle positivo (CI). De modo geral, os resultados demonstraram que a produção destes ácidos orgânicos foi efetiva para o grupo EQ, indicando que a fibra presente na farinha de quiabo favoreceu positivamente sua produção.

6.6. Estudo morfológico do íleo e cólon

Estudos realizados em países em desenvolvimento durante a década de sessenta, mostraram que indivíduos adultos sem manifestações clínicas gastrintestinais apresentavam alterações histológicas no intestino delgado e redução da capacidade de absorção da D-xilose, ao serem comparados com indivíduos adultos sadios moradores de países desenvolvidos. O primeiro destes estudos foi realizado por Sprinz et al. (1962), na Tailândia, mostrando que os indivíduos adultos estudados, apesar de apresentarem anormalidades na mucosa intestinal, não apresentavam sintomatologia alguma. Klipstein (1970) compilaram vários estudos realizados na Índia, Paquistão, Malásia, Nigéria, Egito, Israel, Vietnam, Haiti, México e Venezuela, no que se refere à morfologia. As anormalidades observadas no intestino delgado em todos estes estudos eram decorrentes principalmente da redução da altura das vilosidades intestinais.

Neste trabalho foi avaliado se as fibras alimentares provenientes de diferentes fontes poderiam afetar a morfologia intestinal (Figura 15) dos ratos Wistar. O estudo foi realizado com três animais de cada grupo alimentados com diferentes fontes de fibras. De cada animal foram retirados três segmentos para execução do bloco de parafina. Do bloco, três cortes de 6µm foram retirados deixando espaços entre eles de 100µm. Originaram-se assim três lâminas, sendo o total de 81 medidas da altura das vilosidades para cada grupo de animais em estudo, incluindo íleo e cólon.

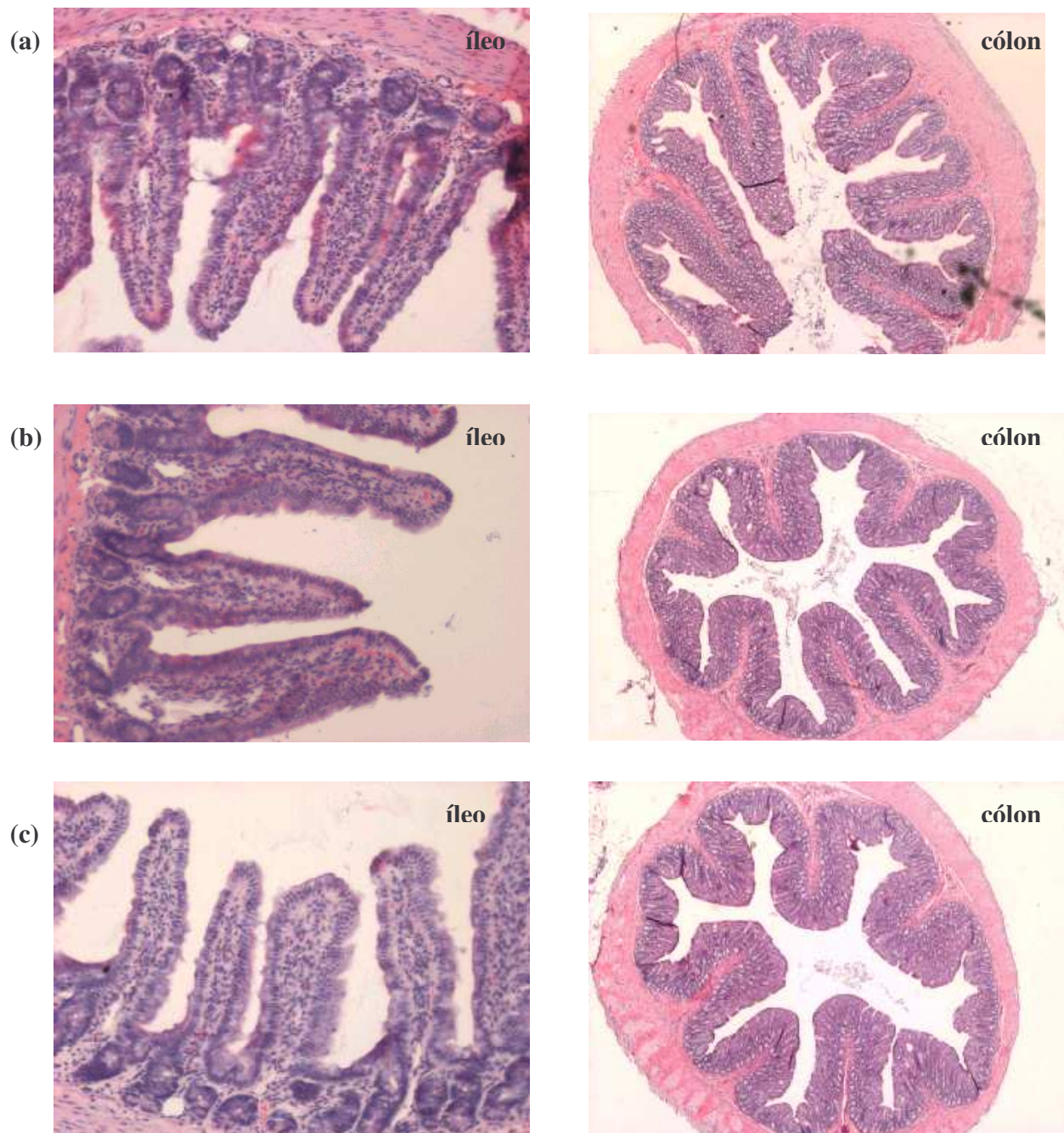


Figura 15. Fotomicrografias das vilosidades do íleo (aumento de 10X) e cólon (aumento de 2X) dos ratos Wistar aos 28 dias de tratamento. Grupos (a) controle celulose, (b) controle inulina, (c) experimental quiabo. Coloração por Hematoxilina – Eosina.

Os valores médios da altura foram tomados da base ao ápice da vilosidade. A histologia do íleo e cólon permaneceu normal para todos os tratamentos não tendo sido afetada pela fermentação. Os resultados das análises morfológicas para o íleo se encontram na Tabela 13. As alturas das vilosidades do íleo e cólon não apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$). Os valores aqui relatados são semelhantes aos encontrados por Kim (2002) em relação à inulina e à celulose. Para o cólon, as alturas das vilosidades do grupo EQ foram significativamente inferiores ($P < 0,05$) ao grupo CC (Tabela 13).

Tabela 13. Médias da altura das vilosidades (AV) na mucosa intestinal do íleo e cólon, após 28 dias de tratamento experimental.

GRUPOS	Íleo	Cólon
	Vilosidades (μm)	Vilosidades (μm)
CC	358,07 $\pm$ 40,42 ^a	861,37 $\pm$ 51,08 ^a
CI	389,79 $\pm$ 61,56 ^a	761,25 $\pm$ 56,27 ^{ab}
EQ	383,28 $\pm$ 40,89 ^a	662,01 $\pm$ 39,65 ^b

CC: controle celulose; **CI:** controle inulina; **EQ:** experimental quiabo. Valores médios, n=81 (número de campos avaliados, considerando 3 animais). Valores na mesma coluna com diferentes índices são significativamente diferentes, $P < 0,05$.

As observações realizadas neste estudo dão suporte à hipótese de Moore et al., (1988) e Kim (2002), de que a morfologia intestinal independe do tipo da fibra alimentar. Kim (2002) testou a hipótese de que propriedades físicas da fibra, como a viscosidade, poderiam ter efeito na morfologia do trato GI, para a qual não encontrou confirmação. De igual forma, nossos resultados também não confirmaram tal suposição.

6.7. Determinação de ácidos biliares fecais por cromatografia gasosa (CG)

Segundo Greenberger & Isselbacher (1998), quase todos os sais biliares conjugados são absorvidos no íleo, e depois de ter ingressado na veia porta, são submetidos à circulação êntero-hepática.

Dongowski et al. (2002) relataram que as alterações ocasionadas pela presença da fibra no intestino delgado, tais como viscosidade elevada, distúrbios na formação das micelas e digestão dos lipídeos, assim como reduções da absorção dos ácidos biliares são os principais fatores que elevam a concentração de ácidos biliares na partes inferiores do trato intestinal e também nas fezes.

A elevação nos níveis de ácidos biliares na região cecal é um reflexo do aumento dos ácidos transferidos do intestino delgado para o intestino grosso. Isto poderá resultar em grande excreção de ácidos biliares principalmente se não ocorrer absorção passiva no intestino grosso. Entretanto, a reabsorção do ácido biliar cecal pode também ser aumentada pela fermentação dos polissacarídeos em consequência do aumento na área superficial da mucosa cecal e do fluxo de sangue cecal (Favier et al., 1997).

O aumento da quantidade de ácido desoxicólico no cólon tem sido associado com a formação de pólipos, principalmente quando ocorre a presença de outro ácido biliar co-carcinogênico. Por outro lado, o ácido ursodesoxicólico apresentou efeito inverso em experimentos com ratos, onde o mesmo promoveu a redução de pólipos de cólon (Batta & Salen, 1999).

Neste estudo foi realizada a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar os ácidos biliares fecais. Os cromatogramas (Figura 16) mostraram picos de boa resolução principalmente para os ácidos biliares litocólico, desoxicólico e ursodesoxicólico. Os picos referentes aos ácidos cólico e quenodesoxicólico foram quantificados simultaneamente em razão da baixa definição de separação dos picos.

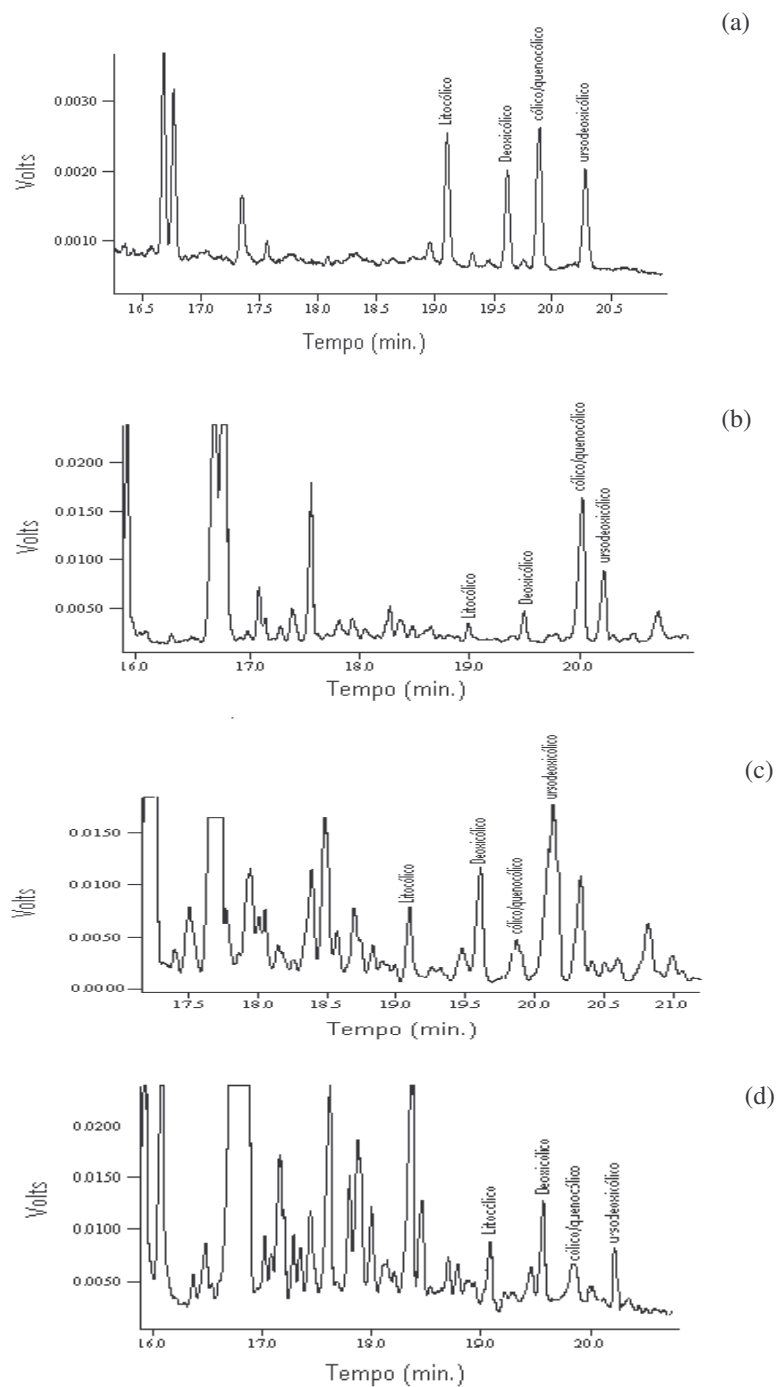


Figura 16. Cromatogramas dos ácidos biliares fecais (litocólico, desoxicólico, cólico/ quenodesoxicólico, ursodesoxicólico, com os respectivos tempos de retenção de 19,10; 19,60; 19,88 e 20,27 minutos), (a) padrão, (b) controle celulose, (c) controle positivo inulina, (d) experimental quiabo.

Os níveis de ácidos biliares totais foram calculados considerando as concentrações dos ácidos biliares individuais (Figura 17). Para o 14º dia, a soma de ácidos biliares foi de $10,89 \pm 1,11$ mmol/g de fezes para o grupo CC; $7,95 \pm 1,22$ para o CI e $8,58 \pm 1,01$ para o EQ. As concentrações obtidas para o 28º dia foram $11,16 \pm 1,44$; $8,58 \pm 1,31$; $8,86 \pm 0,99$ mmol/g de fezes para os grupos CC, CI e EQ, respectivamente. Estes valores não diferem entre si estatisticamente. Vale ressaltar que os ácidos secundários litocólico e desoxicólico apresentaram níveis superiores nos grupos CI e EQ comparados ao grupo CC.

Tanto no 14º como no 28º dia (Figura 17), os ácidos biliares primários, cólico e quenodesoxicólico apresentaram menores proporções no grupo EQ quando comparados ao grupo CC, sendo que os grupos CC e CI apresentaram valores estatisticamente iguais ($P > 0,05$). Finalmente podemos avaliar a concentração do ácido ursodesoxicólico, que apresentou níveis inferiores no grupo CI em relação ao CC, enquanto que o grupo EQ apresentou-se estatisticamente igual aos grupos CC e CI.

Após 28 dias de tratamento com as dietas experimentais, os grupos CI e EQ, mostraram quantidades iguais dos ácidos desoxicólico e superiores ao CC nas fezes, indicando que estes ácidos foram excretados em maiores quantidades, quando comparados ao grupo CC. Comparando os resultados verifica-se que houve maior excreção de ácidos biliares secundários para estes grupos, onde a produção dos ácidos biliares primários foi inferior em relação ao CC. Esta constatação nos leva a crer que a maior excreção dos metabólitos toxicogênicos provavelmente evitou sua permanência no lúmen e sua absorção pelas células da membrana intestinal, podendo tal efeito ser considerado como benéfico para os animais dos grupos CI e EQ. Concomitantemente, foi observado que o ácido ursodesoxicólico, considerado benéfico à saúde intestinal (Salen, 1988; Poupon et al., 1987; Earnest al., 1994), apresentou no grupo CI e EQ menor excreção fecal com relação ao CC. Nesse sentido, a fibra celulose apresentou maior eliminação de ácido ursodesoxicólico, o qual diminui a probabilidade de permanência e reabsorção deste ácido.

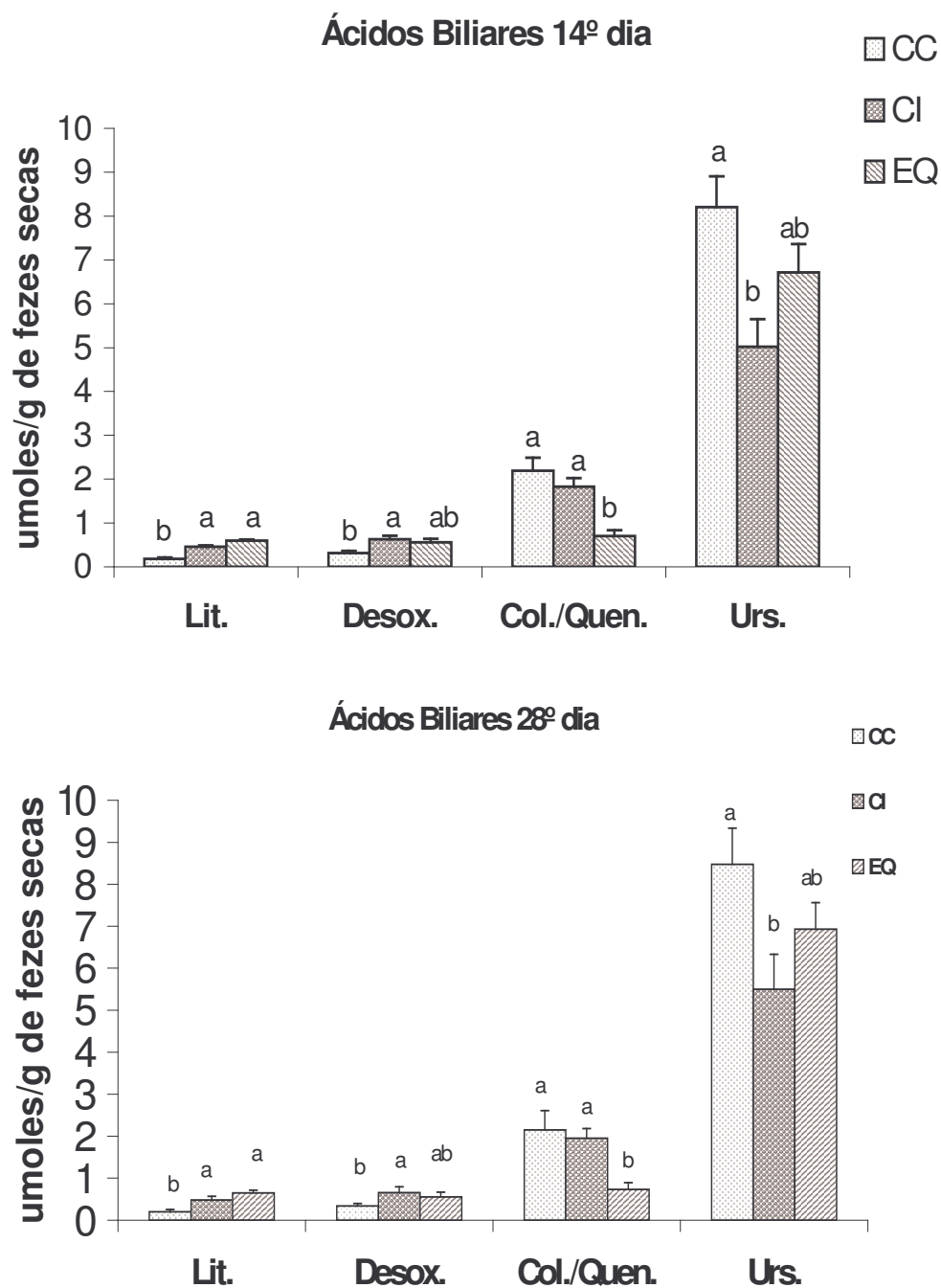


Figura 17. Concentrações de ácidos biliares primários e secundários nas fezes dos ratos, após 14 e 28 dias de tratamento. Os valores são médias $\pm$ desvio-padrão (n=10). Barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$); **CC:** controle celulose; **CI:** controle inulina; **EQ:** experimental quiabo e **Lit.:** litocólico; **Desox.:** desoxicólico, **Col./Quen.:** cólico/quenodesoxicólico, **Urs.:** ursodesoxicólico.

Owen (1997) relatou que a redução na proporção dos ácidos biliares secundários ocorre através da inibição parcial da enzima 7 α -desidroxilase das bactérias presentes no intestino, precisamente no ceco e cólon. O ácido cólico é convertido pelas bactérias em desoxicólico e o quenodesoxicólico em litocólico. Os ácidos biliares secundários, particularmente o desoxicólico e litocólico são considerados agentes carcinogênicos e toxigênicos. O ácido ursodesoxicólico apresenta supressão na taxa de formação de pólipos colônicos, quando utilizado na alimentação de ratos (Batta et al., 1998). Também tem sido relatado seu uso no tratamento de doenças hepatobiliares (Batta & Salen, 1999).

A fibra alimentar solúvel fermentada aumenta o número de bifidobactérias e lactobacilos e produz maior concentração de AGCC, especialmente o butirato. Ao butirato é atribuída a capacidade de inibir a transformação de ácidos biliares primários à secundários (Zampa et al., 2004), e sobretudo a fibra alimentar insolúvel liga-se aos ácidos biliares promovendo maior excreção pelas fezes, principalmente dos ácidos biliares secundários (Kahlon, Smith & Shao, 2005), exercendo efeito trófico na mucosa intestinal e beneficiando a saúde do hospedeiro; os resultados deste estudo revelam que a fibra alimentar do quiabo é constituída de 50% da fração insolúvel e 50% da solúvel, sendo esta característica positiva na promoção destes efeito fisiológicos.

6.8. Ensaio com os animais diabéticos (indução com estreptozotocina)

Antes do início do uso da insulina, o coma diabético era a causa de morte em pelo menos 2/3 dos pacientes com diabetes mellitus do tipo I, de qualquer idade. Porém, com a introdução da insulina em 1922, houve notável regressão nestes números, aumentando significativamente a longevidade dos pacientes. Mais de 70 anos após a introdução do tratamento do diabetes mellitus pela insulina, os diabéticos ainda morrem mais cedo do que os não-diabéticos. A taxa de mortalidade, por sexo e por idade, nos diabéticos é mais alta, em qualquer faixa etária, quando comparada à população normal. A diferença na taxa de mortalidade é, em parte, dependente da idade. Entre 20 e 40 anos de idade, o risco de morte

é mais de 10 vezes maior no diabético do tipo I do que em não-diabéticos, enquanto em diabéticos acima de 50 anos, é de apenas duas vezes. A causa de morte também está relacionada com a idade, pois em pacientes jovens a tendência é a morte por nefropatia, enquanto nos mais idosos é por doenças cardiovasculares (Brent & Sells, 1989).

Diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica crônica resultando de uma variedade de interações de hereditariedade e fatores ambientais e é caracterizado anormalidade no receptor ou pós-receptor da secreção de insulina, afetando o metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídeos, além de prejudicar fígado, rins e as células β do pâncreas (Baynes, 1991), o DM atinge uma grande proporção da população mundial (Zimmet & Alberti, 2001).

Nos Estados Unidos na década de 80, já existia mais de um milhão de pacientes com diabetes mellitus insulino-dependente. A incidência anual da doença é de 55 novos casos por milhão de população, ou 12.000 casos novos por ano. A maioria dos casos são crianças, embora em todas as faixas etárias existam grupos de risco (Harris & Hanaman, 1985; West, 1978). Na Inglaterra, o diabetes mellitus é a causa mais comum de cegueira, no período produtivo da vida. A retinopatia diabética é esperada em praticamente todos os diabéticos e pode ser detectada em aproximadamente 80% dos pacientes doentes por mais de 20 anos, e em 100% daqueles com 40 anos de doença diagnosticada (Krolewski et al., 1986). Em 1996, cerca de 30 milhões de pessoas afetadas viviam na América, mais de um quarto dos diabéticos do mundo. Para o ano de 2010, espera-se que chegue a 40 milhões. Deles, cerca de 20 milhões serão da América Latina e Caribe. No Brasil, a prevalência do diabetes mellitus é cerca de oito milhões de brasileiros. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que ao final do ano 2000 existiam 177 milhões de pessoas no mundo com diabetes; aproximadamente 10% das quais com diabetes tipo 1. No ano 2030, a OMS estima que o número total de pessoas com diabetes aumentará para 370 milhões (World Health Organization, 2006).

As razões deste crescimento devem-se ao aumento da expectativa de vida, tendo em conta que, quanto maior a idade; maiores as possibilidades do aparecimento desta doença, assim como, deve-se, também, ao estilo de vida moderno que é caracterizado por alimentação apressada, com alto teor de gordura e ao sedentarismo (Basile, 2006).

Neste estudo fez-se a indução do diabetes mellitus em ratos wistar, utilizando a estreptozotocina, a qual é derivada da fermentação do *Streptomyces achromogenes*. Sua estrutura está representada na Figura 18 e é similar à molécula de glicose. Esta droga foi primeiramente isolada como um novo antibiótico em 1956, o qual apresentava uma potente ação antimicrobiana para um amplo espectro de organismos (Lewis & Barbiers, 1960). Durante 1960 e 1961, estudo da atividade anti-carcinogênica investigada pelos laboratórios Upjohn Research Laboratories e Contract Laboratories of the National Cancer Institute, demonstraram efeito antitumor da droga, particularmente na leucemia L1210 (White, 1963). Estudos de tumores levaram a descobrir que estreptozotocina produzia hiperglicemia (Rakieten, Rakieten, Nadkarni, 1963). Posteriormente estudos toxicológicos utilizando cachorro e macacos *Rhesus* demonstraram o potencial diabetogênico (Carter, Broder, Friedman, 1971). Desde então a estreptozotocina tem sido utilizada como agente diabetogênico em experimentação animal por muitos pesquisadores (Singh, Kamath, & Rajini, 2004; Kumar et al., 2005; Sanchez et al., 2005).

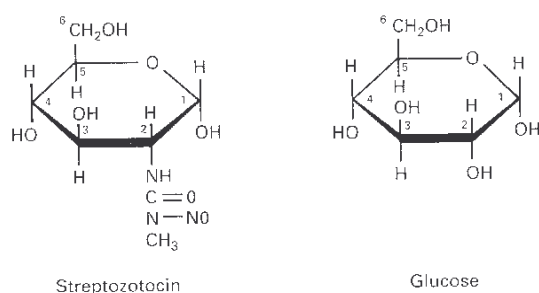
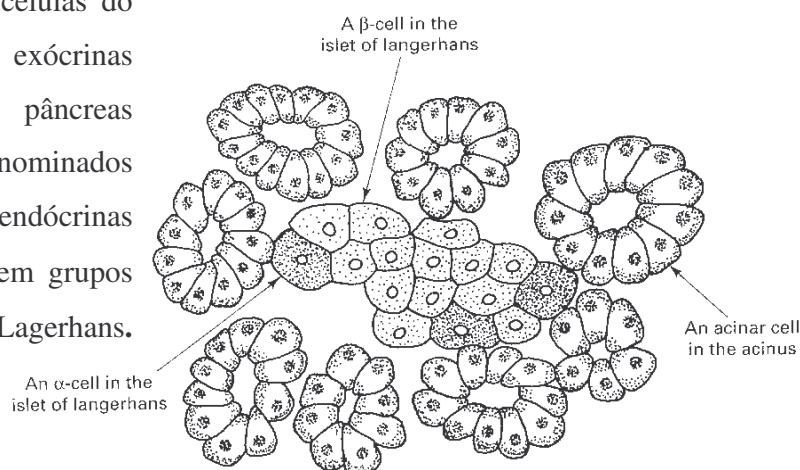


Figura 18. Estrutura molecular da estreptozotocina e glicose (Brody, 1996).

O arranjo das células acinares e das células α e β estão representados na Figura 19 (Guyton, 1971). O provável mecanismo de ação da estreptozotocina nas células β do pâncreas envolve o rompimento da ligação do DNA nas ilhas pancreáticas (Ilhotas de Langerhans) e estimula a polinuclear sintetase (ADP-ribose), levando ao esgotamento dos níveis intracelulares de NAD^+ e NADP^+ , os quais são responsáveis pela inibição da síntese da pró-insulina e conseqüentemente induzindo o diabetes (Brody, 1994; Wilson et al., 1988).

As espécies ativas de oxigênio, como superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\text{OH}^{\bullet}$) e o oxigênio singlete (1O_2), desempenham um importante papel no diabetes, especialmente na diabete angiopática (Sato et al., 1979). A ação citotóxica da estreptozotocina libera quantidades tóxicas de óxido nítrico que inibe a atividade da aconitase e participa dos danos ao DNA; em conseqüência as células β sofrem destruição por necrose (Szkudelski, 2001).

Figura 19. Arranjos das células do pâncreas. As células exócrinas (células acinares) do pâncreas ocorrem em grupos denominados acinos. As células endócrinas (células α e β) ocorrem em grupos denominados ilhotas de Langerhans.



Neste estudo foi avaliado o efeito da fibra do quiabo no metabolismo dos animais diabéticos. A dose do agente diabetogênico (estreptozotocina) utilizado neste estudo foi de

60mg.kg⁻¹; i.p., sendo este valor utilizado por Riva et al. (1998). Para o grupo alimentado com fibra celulósica, registrou-se uma taxa de mortalidade de 50%, enquanto que, para o grupo onde a fonte de fibra era a inulina, a taxa foi de 40% e, para o grupo em que a farinha de quiabo, a taxa foi 30%. Foi ainda constatado, que um dos animais deste último grupo não desenvolveu a condição hiperglicêmica, sendo, portanto excluído do estudo.

A indução do diabetes foi realizada em 10 animais de cada grupo, sendo que o saldo final de animais vivos foi: CCD: controle celulose diabético (n=5); CID: controle inulina diabético (n=6); EQD: experimental quiabo diabético (n=6). Cada um dos grupos tinha seu grupo controle paralelo com cinco animais, os quais receberam a mesma dose do veículo utilizado para solubilização da estreptozotocina, como descrito na seção de métodos. Estes grupos foram denominados: CCN: controle celulose normal, CIN: controle inulina normal; EQN: experimental quiabo normal.

6.8.1. Teste de tolerância à glicose

O teste de tolerância à glicose (TTG) indica a capacidade do paciente em utilizar uma quantidade específica de glicose, calculada em razão (g/kg) de massa corpórea (Krause & Mahan, 1996). O TTG foi introduzido como ferramenta de pesquisa em 1920, nos anos 1950 e 1960, utilizado com ênfase no diagnóstico e intervenção precoces, passou a ser largamente utilizado em todo o mundo no diagnóstico do Diabetes Melittus (John, 1922).

A determinação da glicose sanguínea foi realizada antes e após 30, 60 e 120 minutos da ingestão da solução de glicose. A Figura 20 mostra os resultados do TTG em animais submetidos à alimentação com dietas em estudo por dois meses, antes da indução da diabete. Podemos perceber que tanto antes como 30 minutos após a gavagem de glicose, os níveis glicêmicos estavam menores para os grupos; experimental quiabo normal sem fibra (EQNS) e experimental quiabo normal com fibra (EQNF); em seguida vieram os grupos controle inulina normal sem fibra (CINS) e controle inulina normal com fibra (CINF) e, por

último, os grupos controle celulose normal sem fibra (CCNS) e controle celulose normal com fibra (CCNF). Isto é um indicativo de que a fibra solúvel presente no quiabo exerceu a função de tornar a absorção de glicose menos eficiente na luz intestinal, fazendo com que o açúcar penetre no sangue mais lentamente (diminuição no tempo de esvaziamento gástrico), evitando desta maneira que não ocorra aumento em pico da insulina (Rocha, 1988; Pyorala & Steiner, 1996). Este fator pode também estar relacionado à viscosidade como acontece com sacarídeos solúveis não digeríveis de alta viscosidade tais como goma guar e pectina (Ou et. al., 2001; Tabatabai & Li, 2000).

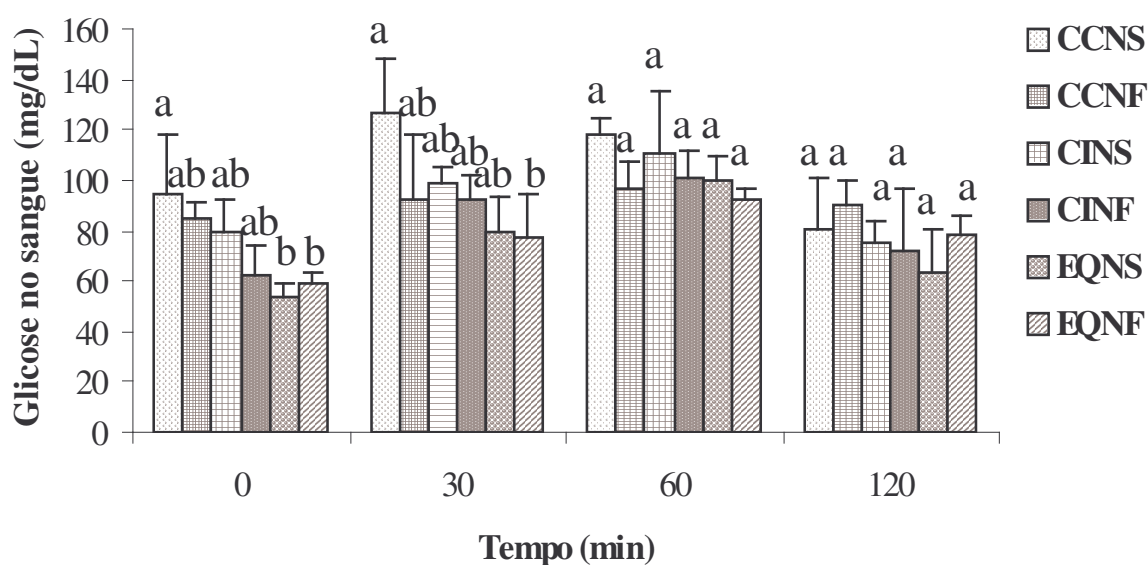


Figura 20. Efeito da dieta, no teste tolerância à glicose para ratos saudáveis, antes do tratamento com estreptozotocina. Barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$); **CCNS**: controle celulose normal sem fibra; **CCNF**: controle celulose normal com fibra; **CINS**: controle inulina normal sem fibra; **CINF**: controle inulina normal com fibra; **EQNS**: experimental quiabo normal sem fibra; **EQNF**: experimental quiabo normal com fibra.

Os valores médios obtidos nos testes feitos no 7º, 14º e 21º dia, estão representados na Figura 21 para os animais do grupo controle que receberam tampão citrato, os resultados demonstram que os níveis glicêmicos antes da gavagem com a glicose foram iguais estatisticamente. Aos 30 e 60 minutos após gavagem as concentrações glicêmicas elevaram-se em todos os grupos; retornado aos valores de jejum aos 120 minutos.

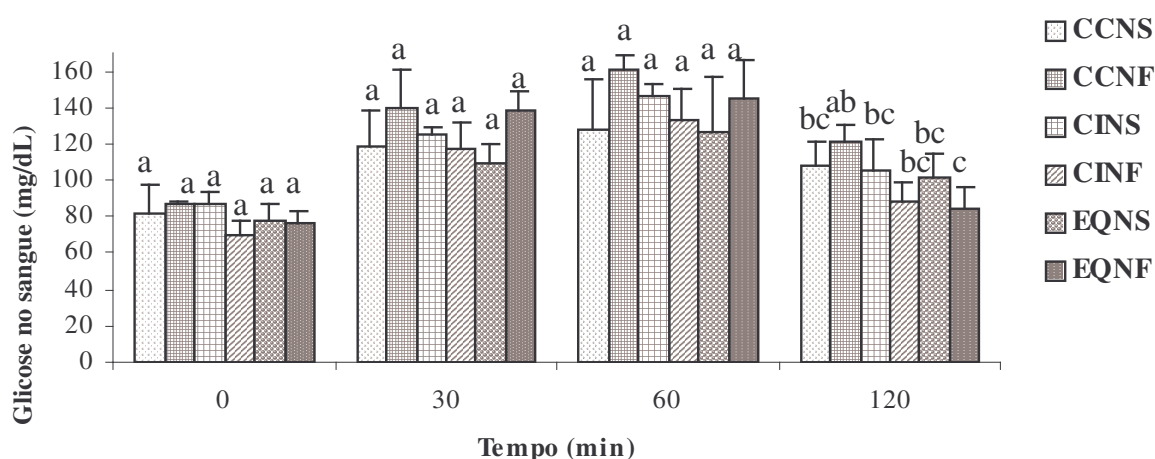


Figura 21. Efeito da dieta no TTG nos ratos saudáveis, que receberam tratamento com tampão citrato (placebo). Valores médios obtidos nos testes feitos no 7º, 14º e 21º dia. Barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$); **CCNS**:controle celulose normal sem fibra; **CCNF**:controle celulose normal com fibra; **CINS**:controle inulina normal sem fibra; **CINF**:controle inulina normal com fibra; **EQNS**:experimental quiabo normal sem fibra; **EQNF**:experimental quiabo normal com fibra.

Os valores médios obtidos nos testes feitos no 7º, 14º e 21º dia, estão representados na Figura 22 para os animais que receberam estreptozotocina e desenvolveram o diabetes, os resultados demonstraram que nos animais diabéticos os níveis glicêmicos foram altos após a ingestão da solução de glicose, apresentando valores mais elevados ($P > 0,05$) EQDS

e EQDF, indicando que a produção de insulina estava realmente prejudicada pela estreptozotocina, provavelmente a glicose não conseguiu ser captada pelos tecidos e conseqüentemente ser oxidada através do via glicolítica na célula para obtenção de energia, não podendo ser, portanto, convertida ou armazenada (Krause & Mahan, 1996) como acontecem nos animais saudáveis. Percebeu-se também que a fibra adicionada junto à solução de glicose durante a gavagem não promoveu proteção adicional a estes animais. Porém, aos 120 minutos houve retorno da concentração de glicose aos valores de pré-gavagem.

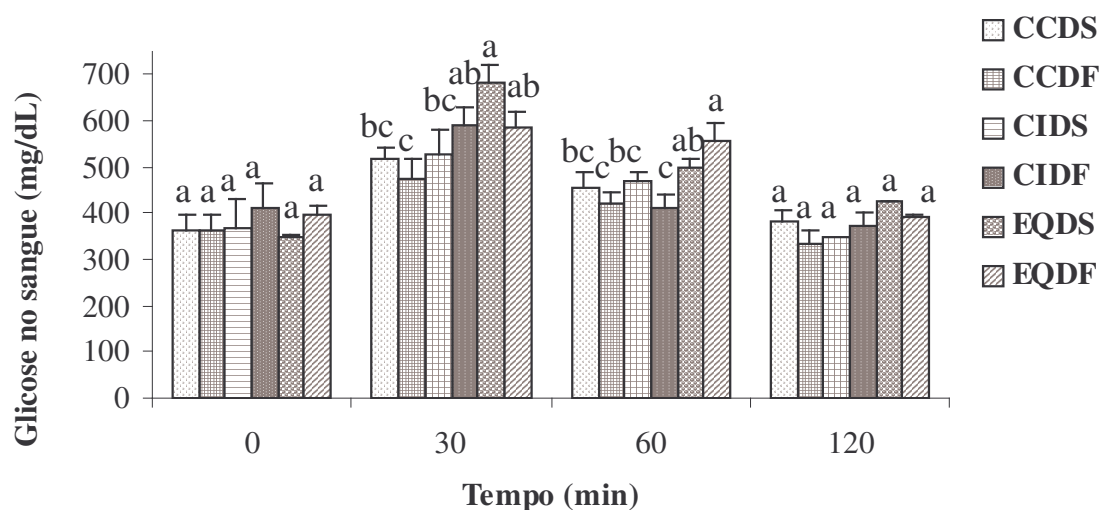


Figura 22. Efeito da dieta no teste de tolerância a glicose nos ratos diabéticos, após tratamento com estreptozotocina. Valores médios obtidos nos testes feitos no 7º, 14º e 21º dia. Barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$); **CCDS**: controle celulose diabético sem fibra; **CCDF**: controle celulose diabético com fibra; **CIDS**: controle inulina diabético sem fibra; **CIDF**: controle inulina diabético com fibra; **EQDS**: experimental quiabo diabético sem fibra; **EQDF**: experimental quiabo diabético com fibra.

Embora os gráficos (Figura 22) demonstrem recuperação dos ratos diabéticos para os níveis de glicemia em jejum, achou-se necessário fazer a correlação (Figura 23a, b, c) entre a glicemia em jejum e a glicemia após 120 minutos da gavagem de glicose, para

avaliar a relação entre estas duas medidas quantitativas, para os grupos CCD (n=15), CCI (n=18) e EQD (n=18). Os valores de “n” são referentes aos três períodos do TTG (7º, 14º e 21º dia), incluindo também os grupos que receberam 5% de fibras juntamente com a glicose.

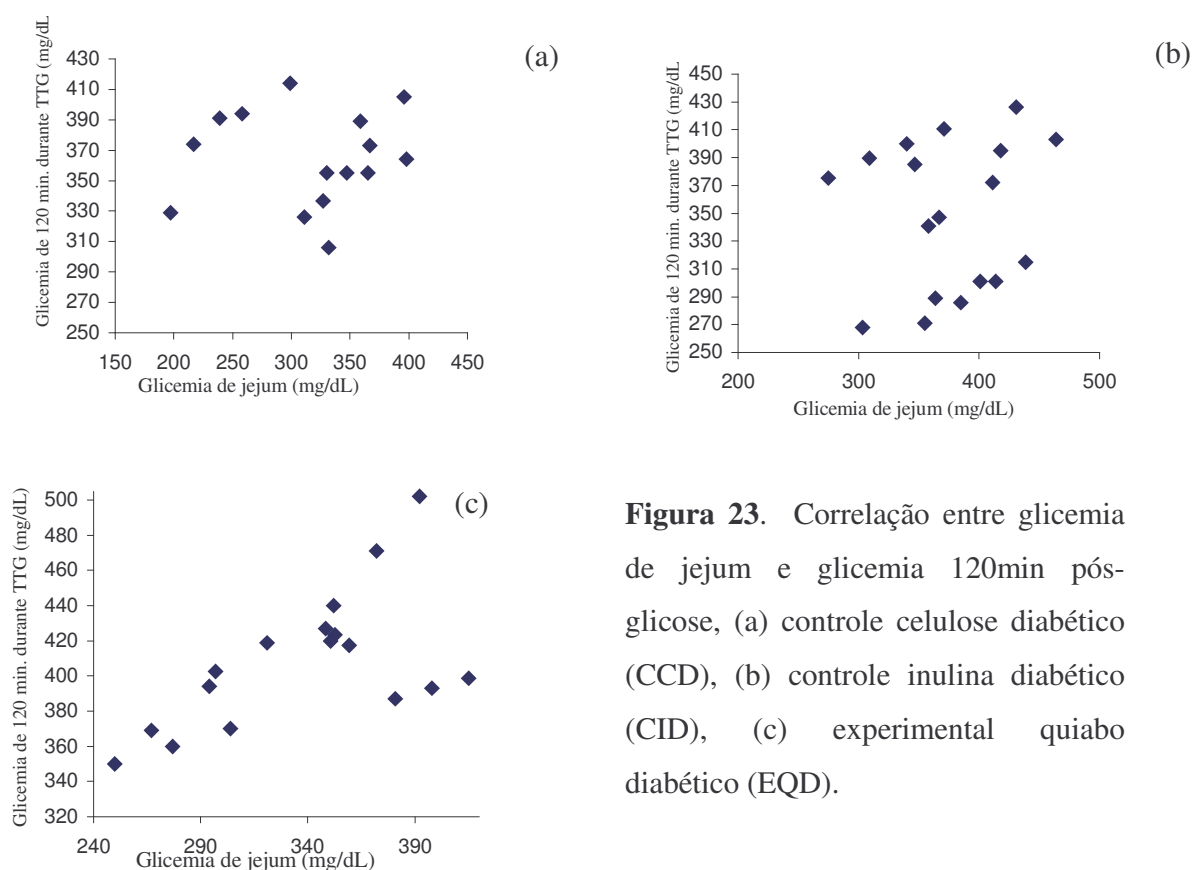


Figura 23. Correlação entre glicemia de jejum e glicemia 120min pós-glicose, (a) controle celulose diabético (CCD), (b) controle inulina diabético (CID), (c) experimental quiabo diabético (EQD).

Os resultados obtidos da correlação entre os valores de glicemia em jejum e a glicemia 120min após a gavagem de glicose, foram: CCD ($r=0,05$), CID ($r=0,13$) e EQD ($r=0,60$), estes valores demonstram a predominância de correlação positiva fraca e significativa ($P<0,05$) para os grupos CCD e CID, enquanto que para o grupo EQD a correlação foi positiva forte e significativa ($P<0,05$), isto significa que o grupo EQD foi o

que mais se aproximou dos valores da glicemia em jejum, confirmando a recuperação dos animais alimentados com fibra de quiabo aos níveis glicêmicos iniciais.

6.8.2. Parâmetro ponderal, consumo de dieta e água; excreção urinária e fecal.

Observa-se na figura 24, o perfil de ganho de peso durante 28 dias de tratamento. As curvas descrevem o ganho e a perda de peso para os animais normais e diabéticos respectivamente.

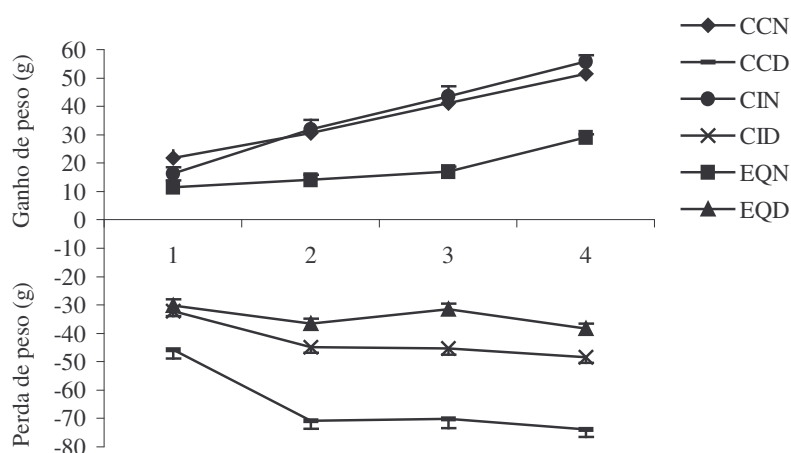


Figura 24. Ganho de peso semanal dos ratos normais e diabéticos (índices numéricos no eixo das abscissas equivalem ao número de semanas). **CCN:**controle celulose normal (n=5); **CCD:**controle celulose diabético (n=5); **CIN:**controle inulina normal (n=5); **CID:**controle inulina diabético (n=6); **EQN:**experimental quiabo normal (n=5); **EQD:**experimental quiabo diabético (n=6). Os dados estão reportados como média $\pm$ DP.

Na Figura 25, está representada a porcentagem de peso corporal de todos os tratamentos, sendo que no grupo CCN o ganho de peso foi de $15,71 \pm 1,50\%$; para o CIN foi de $18,45 \pm 1,20\%$ e para o EQN foi de $9,84 \pm 0,99\%$ em relação ao tempo inicial onde os animais estavam consumindo as dietas experimentais há 60 dias. Quando observamos a perda de peso nos ratos diabéticos, verificamos que houve uma perda maior ($20,75 \pm 1,30\%$)

para o grupo CCD. Para o grupo CID a taxa de perda de peso foi de $14,85 \pm 1,10$ e para o grupo EQD foi de $12,26 \pm 0,88\%$, o qual representou a menor perda de peso, sendo este valor igual ($p < 0,05$) estatisticamente ao CID.

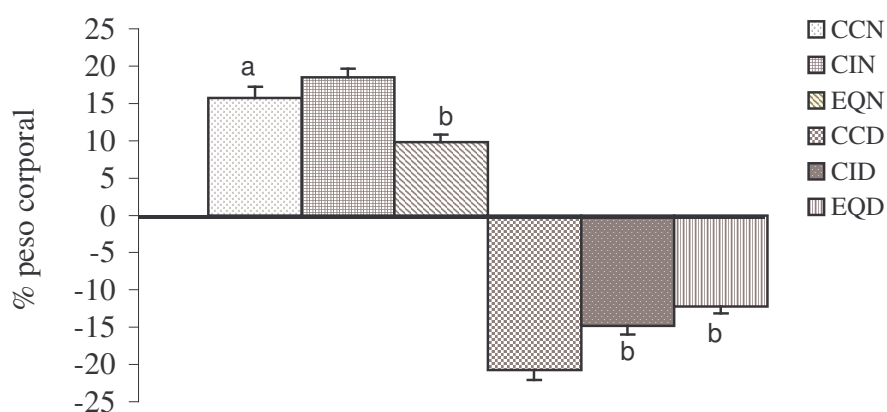


Figura 25. Porcentual de peso corporal dos ratos normais e diabéticos, ao final da 4ª semana de tratamento. **CCN:** controle celulose normal (n=5); **CCD:** controle celulose diabético (n=5); **CIN:** controle inulina normal (n=5); **CID:** controle inulina diabético (n=6); **EQN:** experimental quiabo normal (n=5); **EQD:** experimental quiabo diabético (n=6). Os dados estão reportados como média $\pm$ desvio-padrão. A comparação estatística foi realizada entre os animais normais e entre os diabéticos, sendo que as barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$).

Como era de se espera esperar (Tabela 14) nos grupos de animais sadios o tipo de dieta ingerida não afetou o consumo de dieta, excreção urinária e excreção fecal, no entanto, entre os animais diabéticos, somente o consumo de dieta foi igual estatisticamente, mas os demais parâmetros analisados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 14. Efeito da fibra nos consumos de água e dieta, excreção urinária e fecal, em ratos normais e diabéticos ao longo de 28 dias de experimento.

GRUPOS	Consumo de dieta (g/dia)	Consumo de água (mL/24h)	Excreção urinária (mL/24h)	Excreção fecal (g fezes secas/24h)
CCN	24,26±1,75 ^b	28,59±2,15 ^d	6,58±0,42 ^c	1,70±0,22 ^c
CCD	38,61±0,94 ^a	204,94±4,10 ^b	169,30±11,52 ^a	2,99±0,23 ^a
CIN	23,17±1,14 ^b	25,01±2,08 ^d	5,49±0,32 ^c	0,87±0,07 ^d
CID	35,09±1,77 ^a	222,15±3,13 ^a	189,07±15,51 ^a	1,27±0,21 ^{cd}
EQN	21,45±0,85 ^b	22,81±0,7 ^d	4,55±1,25 ^c	1,19±0,12 ^{cd}
EQD	32,45±1,53 ^a	144,82±5,40 ^c	115,07±10,74 ^b	2,17±0,13 ^b

CCN:controle celulose normal (n=5); CCD:controle celulose diabético (n=5); CIN:controle inulina normal (n=5); CID:controle inulina diabético (n=6); EQN:experimental quiabo normal (n=5); EQD:experimental quiabo diabético (n=6). Valores nas mesmas colunas com índices diferentes são significativamente diferentes, P<0,05.

Tem sido encontrado na literatura que dietas contendo quantidade adequada de fibra, principalmente solúvel, apresentam atividade sobre o mecanismo de várias doenças, incluindo diabetes (Nandini, Sambaiah, Salimath, 2000). A hiperfagia dos diabéticos foi acompanhada por aumento no consumo de água, sendo o maior volume de consumo para o grupo alimentado com inulina. Esta condição hiperfágica desenvolvida durante o diabetes já foi descrita por Kumar et al. (2002).

Neste estudo observaram-se sinais típicos de diabetes, como o aumento da ingestão de água (polidipsia), concomitante com a elevada excreção urinária (poliúria) nos grupos de ratos diabéticos, em comparação com os grupos normais. O grupo que recebeu a fibra de quiabo teve consumo de água aproximadamente 30% menor que os outros dois grupos. A excreção urinária, por sua vez, foi expressivamente maior no grupo CCD, seguida pelo grupo CID, ambos registrando diferença significativa (P<0,05), em relação ao EQD. Sendo

assim, a dieta contendo fibra de quiabo proporcionou aos animais uma excreção urinária 64,21% menor, em relação às médias dos grupos CCD com CID, em consequência de menor ingestão de água, sendo que o consumo de dieta foi igual estatisticamente entre os animais diabéticos, provavelmente a dieta contendo fibra de quiabo exerceu um forte efeito nestes animais, talvez proporcionando menor sede, talvez tal fato esteja relacionado à presença de alguns compostos bioativos que são veiculados pela fração fibra, como relatado no estudo de Kumar et al., (2005) utilizando mucilagem de feno grego (*Trigonella foenum graecum*) e gengibre da Índia (*Curcuma longa*), os ratos diabéticos apresentaram melhora relacionada ao consumo de água, ganho de peso corporal, excreção urinária, e atribuíram esta melhora à presença de algum composto bioativo, como isoleucina 4-hidroxil que é um novo aminoácido conhecido por facilitar a secreção de insulina (Sauvaire et al., 1998).

6.8.3. Final do período experimental

A hiperglicemia dos animais diabéticos não apresentou dependência do tipo de fibra na dieta (Figura 26) e a gordura epididimária para o grupo EQD foi bem menor ($P < 0,05$) em relação ao CCD e CCI, embora com relação à porcentagem de ganho de peso (Figura 25) o grupo EQD teve menos perda de peso em relação aos outros diabéticos. É importante ressaltar que em ratos diabéticos os níveis de gordura epididimária e renal são baixos, mas dependendo do grau de diabetes estes níveis podem chegar a zero, pois estas gorduras são fontes de energia, portanto utilizadas no metabolismo. Em valores percentuais, a gordura epididimária remanescente foi 48,95%; 44,72%; 42,15% para os grupos CCD, CID e EQD, respectivamente. Sendo que a hipertrofia dos testículos foram, CCD: 48,94%; CCI: 30,00% e EQD: 16,36%; estes resultados demonstram menor aumento dos testículos para o grupo EQD.

A gordura renal não apresentou diferença estatística entre os grupos de ratos diabéticos, mas os valores percentuais de gordura renal remanescente foram 18,67%, 30,76% e 42,15% para os grupos CCD, CID e EQD, respectivamente, demonstrando que o grupo EDQ conservou maior quantidade desta gordura. Estes resultados podem estar

diretamente ligados a quantidade de excreta urinária que foi menor para o grupo EQD, com menor funcionamento dos rins acarretando em menor consumo de energia. Os rins apresentaram significativa hipertrofia de 78,79%, 110% e 68,69%, para os grupos CCD, CID e EQD, respectivamente, demonstrando que o valor percentual para grupo EQD foi 10% inferior ao CCD e 31,31% ao CID. No estudo de Singh, Kamath & Rajini (2005), avaliando a fibra alimentar da casca de batata em ratos com diabetes induzida com estreptozotocina, constataram significativa redução da hipertrofia dos rins em 19% comparada ao grupo controle.

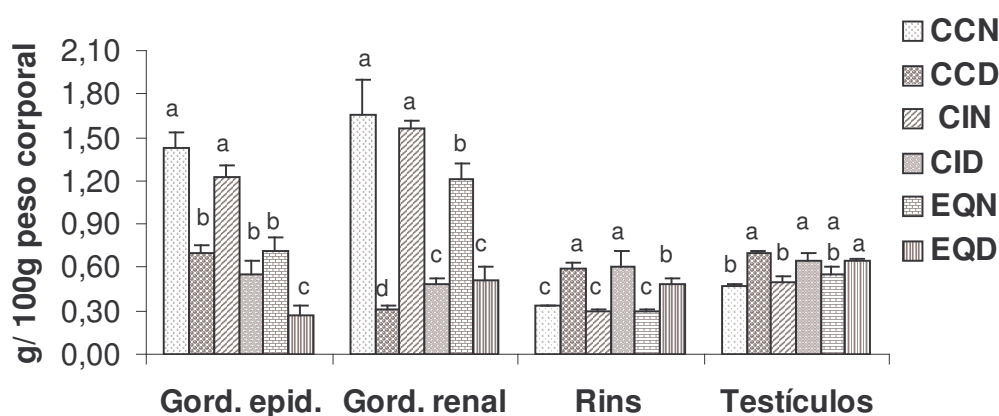


Figura 26. Efeito da dieta nas gorduras epididimárias, peri-renais, rins e testículos dos ratos normais e diabéticos. Barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$); **CCN**: controle celulose normal ($n=5$); **CCD**: controle celulose diabético ($n=5$); **CIN**: controle inulina normal ($n=5$); **CID**: controle inulina diabético ($n=6$); **EQN**: experimental quiabo normal ($n=5$); **EQD**: experimental quiabo diabético ($n=6$).

Na Tabela 15 observamos o diabetes mellitus não controlado independente do tipo de dieta, afeta todos os órgãos do organismo. Somente o baço não apresentou diferença estatística ($P < 0,05$). Com relação ao tamanho do ceco a maior massa foi verificada nos grupos CID e EQD, em relação ao grupo CCD ($P < 0,05$), provavelmente tanto a inulina

quanto à fibra do quiabo favoreceram maior atividade fermentativa, promovendo o aumento deste tecido. Guillon & Champ (2000), relataram que para pacientes com diabetes tipo-2, são recomendáveis dietas com baixo índice glicêmico com o objetivo de melhorar a prognose da doença, sendo a fibra considerada um componente da dieta que pode contribuir para a diminuição da hiperglicemia pós-prandial.

Tabela 15. Efeito de dietas com diferentes fontes de fibra na massa de órgãos (tecidos)

Tecidos	Massa do tecido (g/100g peso corporal)					
	CCN	CCD	CIN	CID	EQN	EQD
Intestino delgado	1,72±0,06 ^d	5,31±0,23 ^b	1,88±0,12 ^d	4,31±0,23 ^c	2,07±0,11 ^d	6,31±0,25 ^a
Intestino grosso	1,11±0,13 ^{cd}	1,88±0,16 ^a	0,90±0,10 ^d	1,38±0,04 ^{bc}	0,83±0,15 ^d	1,67±0,02 ^{ab}
Ceco	0,80±0,11 ^d	3,24±0,09 ^b	1,21±0,11 ^c	5,90±0,12 ^a	1,21±0,12 ^c	6,10±0,15 ^a
Fígado	2,70±0,24 ^b	3,77±0,10 ^a	2,70±0,07 ^b	3,94±0,13 ^a	2,57±0,14 ^b	3,76±0,06 ^a
Estômago	0,55±0,05 ^c	0,91±0,09 ^a	0,57±0,02 ^c	0,72±0,01 ^b	0,59±0,07 ^c	1,10±0,09 ^a
Pulmões	0,42±0,05 ^b	0,50±0,02 ^{ab}	0,41±0,04 ^b	0,54±0,03 ^a	0,43±0,04 ^b	0,48±0,01 ^{ab}
Pâncreas	0,27±0,10 ^{ab}	0,23±0,02 ^b	0,22±0,04 ^b	0,34±0,02 ^a	0,28±0,04 ^{ab}	0,34±0,05 ^a
Baço	0,20±0,02 ^a	0,22±0,01 ^a	0,23±0,02 ^a	0,22±0,02 ^a	0,20±0,02 ^a	0,22±0,04 ^a
Coração	0,30±0,02 ^c	0,45±0,01 ^a	0,30±0,01 ^c	0,35±0,01 ^b	0,30±0,01 ^c	0,36±0,02 ^b

CCN: controle celulose normal (n=5); **CCD:** controle celulose diabético (n=5); **CIN:** controle inulina normal (n=5); **CID:** controle inulina diabético (n=6); **EQN:** experimental quiabo normal (n=5); **EQD:** experimental quiabo diabético (n=6). Valores na mesma linha com índices diferentes são significativamente diferentes, $P<0,05$.

6.8.3.1. Concentrações de glicose e insulina sangüíneas

A glicemia (Figura 27) e insulina sérica (Figura 28) dos ratos normais e diabéticos foram determinadas no dia do sacrifício com a finalidade de verificar o efeito do tratamento com estreptozotocina nestes parâmetros. É pertinente ressaltar que todos estes animais se encontravam em jejum de 15 horas no momento do teste, pois estes resultados poderiam ser bem melhor interpretados se os animais não estivessem em jejum no momento do sacrifício. Apesar disso, pode ser observado que os níveis de insulina dos ratos normais dos grupos CI e EQ foram estatisticamente ($P<0,05$) superiores em relação ao grupo CC.

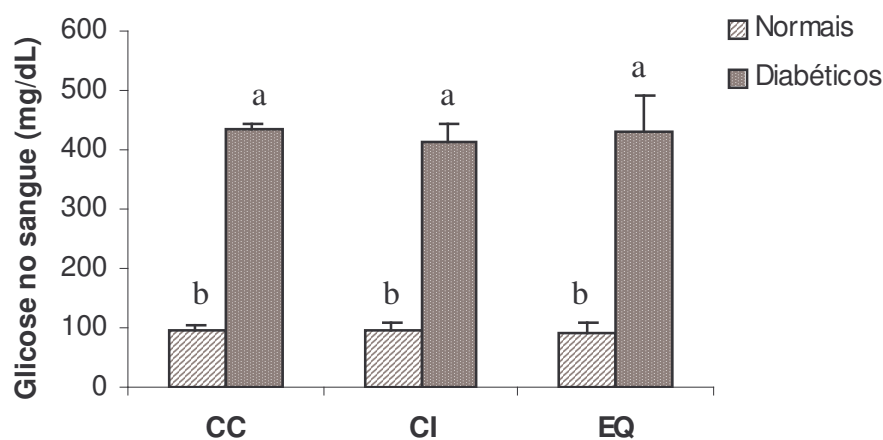


Figura 27. Valores médios de glicose sangüínea. Barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$); **CC**: controle celulose; **CI**: controle inulina; **EQ**: experimental quiabo.

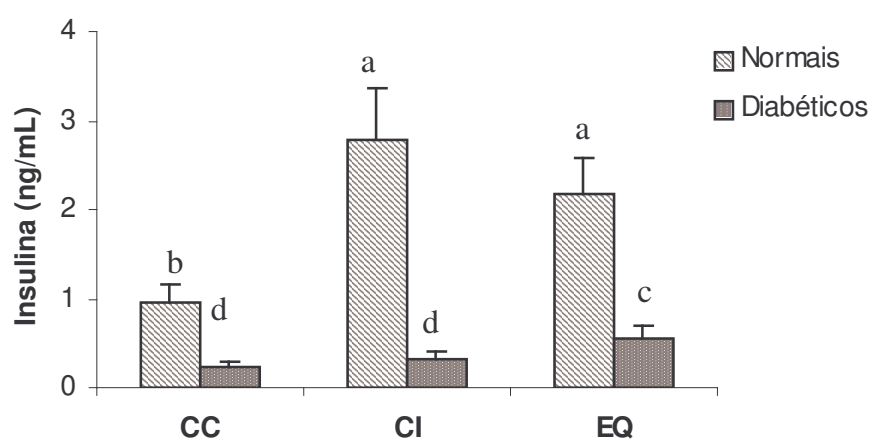


Figura 28. Valores de insulina sérica. Barras com letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$); **CC**: controle celulose; **CI**: controle inulina; **EQ**: experimental quiabo.

Nos ratos diabéticos, o tratamento com a fibra do quiabo (EQ) resultou numa taxa de insulina superior ao grupo tratado com inulina (CI). Este achado foi considerado muito importante, visto que a fibra do quiabo mostrou um efeito protetor das células- β nas ilhotas de Lagerhans, neste sentido, o assunto mereceria um estudo mais aprofundado.

Aparentemente, a farinha de quiabo introduziu um fator de proteção para o animal diabético. Com os dados coletados não é possível fazer uma análise detalhada do efeito encontrado. Não é possível afirmar se houve bloqueio parcial da ação tóxica da estreptozotocina sobre as células produtoras de insulina ou se houve compensação da condição pelo conteúdo do intestino. Seja qual for o mecanismo responsável pela alteração da condição diabética, os dados evidenciam certa resistência do animal alimentado com a farinha de quiabo ao desenvolvimento da hiperglicemia.

Os mecanismos pelos quais; dieta rica em fibras solúveis altamente fermentáveis proporcionam efeitos fisiológicos benéficos relacionados a redução da resistência à insulina permanecem desconhecidos, mas os resultados encontrados são bastante promissores e passíveis de maior conhecimento em pouco tempo.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram efetividade do quiabo quando adicionado à dieta para ratos saudáveis, em regular o trânsito intestinal, eliminar agentes carcinogênicos além de possuir alto poder fermentativo, exercendo efeito trófico sobre a mucosa intestinal dos animais saudáveis e diabéticos, e nos leva a supor que dietas contendo tais fibras poderão exercer efeito protetor no cólon, permitindo-nos a formular a hipótese de que o consumo deste vegetal poderá trazer efeitos benéficos à saúde humana.

7. CONCLUSÕES

1. O ganho de peso e o consumo de dieta foram inferiores para o grupo experimental (EQ) com relação aos grupos controle. Contudo estes parâmetros não afetaram a eficiência alimentar que foi igual ao grupo da celulose, demonstrando que o quiabo é um alimento de baixa caloria;
2. A excreção fecal úmida dos ratos alimentados com inulina representou 2g fezes/g de inulina ingerida com relação ao quiabo (3g fezes/g de fibra de quiabo ingerida), sendo que a quantidade de excreta fecal diretamente relacionada com o aumento da excreção da biomassa bacteriana como consequência da fermentação;
3. O trânsito intestinal apresentou valores médios menores (7,57 horas), sendo considerado um fator positivo, por constituir menor tempo de contato das fezes com a mucosa do trato gastrointestinal. Desta maneira, reduziria a exposição dos mesmos a metabólitos toxicogênicos responsáveis principalmente pela carcinogênese.
4. O menor tempo de trânsito intestinal, apresentado pelas dietas com fibra de quiabo poderia indicar sua utilização como auxiliar para minimizar a obstipação intestinal, no entanto, ocorreu um aumento do ceco e cólon, tanto em relação ao peso como no comprimento, provavelmente refletindo um maior processo fermentativo das fibras do quiabo pelas bactérias locais. Sem alterações morfológicas detectáveis à microscópio óptico.
5. Foi determinada a efetividade do quiabo sobre o crescimento das bifidobactérias, principalmente dos lactobacilos. As fibras solúveis provavelmente atuaram como meio seletivo para bactérias benéficas ao organismo, como as bifidobactérias e os lactobacilos;

6. A produção de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) e lactato colônico e cecal foi positiva, uma vez que a fibra do quiabo foi metabolizada seletivamente por um número limitado de bactérias benéficas presentes no intestino grosso, sendo capaz de alterar a população colônica para uma microbiota saudável.
7. A fibra do quiabo promoveu maior excreção de ácidos biliares toxicogênicos (litocólico e desoxicólico) e menor excreção dos benéficos;
8. O diabetes melito induzido pela estreptozotocina resultou em baixa massa corpórea, gorduras epididimárias e peri-renais; aumento da massa testicular, do intestino delgado, intestino grosso, ceco, fígado e estômago; hiperglicemia aumentou a ingestão alimentar e ingestão hídrica.
9. A dieta contendo fibra do quiabo provavelmente induziu uma resistência nos animais aos efeitos tóxicos da estreptozotocina tanto para tornarem-se diabéticos, quanto pela menor porcentagem de animais mortos no período de 48 horas pós-indução;

8. REFERÊNCIAS

ALADESANWA, R. D. Screenhouse evaluation of atrazine for soil residual activity on growth, development and nutritional quality of okra (*Abelmoschus esculentus* Moench) in southwester Nigeria. **Crop Protection**, v.24, p.927-931, 2005.

ANON, *Hibiscus esculentus*. <http://gears.tucson.ars.ag.gov/book/chap6/okra.html>. Acesso em: 22 de jan., 2003.

A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 17th, Rev. Ed . , Arlington-USA, 2000.

APRIKIAN, O.; DUCLOS, V.; GUYOT, S.; BESSON, C.; MANACH, C.; BERNALIER, A.; MORAND, C.; RÉNÉSY, C.; DEMIGNÉ, C. Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. **The Journal of Nutrition**, France, v. 133, p.1860-1865, 2003.

ARDAWI, M. S. M., NEWSHOLME, E. A. Fuel utilization in colonocytes of the rat. **Biochemical Journal**, England, v.231, n.3, p.713-719, 1985.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and pratice of histological techniques**. 2nd ed. Churchill Livingstone, 1982, 662p.

BASILE, M. C., **Diabetes: Uma pandemia em Crescimento:**
<http://boasaude.uol.com.br/lib/ShowDoc.cfm?LibDocID=3648&ReturnCatID=1764>. Acesso em: 21 jan./2006.

- BATTA, A. K.; SALEN, G.; BATTA, M.; EARNEST, D.; ALBERTS, D. Capillary gas-liquid chromatography of acetate-methyl esters of bile acids, **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.766, n.1-2, p. 286-291, Apr., 1997.
- BATTA, A. K.; SALEN, G.; HOLUBEC, H.; BRASITUS, T. A.; ALBERTS, D.; EARNEST, D. L. Fecal water-soluble fraction after feeding to rats with colon polyps. **Cancer Research**, Philadelphia, v.58, n.8, p.1684-1687, Apr., 1998.
- BATTA AK, SALEN G. Gas chromatography of bile acids. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v.723, n.1-, p.1-16, Feb., 1999.
- BATTA, A. K.; SALEN, G.; RAPOLE, K. R.; BATTA, M.; BATTA, P.; ALBERTS, D.; EARNEST, D. Highly simplified method for gas-liquid chromatographic quantitation of bile acids and sterols in human stool. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.40, n.6, p.1148-1154, June, 1999.
- BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complication of diabetes. **Diabetes**, v.40, p.405-412, 1991.
- BERG, R. D. Antagonism among the normal anaerobic bacteria of the mouse gastrointestinal-tract determined by immunofluorescence. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.35, n.6, p.1066-1073, June, 1978
- BERGMARK, S. Imunonutrition: Role of biosurfactants, fiber, and probiotic bacteria. **Nutrition**, New York, v.14, n.7-8, p.585-594, July-Aug., 1998.

- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. (Eds). Motilidade Gastrintestinal e Secreções Gastrintestinais in: **Physiology**, 5th ed . Tradutores: GRINBAUM, N, S et al., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.
- BHAT, U. R.; THARANATHAN, R. N. Functional-properties of okra (*Hibiscus esculentus*) mucilage. **Starch-Starke**, Deerfield Beach, v.39, n.5, p.165-167, May 1987.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. JUSKIEWICZ, J.; WRÓBLEWSKA, M. Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. **Food research International**, England, v.35, p.139-144,2002.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of the Biochemistry and Physiology**, v. 27, p. 911-917, 1959.
- BOBIN-DIBIGEON, C.; LAHAYE, M.; GUILLON, F.; BARRY, J. L., GALLANT, D. J. Factors limiting the biodegradation of *Ulva* sp cell wall polysaccharides. **Journal of the Science and Food Agriculture**, W Sussex, v.44, p.15-29, 1997.
- BOURDON, I., YOKOYAMA, W., DAVIS, P., HUDSON, C., BACKUS, R., RICHTER, D., KNUCKLES, B., SCHNEEMAN, B., O. Postprandial lipid, glucose, insulin, and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with beta-glucan. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.69, n.1, p.55-63, 1999.
- BRENT, L., SELLS, R., A. **Organ transplantation: current clinical and immunological** concepts. London: Baillière Tindall; 1989.

BRODY, T. (1994) Regulation of Energy Metabolism in: **Nutritional Biochemistry**. London: Academic Press; 1994, 658p.

BROWN, R. C.; KELLEHER, J.; LOSOWSKY, M.; S. Effect of pectin on the structure and function of the rat small-intestine. **British Journal of Nutrition**, Oxon, v.42, n.3, p. 357-365, 1979.

BUGAUT, M. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.86, n.3, p.439-472, 1987.

ÇALISIR, S.; ÖZCAN, M.; HACISEFEROGULLARI, H.; YILDIZ, M. U. A study on some physico-chemical properties of Turkey okra (*Hibiscus esculenta* L.) seeds. **Journal of Food Engineering**, Turkey, v.68, p.73-78, 2005.

CAMBRODÓN, I., G., MARTIN-CARRÓN, N. (2001) Fermentación Colónica de Fibra Dietética y Almidón Resistente in: Fibra Dietética En Iberoamérica: **Tecnología y Salud**, Brasil: Varela, p.311-338.

CANALE, A.; VALENTE, M. E.; CIOTTI, A. Determination of volatile carboxylic-acids (C1-C5i) and lactic-acid in aqueous acid-extracts of silage by high-performance liquid-chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, W Sussex, v.35, n.11, p.1178-1182, 1984.

CANDIDO, E. P. M.; REEVES, R.; DAVIE, J. R. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured-cells. **Cell**, Cambridge, v.14, n.1, p.105-113, 1978.

CARPITA, N. C.; KANABUS, J.; HOUSLEY, T. L. Linkage structure of fructans and fructan oligomers from triticum-aestivum and festuca-arundinacea leaves, **Journal of Plant Physiology**, Germany, v.134, n.2, p.162-168, Mar., 1989.

CARTER, S., K., BRODER, L., FRIEDMAN, M. Streptozotocin and metastatic insulinoma. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.74, n.3, p.445-446, 1971.

CAUSEY, J. L.; FEIRTAG, J. M.; GALLAHER, D. D.; TUNGLAND, B. C. SLAVIN, J. L. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. **Nutrition Research**, Oxford, v.20, n.2 p.191-201, Feb., 2000.

CHERBUT C. Role gastrointestinal motility un rhe delay of absorption by dietary fiber. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.49, p.574-580, 1995.

CHERBUT, C.; AUBE, A. C.; BLOTTIERE, H. M.; PACAUD, P.; SCARPIGNATO, C.; GALMICHE, J. P. In vitro contractile effects of short chain fatty acids in the rat terminal ileum. **Gut**, London, v. 38, p.53-58, 1996.

CHERBUT C. Motor effects of short-chain fatty acids and lactase in the gastrointestinal tract. **Proceedings of Nutrition Society**, Cambridge, v.62, p.95-99, 2003.

COCKRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental design**. 2.ed. New York: John Wiley, 1957, 611p.

CONNELL, A. M. effects of dietary fiber on gastrointestinal motor function. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.31, n.10, p.S152-S156, 1978.

CONWAY, P. L. ; GORBACH, S. L.; GOLDIN, B. R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **Journal Dairy Science**, Savoy, v.70, p.1-12, 1987.

CUMMINGS, J. H. Nutritional implications of dietary fiber. **The American Journal of Clinical Nutrition**. Bethesda, v.31, n.10, S21-S29, 1978.

CUMMINGS, J. H. Diet and short chain fatty acids in the gut. In: Hunter JO, Jones VA (eds.). **Food and the gut**. BalliPre Tindall. London 1985; 79-93.

CUMMINGS, J. H.; ENGLYST, H. N. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. **The American Journal of Clinical Nutrition**. Bethesda, v.45, n.5, p.1243-1255, Suppl. S, May, 1987.

CUMMINGS, J. H.; POMARE, E. W.; BRANCH, W. J.; NAYLOR, C. P.E.; MACFARLANE, G.T. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. **Gut**, London, v.28: p.1221-1227, 1987.

DE KOK, T., M., C., M., VAN FAASSEN, A., GLINGHAMMAR, B., PACHEN, D., M., F., A., RAFTER, J., J., BAETEN, C. G. M. I., ENGELS, L., G., J., B., LEINJANS, J., C., S. Bile acid concentrations, cytotoxicity, and pH of fecal water from patients with colorectal adenomas. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v.44, n.11, p.2218-2225, Nov., 1999.

DE LEENHEER, L. Production and use of inulin: industrial reality with a promising future, in: **Carbohydrates as organic raw materials III**, Workshop Wageningen, NL, 28-29/11/1994,

- DE LEEUW, J. A.; JONGBLOED, A. W.; VERSTEGEN, M. W. A. Dietary fiber stabilizes blood glucose and insulin levels and reduces physical activity in sows (*sus scrofa*). **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.134, p.1481-1486, 2004.
- DE LEEUW, J. A.; JONGBLOED, A. W.; SPOOLDER, H. A. M.; VERSTEGEN, M. W. Effects of hindgut fermentation of non-starch polysaccharides on the stability of blood glucose and insulin levels and physical activity in empty sows. **Livestock Production Science**, Netherlands, v.96, p.165-174, 2005.
- DE MAN, J., C., ROGOSA, M., SHARPE, M., E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, n.23, p.130-135, 1960.
- DEMIGNE, C.; REMESY, C. Stimulation of absorption of volatile fatty-acids and minerals in the cecum of rats adapted to a very high-fiber diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.115, n.1, p.53-60, 1985.
- DETERS, A. M.; LENGSELD, C.; HENSEL, A. Oligo- and polysaccharides exhibit a structure-dependent bioactivity on human keratinocytes in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, Germany, v.102, p.391-399, 2005.
- DIERICK N, 1991. Recent developments in pig feeding evaluation. **International Congress Pig Farming**. Bruselas, p.21-28, 1991.
- DONGOWSKI, G.; HUTH, M.; GEBHARDT, E.; FLAMME, W. Dietary fiber-rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.132, n.12, p.3704-3714, 2002.

DONGOWSKI, G.; LORENZ, A. Intestinal steroids in rats are influenced by the structural parameters of pectin. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Germany, v.15, p.196-205, 2004.

EARNEST, D. L., HOLUBEC, H., WALI, R. K., JOLLEY, C. S., BISSONETTE, M., BHATTACHARYYA, A. K., ROY, H., KHARE, S., BRASITUS, T. A. Chemoprevention of azoxymethane-induced colonic carcinogenesis by supplemental dietary ursodeoxycholic acid. **Cancer Research**, Philadelphia, v.54, n.19, p.5071-5074, Oct., 1994.

EASTWOOD, M. A. Vegetable fibre: its physical properties. **Proceedings of Nutrition Society**. Cambridge, v.32, p.137-143, 1973.

EL OUFIR L., FLOURIÉ, B., BRULEY DES VARANNES, S., BARRY, J. L., CLOAREC, D., BORNET, F., GLAMICHE, J. P. Relationships between transit time, fermentation products, and hydrogen consuming flora in healthy humans, **Gut**, London, n.38, p.870-877, 1996.

ENEROTH, P.; GORDON, B.; RYHAGE, R.; SJOVALL, J. Identification of mono- and dihydroxy bile acids in human feces by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.7, n.4, p. 511-519, 1966.

FAVIER, M. L.; BOST, P. E.; GUITTARD, C.; DEMINGNÉ, C.; RÉMÉSY C. Reciprocal influence of fermentations and bile acid excretion on cholesterol-lowering effect of fermentable carbohydrate. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.8, n.3, p.127-132, Mar., 1997.

- FRANKLIN, M. A.; MATHEW, A. G.; VICKERS, J. R.; CLIFT, R. A. Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age. **Journal Animal Science**, Savoy, v.80, n.11, p.2904-2910, Nov., 2002.
- FRIEND, D. W.; NICHOLSO, J. W.; CUNNINGH, H. M. Volatile fatty acid and lactic acid content of pig blood. **Canadian Journal of Animal Science**, Canada, v.44, n.3, p.303-310, 1964.
- GIBSON, G., R.; BEATTY, E., R.; WANG, X.; CUMMINGS, J., H. Selective stimulation of bididobacteria in the colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**. Philadelphia, v.108, p.975-982, 1995.
- GIBSON, G., R.; ROBERFROID, M., B. Dietary modulation of the human colonic microbiota - Introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**. Bethesda, v.125, n.6, p.1401-1412, Jun., 1995.
- GIBSON, G. R.; WANG, X. Enhancement of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using contínuos culture. FEMS. **Microbiological Letters**. v.118, p.121-128, 1994.
- GOMES, A, M., P.; MALCATA, F., X. Bifidobacterium ssp and Lactobacillus acidophilus: biochemistry, tecnological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.10, n.4-5, p.139-157, 1999.
- GORBACH, S. L.; GOLDIN, B. R. Nutrition and the gastrointestinal microflora. **Nutrition Reviews**. Lawrence, v.50, n.12, p.378-381, Dec., 1992.

GOSWAMY, S.; MANI, I.; MANI, U. V. Effect Of Wheat Bran Fiber on Tissue-Lipids In Diabetic Rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**. New Delhi, v.22, n.4, p.240-243, 1985.

GLORE, S. R.; TREECK, D.V.; KNEHANS, A. W. Solube Fiber and Serum Lipids: a Literature Review. **International Journal Am. Diet. Assoc.**, v.94, n.4, p.425-436. 1994.

GREENBEGER, N. J.; ISSELBACHER, K. J. **Distúrbios da Absorção** in: Harrison; ed. FAUCI, A. S. Medicina Interna, 14th, Mc Graw Hill, 1998.

GUERRANT, G. O.; LAMBERT, M. A.; MOSS, C. W. Analysis of short-chain acids from anaerobic-bacteria by high-performance liquid-chromatography, **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.16, n.2, p.355-360, 1982.

GUILLON, F.; CHAMP, M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. **Food Research International**. Amsterdam, v. 33, n.3-4, p.233-245, 2000.

GUYTON, A. C. **Textbook of Medical Physiology**, 4th ed., p.915, W. B. Saunders, Philadelphia, 1971.

HAENEL, H. Human normal and abnormal gastrointestinal flora. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.23, n.11, p.1433-1441, 1970.

HAMDAN, I. Y., MIKOLAJC, E. M. Acidolin - antibiotic produced by lactobacillus-acidophilus. **Journal of Antibiotics**. Tokyo, v.27, n.8, p.631-636, 1974.

HARA, H.; KONISHI, A. KASAI, T. Contribution of the cecum and colon to zinc absorption in rats, **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.130, p.83-89, 2000.

HARRIS, M., J. HANAMAN, R., F. **Diabetes in America**. Bethesda, Maryland: NIH Publication; 1985.

HENTGES, D. J.; MARSH, W. W.; PETSCHOW, B. W.; THAL, W. R.; CARTER, M. K. Influence of infant diets on the ecology of the intestinal-tract of human flora associated mice. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v.14, n.2, p.146-152, Feb., 1992.

HILL, M. J. Bacterial fermentation of complex carbohydrate in the human colon. **European Journal of Cancer Prevention. London**, v.4, n.5, p.353-358, Oct., 1995.

HOVERSTAD, T, Studies if short-chain fatty acid adsorption in man. **Escandinavian Journal Gastroenterology**, Norway, v.21, p.257-260, 1986.

IMOTO, S.; NAMIOKA. S. VFA Production in the pig large-intestine. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.47, n.2, p.467-478, 1978.

JENKINS, D. J. A.; KENDALL, C. W. C.; VUKSAN, V. Inulin, oligofructose and intestinal function. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.129, n.7S, p.1431S-1433S, suppl., July, 1999.

JOHN, H. J. Glucose tolerance and its value in diagnosis. **Journal Metab. Research**, v.1, p.497-548, 1922.

KAHLON, T. S.; SMITH, G. E. SHAO, Q. In vitro binding of bile acids by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*), black gram (*Vigna mungo*), bengal gram (*Cicer arietinum*) and moth bean (*Phaseolus aconitifolius*), **Food Chemistry**, USA, v.90, p.241-246, 2004.

KELLY-QUAGLIANA, K. A.; NELSON, P. D.; BUDDINGTON, R. K. Dietary oligofructose and inulin modulate immune functions in mice. **Nutrition Research**. Oxford, v.23, n.2, p.257-267, Feb., 2003.

KIM, M.; SHIN, H. K. The water-soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentrations, cecal short-chain fatty acid concentrations and fecal lipid excretion in rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.128, n.10, p.1731-1736, Oct., 1998.

KIM, M. The water-soluble extract of chicory affects rat intestinal morphology similarly to other non-starch polysaccharides. **Nutrition Research**, Oxford, v.22, n.11, p.1299-1307, Nov., 2002.

KIM, Y. I. Short-chain fatty acids in ulcerative colits. **Nutrition Reviews**, n.56, p.17/24, 1998.

KIM, Y. S., TSAO, D., SIDDIQUI, B., WHITEHEAD, J., S., ARNSTEID, P., BENNETE, J., HICKS, J. Effect of sodium-butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical-properties of human-colon cancer-cells. **Cancer**, New York, v.45, n.5, p.1185-1192, 1989.

KLIPSTEIN, F. A. "Recent Advances in Tropical Malabsorption". **Scandinavian Journal Gastroenterology**, Norway, Suppl.6, p.93-114, 1970.

KRAUSE, M. V.; MAHAN, L. K. **Digestion, Absorption, Transport, and Excretion of Nutrients**. In Food, Nutrition, & Diet Therapy. 9th edition, 1996, p.1194.

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. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Silver Spring, v.13, n.2, p.109-116, Mar.-Apr., 1989.

KROLEWSKI, A. S.; WARRAM, J. H.; RAND, L. I.; CHRISTLIEB, A. R.; BUSICK, E. J.; KAHN, C. R. Risk of proliferative diabetic-retinopathy in juvenile-onset type-i diabetes - a 40-yr follow-up-study. **Diabetes Care**, Alexandria, v.9, n.5, p.443-452, Sept.-Oct., 1986.

KUMAR, C. M.; RACHAPPAJI, K. S.; NANDINI, C. D.; SAMBAIAH, K.; SALIMATH, P. V.; Modulatory effect of butyric acid - a product of dietary fiber fermentation in experimentally induced diabetic rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Mysore, v.13, p.522-527, 2002.

KUMAR, G. S.; SHETTY, A. K.; SAMBAIAH, K.; SALIMATH, P. V. Antidiabetic property of fenugreek seed mucilage and spent turmeric in streptozotocin-induced diabetic rats. **Nutrition research**, Mysore, v. 25, p. 1021-1025, Sept., 2005.

LANE, J.H.; EYNON, L. **Determination of reducing sugar by fehling's solution with methylene blue indicator**. London: Norman Rodge, 1934. 8p.

LECLERE, C. J.; CHAMP, M.; BOILLOT, J.; GUILLE, G.; LECANNU, G.; MOLIS, C.; BORNET, F.; KREMPF, M.; DELORTLAVAL, J.; GALMICHE, J. P.; Role of viscous guar gums in lowering the glycemic response after a solid meal. **The American Journal of Clinical Nutrition**. Bethesda, v.59, n.4, p.914-921, Apr., 1994.

LENGSFELD, C.; TITGEMEYER, F.; FALLER, G. HENSEL, A. Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1495-1503, 2004.

LESER, T. D.; AMENUVOR, J. Z.; JENSEN, T. K.; LINDECORONA, R. H.; BOYE, M.; MOLLER, K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.2, p. 673-690, Feb.; 2002.

LEVRAT, M. A.; REMESY, C.; DEMIGNE, C. High propionic-acid fermentations and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin. **The Journal of Nutrition**. Bethesda, v.121, n.11, p.1730-1737, Nov., 1991.

LEWIS. B. A. Physical and biological properties of structural and other nondigestible carbohydrates. **The American Journal of Clinical Nutrition**. Bethesda, v.31, n.10, p.S82-S85, 1978.

LEWIS, C., BARBIERS, A. R. Streptozotocin, a new antibiotic in vitro and in vivo evaluation. **Antibiot Ann.**, n.22, p.247-254, 1960.

LÓPEZ, G.; ROS, G.; RINCÓN, F.; PERIAGO, M. J.; MARTÍNEZ, C.; ORTUÑO, J. Propiedade funcionales de la fibra dietética. Mecanismos de acción en el tracto gastrointestinal. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v.47, n.3, p.203-207, Set, 1997.

MACFARLANE, G. T.; GIBSON, G. R.; CUMMINGS, J. H. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. **Journal of Applied Bacteriology**. Oxon, v.72, n.1, p.57-64. Jan., 1992.

MACRAE, R.; ROBINSON, R. K.; SADLER, M. J. **Encyclopaedia of Food Science Food Technology and Nutrition**, vol.7. Academic Press. p.4740-4741, Great Britain, 1993.

MAY, T.; MACKIE, R. I.; FAHEY, G. C.; CREMIN, J. C.; GARLEB, K. A. Effect of fiber source on short-chain fatty-acid production and on the growth and toxin production by clostridium-difficile. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. Norway. v.29, n.10, p.916-922, Oct., 1994.

MELLO, M. A. R.; LUCIANO, E. Effects of protein malnutrition on glucose tolerance in rats with alloxan-induced diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brasil, v.28, n.4, Apr., 1995.

MCBURNEY, M. I.; SAUER, W. C.; Fiber and large-bowel energy-absorption - validation of the integrated ileostomy-fermentation model using pigs **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.4, p.721-727, Apr., 1993.

MCDUGALL, G. J.; MORRISON, I. M. STEWART, D., HILLMAN, J. R. Plant cell walls as dietary fibre: Range, dtructure, processing and function. **Journal Science and Food Agriculture**. v.70, p.133-150, 1996.

MITSUOKA, T., KANEUCHI, C. Ecology of bifidobacteria. **American Journal of Clinical Nutrition**. Bethesda, v.30, n.11, p.1799-1810, 1977.

MONTAGNE, L.; PLUSKEM J. R.; HAMPSON, D. J. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. **Animal Feed Science and Technology**. Netherlands. v.108, n.1-4, p. 95-117, Aug., 2003.

MONTE, M. J.; PALOMERO, F.; SAINZ, G. R.; DOMINGUEZ, M.; DIEZ, M.; TORANO, A.; MARIN, J. J. G. **Bile acid secretion during rat liver carcinogenesis.** Life Sciences, Oxford. v.66, n.12, p.1085-1095, Feb., 2000.

MOORE, R. J.; KORNEGAY, E. T.; GRAYSON, R. L.; LINDEMANN, M. D.; Growth, nutrient utilization and intestinal morphology of pigs fed high-fiber diets **Journal of Animal Science.** Savoy, v.66, n.6, p.1570-1579, June, 1988.

MUDD, D. G.; MCKELVEY, S. T. D.; NORWOOD, W.; ELMORE, D. T.; ROY, A. D. Fecal bile-acid concentrations of patients with carcinoma or increased risk of carcinoma in the large bowel. **Gut**, London, v.21, n.7, p.587-590, 1980.

MUNOA, F.; J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of Bifidobacterium spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.7, p.1715-1718, 1988.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. ^a Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Critical reviews in Food Science and Nutrition.** Boca raton, v.38, n.1, p. 13-126, 1999.

NANDINI, C. D.; SAMBAIAH, K.; SALIMATH, P. V. Effect of dietary fibre on intestinal and renal disaccharidases in diabetic rats. **Nutrition Research.** Oxford, v.20, n.9, p.1301-1307, Sept., 2000.

NDJOUENKEU, R.; GOYCOOLEA, F. M.; MORRIS, E. R.; AKINGBALA, J. O. Rheology of okra (*Hibiscus esculentus* L.) and dika nut (*Irvingia gabonensis*) polysaccharides. **Carbohydrate Polymers.** Oxford, v.29, n.3, p.263-269, Mar., 1996.

- NORDGAARD, I.; MORTENSEN, P. B.; Digestive processes in the human colon. **Nutrition Syracuse**, v.11, n.1, p. 37-45, Jan.-Feb., 1995.
- OCHSENKUHN, T.; BAYERDORFFER, E.; MEINING, A.; SCHINKEL, M.; THIEDE, C.; NUSSLER, V.; SACKMANN, M.; HATZ, R.; NEUBAUER, A. PAUMGARTNER, G. Colonic mucosal proliferation is related to serum deoxycholic acid levels. **Cancer**. New York, v.85, n.8, p.1664-1669, Apr., 1999.
- OTAKA, M., SINGHAL, A., HAKOMORI, S. Antibody-mediated targeting of differentiation induces to tumor cells: Inhibition of colonic cancer cell growth in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v.158, n.1, p.202-208, Jan., 1989.
- OU, S.; KWOK, K.; LI, Y.; FU, L. In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.1026-1029, 2001
- OWEN, R. W. Faecal steroids and colorectal carcinogenesis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v.32, (suppl. 222). p.76-82, 1997.
- OYELADE, O. J.; ADE-OMOWAYE, B. I. O.; ADEOMI, V. F. Influence of variety on protein, fat contents and some physical characteristics of okra seeds. **Journal of Food Engineering**, v.57, p.111-114, 2003.
- PACHECO, M., T., B., SGARBIERI, V., C. (2001). Fibra e Doenças Gastrointestinais in: Fibra Dietética En Iberoamérica: **Tecnologia y Salud**. Brasil: Varela, p.385-397.

- PACHER, B., KNEIFEL, W. Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. **International Dairy Journal**, Barking, v.6, p.43-64, 1996.
- PAYNE, T. J. The role of raisins in high-fiber muesli-style formulations. **Cereal Foods World**, Saint Paul, v.32, n.8 , p.545-547, Aug., 1987.
- PERIS, P. G.; LESMES, I. B.; COMPES, C. C.; ÁLVAREZ, C. Metabolismo colónico de la fibra. **Nutrición Hospitalaria**. v.17, (Sup.2), p.11-16, 2002.
- PHELPS C. F. Physical properties of inulin solutions. **Biochemical Journal**, England, v.95, .1, p.41-48, 1965.
- PITT, P.; DEBRUIJN, K. M.; BEECHING, M. F.; GOLDBERG, E.; BLENDIS, L. M. Studies on breath methane - the effect of ethnic-origins and lactulose, **Gut**, London. v.21, n.11, p.951-954, 1980.
- PRADA, F. J. A.; LUCIANO, E.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C.; MELLO, M. A. R. Protein deficiency attenuates the effects of alloxan on insulin secretion and glucose homeostasis in rats. **Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR**. New York, v.33, n.1, p.73-82, 2001.
- POUPON, R.; POUPON, R. E.; CALMUS, Y.; CHRETIEN, Y.; BALLEET, F.; DARNIS, F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary-cirrhosis. **Lancet**, London, v.1, n.8537, p.834-836, Apr., 1987.
- PYORALA, K.; STEINER, G. Will correction of dyslipoproteinaemia reduce coronary heart disease risk in patients with non-insulin-dependent diabetes? Need for trial evidence. **Annals of Medicine**, v.28 (4), p.357-362, June, 1996.

QU, Z. S.; LING, P. R.; TAHAN, S. R.; SIERRA, P.; ONDERDONK, A. B.; BISTRIAN, B. R. Protein and lipid refeeding changes protein metabolism and colonic but not small intestinal morphology in protein-depleted rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda. v.126, n.4, p.906-912, Apr., 1996.

RAKIETEN, N., RAKIETEN, M., L., NADKARNI, M., V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemotherapy Reports**, Bethesda, n.29, p.91-98, 1963.

RAO, A. V. Dose-response effects on inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.129, n.7S, p.1442S-1445S, Suppl., July, 1999.

RASIC, J. L.; KURMAN, J. A. **Bifidobacteria and their role**. Birkhauser Verlag, Basel Switzerland, 1983.

REEVES, P. G., NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. Jr. 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. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, p.1939-1951, 1993.

RIVA, E.; ANDREONI, G.; BIANCHI, R.; LATINI, R.; LUVARA, G.; JEREMIC, G.; TRAQUANDI, C.; TUCCINARDI, L. Changes in diastolic function and collagen content in normotensive and hypertensive rats with long-term streptozotocin-induced diabetes. **Pharmacological Research**. London, v.37, n.3, p.233-240, Mar., 1998.

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

ROBERFROID, M. B. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: Chicory fructooligosaccharides. **Nutrition Reviews**. Lawrence, v.54, n.11 (part-II), p.S38-S42, Nov., 1996

ROBERTSON, J. A. EASTWOOD, M. A. An examination of factors which may affect the water holding capacity of dietary fibre. **British Journal of Nutrition**, v.45, p.83-88, 1980.

RODRIGUEZ-MORAN, M., GUERRERO-ROMERO, F., LAZCANO-BURCIAGA, G., Lipid- and glucose-lowering efficacy of Plantago Psyllium in type II diabetes. **Journal of Diabetes and its Complications**, New York, v.12, n.5, p.273-278, Sept.-Oct., 1998.

ROCHA, D. M. Problemas do paciente diabético. **Revista Brasileira de Medicina**, Brasil, v.45. p.205-207, 1988.

ROEDIGER, W. E. The effect of bacterial metabolites on nutrition of colonic mucosa. Symbiosis between man and bacteria. In: Kasper H, Goebell H (eds.). **Colon and Nutrition**. Falk Symposium 32. Lancaster: MTP Press Limited, 1982; p.11-12.

ROEDIGER, W. E. W.; MOORE, A. Effect of short-chain fatty-acid on sodium-absorption in isolated human-colon perfused through the vascular bed. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v.26, n.2, p.100-106, 1981.

ROEDIGER, W. E. W. Utilization of nutrients by isolated epithelial-cells of the rat colon. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.83, n.2, p. 424-429, 1982.

- ROMBEAU, J. L., KRIPKE, S. A. Metabolic and intestinal effects and short-chain fatty-acids. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Silver Spring n.14, v.5, p.S181-S185, Suppl., Oct., 1990.
- ROWLAND, I. R. “**Role of the Gut Flora in Toxicity and Cancer**” Academic Press, New York. 1988.
- RUPPIN, H.; BARMEIR, S.; SOERGEL, K. H.; WOOD, C. M.; SCHMITT, M. G. Absorption of short-chain fatty-acids by the colon. **Gastroenterology**, Philadelphia v.78, n.6, p.1500-1507, 1980.
- RURALNEWS, **O Quiabo**: <http://ruralnews.terra.com.br/agricultura/horta/quiabo.htm>. Acesso em: 26 jul./2001.
- SANCHEZ, O. A.; SNOW, L. M.; LOWE, D. A.; SERFASS, R. C.; THOMPSON, L. V. Effects of endurance exercise-training on single-fiber contractile properties of insulin-treated streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Applied Physiology**, Minnesota, v.99, p.472-478, oct., 2005.
- SAUVAIRE, Y.; PETIT, P.; BROCA, C.; MANTEGHETTI, M.; BAISSAC, y.; FERNANDEZ, A. L. V. J. 4-Hidroxy isso-leucine, a novel amino acid potentiator of insulin secretion. **Diabetes**, v.47, p.206-210, 1998.
- SAKATA, T., YAJIMA, T. Influence of short chain fatty-acids on the epithelial cell division of digestive-tract. **Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences**, New York, v.69, n.3, p.639-648, 1984.

SALEN, G. Clinical perspective on the treatment of gallstones with ursodeoxycholic acid. **Journal of Clinical Gastroenterology** Philadelphia, v.10, n.S12-S17, Suppl. 2, 1988.

SATO, Y., HOTTA, N., SAKAMOTO, N., MATSUOKA, S., OHISHI, N., YAGI, K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic-patients. **Biochemical Medicine**, San Diego, v.21, n.1, p.104-107, 1979.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 31, p.107-133, 1977

SCHAPIRO, H.; CUMMINS, A. J.; LUCKEY, J. Dissociation between gastric secretion and motility. **American Journal Digestive Disease.**, v.10, p.:751-757, Sept., 1965.

SCHNEEMAN B. O. Dietary Fiber - Physical and chemical-properties, methods of analysis and physiological effects. **Food Technology**, Chicago, v.40, n.2, p.104-110, Feb., 1986.

SELLIN, J. H.; DESOIGMIE, R. Short-chain fatty-acid absorption in rabbit colon in vitro. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.99, n.3, p.676-683, sept., 1990.

SHIMOTOYODOME, A.; YAJIMA, N.; SUZUKI, J.; TOKIMITSU, I. Effects of coingestion of different fibers on fecal excretion and cecal fermentation in rats, **Nutrition Research**, Oxford, v.25, p.1085-1096, 2005.

SIGLEO, S.; JACKSON, M. J.; VAHOUNY, G. V. Effects of dietary fiber constituents on intestinal morphology and nutrient transport. **American Journal of Physiology**. Bethesda, v.246, n.1, p.G34-G39, 1984.

SINGH, N.; KAMATH, V.; RAJINI, P. S. Attenuation of hyperglycemia and associated biochemical parameters in STZ-induced diabetic rats by dietary supplementation of potato peel powder. **Clinica Chimica Acta**, Mysore, v.353, p.165-175, oct., 2005.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, Washington, v.30, n.3, p.1190-1206, June, 1958.

SPAETH, G.; BERG, R. D.; SPECIAN, R. D.; DEITCH, E. A. A. Food without fiber promotes bacterial translocation from the gut. **Surgery**, St. Louis, v.108, n.2, p.240-247, Aug., 1990.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, Arlington, v.39, p.1412-1415, 1967.

SPRINZ, H., SRIBHIBHADH, R., GANGAROSA, E. J., BENYAJATI, C., KUNDEL, D., HALSTEAD, S. biopsy of small bowel of that people - with special reference to recovery from asiatic cholera and to an intestinal malabsorption syndrome. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v.38, n.1, p.43-51, 1962.

STORY, J. A. The role of dietary fiber in lipid metabolism. **Advances in Lipid Research**, v.18, p.220-245, 1981.

SYKES, G., SKINNER, F. A. Techniques for the isolation and characterization of Actinomyces and bifidobacterium species, report of a panel discussion. **Applied Bacteriology Symposium**, New York, v.2, p.327-333, 1973.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**. Czech Republic, v.50, n.6, p.537-546, 2001.

SZILAGYI, A. Altered colonic environment, a possible predisposition to colorectal cancer and colonic inflammatory bowel disease: Rationale of dietary manipulation with emphasis on disaccharides. **Canadian Journal of Gastroenterology**, Ontario, v.12, n.2, p.133-146, Mar., 1998

TABATABAI, A.; LI, S. Dietary fiber and type 2 diabetes. **Clin. Excell. Nurse Pract.** V.4, p.272-276, 2000.

TAKUYA, S.; HARA, H. Ingestion of guar gum hydrolysate, a soluble and fermentable nondigestible saccharide, improves glucose intolerance and prevents hypertriglyceridemia in rats fed fructose. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.134, p.1942-1947, 2004.

TANAKA, R.; MUTAI, M. Improved medium for selective isolation and enumeration of Bifidobacterium. **Applied Environmental Microbiology**. p.866-869, 1980.

TANILA, H.; KAUPPILA, T.; TAIRA, T. Inhibition of intestinal motility and reversal of Postlaparotomy Ileus by Selective -Adrenergic Drugs in the Rat. **Gastroenterology**, Philadelphia. v.104, n.3, p.819-824, Mar., 1993.

TETSUGUCHI, M.; YAMASHITA, Y.; KATAYAMA, M.; SUGAWA-KATAYAMA, Y. Reversibility of the curdlan feeding effects on the morphological structure of intestinal mucosa in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v.44, n.5, p.601-612, Oct., 1998.

THEANDER, O, WESTERLUND E. A.; Studies on dietary fiber .3. Improved procedures for analysis of dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.34, n.2, p.330-336, Mar-Apr., 1986.

TOHMA, M.; MAHARA, R.; TAKESHITA, H.; KUROSAWA, T. A convenient synthesis of 3-beta,12-alpha-dihydroxy-5-cholen-24-oic, 3-beta,7-alpha-dihydroxy-5-cholen-24-oic, and 3-beta,7-beta-dihydroxy-5-cholen-24-oic acids - unusual bile-acids in human biological-fluids. **Steroids**, Woburn, v.48, n.5-6, p.331-338, Nov-Dec.; 1986.

TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**. Bethesda,v.81, n.3, p.1031-1064, July, 2001.

VAHOUNY, G. V.; ROY, T.; GALLO, L. L.; STORY, J. A.; KRITCHEVSKY, D.; CASSIDY, M. Effects of chronic intake on cholesterol absorption and metabolism in the rat. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.33, p.2182-2191, Sept., 1980.

VAKIL, J. R.; SHAHANI, K. M. Sensitivity of certain enzymes of glycolysis + hexose phosphate shunt pathways of streptococcus lactis to antibiotics, **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.47, n.6, p.675-680, 1964.

VAN FAASSEN, A.; GLINGHAMMAR, B.; PACHEN, D. M. F. A.; RAFTER, J. J.; BAETEN. C. G. M.I.; ENGELS, L. G. J. B.; KLEINJANS, J. C. S. Bile acid concentrations, cytotoxicity, and pH of fecal water from patients with colorectal adenomas de Kok TMCM, **Digestive Diseases and Sciences**, New York. v.44, n.11, p. 2218-2225, Nov., 1999.

VAN-SOEST, P. J.; McQUEEN, R. W. Proceedings of the nutrition society. symposium on fibre in human nutrition. The chemistry and estimation of fibre. **Proceedings of Nutrition Society**, Cambridge, v.32, p.123-130, 1973.

VERCELLOTTI, J. R.; SALYERS, A. A.; WILKINS, T. D. Complex carbohydrate breakdown in the human colon. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.31, n.10, p.S86-S89, 1978.

VERVAEKE, I. J.; DIERICK, N. A.; DEMEYER, D. I.; DECUYPERE, J. Á. Approach to the energetic importance of fiber digestion in pigs .2. an experimental approach to hindgut digestion. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.23, n.1-3, p.169-194, Apr., 1989.

VLAHCEVIC, Z. R.; PANDAK, W. M.; STRAVITZ, R. T. Regulation of bile acid biosynthesis. **Gastroenterology Clinics of North America**, Philadelphia. v.28, n.1, Mar.; 1999.

WEST, K., M. **Epidemiology of diabetes and it's vascular lesions**. New York: Elsevier; 1978.

WHITE, F. R. Streptozotocin. **Cancer Chemotherapy Reports**, v.30, p.49-53, 1963.

WHITEHEAD, R. H.; YOUNG, G. P.; BHATHAL, P. S. Effects of short chain fatty-acids on a new human-colon carcinoma cell-line (LIM1215), **Gut**, London, v.27, n.12, p.1457-1463, Dec., 1986

WILSON GL, HARTIG PC, PATTON NJ, LEDOUX SP Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage - activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular-distribution. **Diabetes**, Alexandria, v.37, n.2, p.213-216, Feb., 1988.

WOOLFE, M. L.; CHAPLIN, M. F.; OTCHERE, G. Studies on mucilages extracted from okra fruits (*Hibiscus esculentus* L.) and baobab leaves (*Adansonia digitata* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, W Sussex, v.28, n.6, p.519-529, June, 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Impacto econômico do tratamento do diabetes**. /redirect.asp?forwardURL=http://www.who.int/en/ acesso em: 21 jan./2006

YAJIMA T. Contractile effect of short-chain fatty- acids on the isolated colon of the rat. **Journal of Physiology**, New York, v.386, p.667-668, Nov.,1985.

YEN, J. T.; NIENABER, J. A; HILL, D. A; POND, W. G. Potential contribution of absorbed volatile fatty-acids to whole-animal energy requirement in conscious swine. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.69, n.5, p.2001-2012, May, 1991.

YOSHIOKA, H.; ISEKI, K.; FUJITA, K. Development and difference of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. **Pediatrics**, v.72, p.317-321, 1983.

YOUSEF, I. M.; TUCHWEBER, B. Screening urinary bile acids for genetic defects in bile acid synthesis? **Canadian Journal of Gastroenterology**, Oakville, v.11, n.6, p.541-543, Sept., 1997.

ZAMPA, A.; SILVI, S.; FABIANI, R.; MOROZZI, G.; ORPIANESI, C.; CRESCI, A. Effects of different digestible carbohydrate on bile acid metabolism and SCFA production by human gut micro-flora grown in an vitro semi-continuous culture. **Anaerobe**, Italy, v.10, p.19-26, 2004.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G. M.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v.414, p.782-787, 2001.

ANEXOS



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 385-1, sobre "Estudo dos efeitos nutricionais de farinha de polpa e mucilagem extraída do quirão (Hibiscus esculentus)" sob a responsabilidade de Vera Sônia Nunes da Silva está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 07.06.2002.

Campinas, 07 de junho de 2002.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº "385-1", entitled "Study of the nutritional effect of the pulp flour and mucifagens extracted from okra (Hibiscus esculentus)" is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas – UNICAMP) on 06/07.

Campinas 07 de junho de 2002.

Prof(a) Dr(a) Alba R.M. Souza Brito
Presidente – CEEA/IB/UNICAMP