

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

EFEITO DA PAREDE CELULAR SEMIPURIFICADA OBTIDA NO  
ISOLAMENTO DA PROTEÍNA DA LEVEDURA DE CERVEJA (*Saccharomyces  
cerevisiae*) NO VALOR NUTRITIVO DA CASEÍNA E NOS NÍVEIS DE LIPÍDIOS,  
TRIACILGLICERÓIS E COLESTEROL DE RATOS.

Eloísa Amaral Pádua

Orientador: Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual  
de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciência da Nutrição.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE  
Campinas, 2000.

PARECER

Este exemplar corresponde à  
redação final da tese defendida  
por Eloísa Amaral Pádua,  
aprovada pela Comissão  
Julgadora em 28 de julho de 2000.

Campinas, 28 de julho de 2000.

  
Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira  
Presidente da Banca



2000 13269

UNIDADE	30
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	P136e
V.	Ex.
TOMBO BC/	42190
PROC.	16.278/00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$ 00,00
DATA	21/09/00
N.º CPD	

CM-00144807-0

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

P136e

Pádua, Eloísa Amaral

Efeito da parede celular semipurificada obtida no isolamento da proteína da levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*) no valor nutritivo da caseína e nos níveis de lipídios, triacilgliceróis e colesterol de ratos /Eloísa Amaral Pádua.. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Admar Costa de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Fibras. 3. Dietas. 4. Proteínas. 5. Caseína. 6. Lipídios. 7. Colesterol. 8. Ratos. I. Oliveira, Admar Costa de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira**  
Universidade Estadual de Campinas  
Orientador



---

**Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas**  
Universidade Estadual de Campinas  
Membro

---

**Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri**  
Universidade Estadual de Campinas e  
Instituto de Tecnologia de Alimentos  
Membro



---

**Prof. Dr.ª Maria Tereza Pacheco**  
Instituto de Tecnologia de Alimentos  
Membro

## DEDICO

Ao meu avô que sempre será  
inesquecível e eterno  
"Amaral" e a minha avó  
"Josefa" pela pessoa  
maravilhosa que é, obrigada  
pelo constante apoio e  
otimismo,

MINHA GRATIDÃO E HOMENAGEM

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira, pela orientação competente e dedicada, apoio e pela amizade, durante todos esses anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri pela amizade, sugestões e apoio e por permitir a utilização do Laboratório de Bioquímica, do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP.

Ao Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas, do Instituto de Biologia da UNICAMP pela amizade e sugestões.

À Profa. Dra. Maria Tereza Bertollo Pacheco pela sugestões e amizade, indispensáveis à realização deste trabalho.

À Dra. Iacy dos Santos Draetta, do ITAL, pela amizade e incentivo para realização deste estudo.

À PRODESA, pelo fornecimento da levedura de cerveja e parede celular utilizada neste estudo.

Aos funcionários Soeli Maria Pissini Machado Reis, pela colaboração na realização das análises de sangue, e também à Eliete de Carvalho Leite, do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição/FEA e Cristina Tanikawa do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela amizade, valiosa colaboração e apoio técnico.

Às amigas Isabela Alvin, Elke, Cíntia e Vera Baldine, pela colaboração durante o processo de obtenção da parede celular de levedura de cerveja utilizada para o estudo, pela amizade, alegria e pelo grande apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos Patrícia Borges, Érika Granja, Renata Teixeira, Helaine, Nádia, Miriam, Beth Gomes, Beth Lima, Vanilda, Luciana, Bia, Liane, Adriane Batiston, Hercília, Renato, Plínio, Sr. João, Sandra, Mônica Costa, Viviane Maestrelli pelo carinho, amizade, alegria e incentivo durante os momentos difíceis.

Aos meus irmãos Ricardo Amaral e Juliana Amaral, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro recebido.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste Trabalho, mas que involuntariamente omiti seus nomes.

# ÍNDICE

	página
ÍNDICE DE TABELAS	09
ÍNDICE DE FIGURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Autólise e rompimento da parede celular	20
2.1.1 Purificação parcial da parede celular	22
2.1.2 Componentes da parede celular	23
2.1.3 Aplicações da parede celular	24
2.2 Definição e composição das fibras alimentares	25
2.2.1 Propriedades físicas e químicas das fibras alimentares	26
2.2.2 Efeitos fisiológicos das fibras	28
2.2.3 Reações adversas da fibra alimentar	30
2.2.4 Fibras alimentares e colesterol	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Obtenção do material	35
3.2 Análises químicas da parede celular semipurificada	35
3.2.1 Cinzas	35
3.2.2 Lipídios totais	35
3.2.3 Ácidos nucleicos	38
3.2.4 Proteína	38
3.2.5 Carboidratos totais	38
3.2.6 Fibra solúvel e insolúvel	38

3.3 Avaliação biológica	38
3.3.1 Preparações das dietas	39
3.3.2 Protocolo experimental	39
3.4 Animais experimentais	44
3.5 Acompanhamento nutricional	44
3.6 Métodos biológicos	45
3.6.1 Digestibilidade aparente	45
3.6.2 Quociente de eficiência da dieta	45
3.7 Tempo de trânsito intestinal e comprimento total do intestino	45
3.8 Determinações químicas do material biológico recolhido	46
3.8.1 Determinação de nitrogênio total	46
3.8.2 Índices séricos	46
3.8.2.1 Determinação de lipídios totais	46
3.8.2.2 Determinação de triacilgliceróis	46
3.8.2.3 Determinação de colesterol total	47
3.8.2.4 Determinação de colesterol HDL e LDL	47
3.9 Análise estatística	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Caracterização da parede celular de levedura de cerveja semipurificada	48
4.1.1 Composição química	48
4.1.2 Rendimento da semipurificação da parede celular	50
4.2 Avaliação nutricional	51
4.2.1 Ensaio biológico	51
4.2.2 Trânsito intestinal	55
4.2.3 Ganho de peso corporal (Curvas de crescimento)	58
4.3 Determinações sanguíneas (soro)	60

5 CONCLUSÃO	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Composição da dieta controle e das dietas hipercolesterolêmicas suplementadas com diferentes percentagens de fibras (parede celular e celulose) utilizadas no ensaio biológico (g/kg dieta)	41
<b>Tabela 2</b> Composição da mistura mineral utilizada na elaboração das dietas experimentais	42
<b>Tabela 3</b> Composição da mistura vitamínica utilizada na elaboração das dietas experimentais	43
<b>Tabela 4</b> Composição centesimal da parede celular semipurificada (PC) de levedura de cerveja ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	49
<b>Tabela 5</b> Rendimento do processo da semipurificação da parede celular	50
<b>Tabela 6</b> Consumo de dieta (CD), ganho de peso (GP), consumo de proteína (CP) e quociente de eficiência da dieta (QED) do primeiro período de experimento (0-30 dias – Fase A) de ratos Wistar submetidos às dietas controle e hipercolesterolêmica	52

<b>Tabela 7</b> Consumo de dieta (CD), ganho de peso (GP) e quociente de eficiência da dieta (QED) do segundo período de experimento (30-60 dias – Fase B) de ratos Wistar submetidos às dietas experimentais	54
<b>Tabela 8</b> Efeito da fração parede celular semipurificada de levedura de cerveja na digestibilidade aparente (Da) da caseína, utilizando ratos Wistar em crescimento submetidos às diferentes dietas experimentais	55
<b>Tabela 9</b> Comprimento total do intestino delgado e o tempo relativo de trânsito intestinal de ratos Wistar alimentados com as diferentes dietas experimentais	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Fluxograma de preparo da autólise da biomassa de levedura de cervejaria e separação das frações insolúvel (parede celular) e solúvel (extrato) 36
- Figura 2** Fluxograma de purificação parcial, homogeneização e secagem da fração insolúvel da levedura (parede celular) 37
- Figura 3** Fluxograma do ensaio biológico com ratos machos Wistar, durante 60 dias de experimento 40
- Figura 4** Curvas de crescimento para ratos Wistar mantidos em diferentes dietas por um período total de 60 dias: Fase A, período de 0-30 dias e Fase B, período de 30-60 dias. ◆ - controle (AIN-93G); ■ - hipercolesterolêmica; Δ - hipercolesterolêmica + 10% de parede celular; X - hipercolesterolêmica + 20% de parede celular; □ - hipercolesterolêmica + 10% de celulose; ● - hipercolesterolêmica + 20% de celulose 59

**Figura 5 (A, B)** Níveis séricos de lipídios totais (A) e triacilgliceróis (B) em ratos machos Wistar alimentados com as seguintes dietas: 1. Controle (AIN-93G); 2. Hipercolesterolêmica (substituição do óleo de soja por 5% de gordura de coco e 2% de colesterol); 3 e 4. Hipercolesterolêmica adicionada, respectivamente, de 10 e 20% da fração parede celular (PC); 5 e 6. Hipercolesterolêmica adicionada, respectivamente, de 10 e 20% de celulose. Letras diferentes a,b,c (colunas) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos. \* valores de referência para lipídios e triacilgliceróis (105,3 mg/dL e 15,1 mg/dL, respectivamente)

62

**Figura 6 (A, B, C)** Níveis séricos de colesterol total, HDL-colesterol e LDL-colesterol em ratos machos Wistar alimentados com as seguintes dietas: 1. Controle (AIN-93G); hipercolesterolêmica (substituição do óleo de soja por 5% de gordura de coco e 2% de colesterol); 3 e 4 hipercolesterolêmica, adicionada de 10 e 20%, respectivamente, da fração parede celular (PC); 5 e 6 hipercolesterolêmica adicionada, respectivamente, de 10% e 20% de celulose. Letras diferentes a, b, c (colunas) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos. \* valores de referência para colesterol total, HDL e LDL ( 35,5mg/dL; 25,1mg/dL e 8,27mg/dL, respectivamente

63

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

## RESUMO

A parede celular da levedura de cerveja é composta por uma grande quantidade de polissacarídeos. Estes ainda não foram estudados metabolicamente como fonte de energia e de fibra alimentar. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, através de ensaio biológico com ratos Wistar, o efeito da adição de 10% e 20% da parede celular da levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*), sobre o valor nutritivo da caseína, em termos de digestibilidade aparente e quociente de eficiência da dieta, como também o comprimento do intestino e o tempo de trânsito intestinal nos ratos, e sobre os níveis séricos de colesterol, colesterol-HDL, colesterol-LDL, lipídios totais e triacilgliceróis. A parede celular utilizada nesta pesquisa continha 33,2% de fibra solúvel, 22,9% de fibra insolúvel, 56,1% de carboidratos totais, 32,8% de proteína, 4,5% de lipídios totais, 4,9% de cinzas e 1,7% de RNA. Antes do uso a parede celular bruta, passou por um processo de purificação parcial, para elevar os teores de polissacarídeos atingindo a concentração de 69,3% em fibra total. O experimento com ratos foi realizado em 60 dias, sendo dividido em fase A e fase B. Foram utilizados 49 ratos machos Wistar, sendo que um grupo de 7 animais foram sacrificados no início do experimento usados como valores de referência, os demais foram divididos em 6 grupos com 7 animais. Na fase A (0-30 dias), os animais receberam as dietas controle (AIN-93G) e hipercolesterolêmica em que 7% de óleo de soja da AIN-93G foram substituídos por 2% de colesterol + 5% de gordura de coco. O grupo 1 recebeu dieta controle e os outros 5 grupos a dieta hipercolesterolêmica. Na fase B (30-60 dias) os grupos 3, 4, 5 e 6 passaram a receber dietas hipercolesterolêmicas com 10 e 20% de parede celular e 10 e 20% de celulose, respectivamente, e os grupos 1 e 2 continuaram recebendo a mesma dieta da fase A. No final do experimento os ratos foram mantidos em jejum por 16 horas, em seguida anestesiados e sacrificados sendo o sangue coletado por punção cardíaca. O comprimento do intestino delgado foi medido (do esfíncter pilórico à

junção íleo-ceco). A distância percorrida pela dieta, 2,5g marcada com 10% de carvão vegetal foi registrada como a porcentagem do comprimento total do intestino (% trânsito intestinal). Os resultados mostraram que a parede celular e a celulose não reduziram os níveis de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL e lipídios totais, mas a dieta com 20% de parede celular reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) os níveis de triacilgliceróis. Os ratos que ingeriram dietas com parede celular apresentaram um aumento no comprimento do intestino delgado e uma redução no tempo de trânsito intestinal (30% e 35%, respectivamente). A parede celular de levedura diminuiu a digestibilidade aparente da proteína em 9% e 17%, respectivamente, para as dietas contendo 10% e 20% de parede celular. Ocorreu uma diminuição no quociente de eficiência da dieta para os animais que receberam dietas com 10% e 20% de fibras (parede celular ou celulose), que afetou diferentemente o ritmo de crescimento dos animais quando submetidos às diferentes dietas, mostrando um crescimento mais lento e aumento na excreção fecal.

**Palavras chaves:** *Saccharomyces cerevisiae*, fibras, dietas, proteínas, caseína, lipídios, colesterol, ratos.

## ABSTRACT

The cell wall of the yeast is mainly composed of polysaccharides. These have not been studied yet as a source of energy and food fiber. The objective of the present paper was to evaluate, through a biological test experiment using Wistar rats, the effect of the addition of 10% and 20% brewer's yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*) on the nutritional value of casein, in terms of apparent digestibility and dietary efficiency ratio as well as the on intestinal length, food intestinal transit time, total cholesterol, HDL- and LDL-cholesterol, total lipid and triacylglycerols. The cell walls used in this investigation contained 33.2% of soluble fiber, 22.9% of insoluble fiber, 56.1% of total carbohydrates, 32.8% of protein, 4.5% of total lipids, 4.9% of ashes and 1.7% of RNA. Before the use, the crude cell wall underwent a partial purification process to rise the levels at polysaccharides reaching the concentration of 69.3% of total fiber. The experiment with rats was performed in 60 days, divided in two phases, A and B. Forty nine Wistar male rats were used, as a group of seven animals it was sacrificed in the beginning of the experiment used as reference value and other ones was divided in six groups of seven animals, were utilized. In phase A (0-30 days), the animals received the control diets (AIN-93G) and a hypercholesterolemic diet in which 7% of the soybean oil of AIN-93G diet were replaced by 2% of cholesterol + 5% of coconut fat. Group 1 received the control diet and the other 5 groups received the hypercholesterolemic diet. In phase B (30-60 days), groups 1 and 2 continued receiving the same diets of phase A, and the groups 3, 4, 5 and 6 were fed the hypercholesterolemic diets containing 10% or 20% of cell wall for groups 3 and 4, and 10% and 20% of cellulose for groups 5 and 6. At the end of the experiment the rats were fasted for 16 hours and then anesthetised and sacrificed for collection of blood by cardiac puncture. Intestinal length was measured from pyloric sphincter to the ileum-cecum junction. Intestinal transit was evaluated through feeding the animals with a 2.5g of diet marked with 10% vegetal charcoal.

The distance reached by the marked diet was measured, and expressed as percentage of intestinal length (% intestinal transit). The results showed that cell wall and cellulose did not reduce the total cholesterol, HDL or LDL - cholesterol, and total lipids levels, but, the diet containing 20% of cell wall significant decreased ( $p<0.05$ ) the triacylglycerol level. The rats fed the cell wall containing diets increased the small intestine length and reduced the intestinal transit by 30% and 35%, respectively. The cell wall, at 10% or 20% in the diet, decreased the apparent protein digestibility to 9% and 17%, respectively. It was found that the rats fed 10% and 20% fiber (cell wall or cellulose) showed a decrease in the dietary efficacy ratio as well as a slow growth and an increase in fecal excretion.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, fiber, diets, protein, casein, lipids, cholesterol, rat.

## 1 INTRODUÇÃO

Como a estimativa é de que a população mundial aumentará em 6 bilhões no século XXI, as dificuldades de aumento da produção de alimento, têm despertado grande interesse na utilização de microrganismos como fonte de proteína. Proteínas de células microbianas, particularmente levedura, poderão suplementar significativamente aquelas produzidas por fontes convencionais, que tornam-se limitadas pela reserva na indústria alimentar no Brasil e na de outros países, energia e custo de produção. Portanto, a levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*) tem se tornado uma fonte segura, aceitável e econômica de consumo humano e animal.

A quantidade de levedura produzida anualmente nas destilarias e cervejarias é da ordem de centenas de milhões de toneladas. No Brasil, anualmente são produzidos cerca de 240 mil ton/ano para as indústrias de álcool (FURCO, 1996), e 4 mil ton/ano para as indústrias de cerveja (PEIXOTO, 1996). Já nos Estados Unidos da América a indústria cervejeira, no início da última década, produziu cerca de 1 bilhão de ton/ano (CHAUDHARY & WEBER, 1990). O Brasil apresenta um grande volume residual de biomassa de levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*). Este subproduto tanto nas indústrias de cerveja como nas destilarias é descartado, gerando desta forma um produto usado na indústria de alimentos, como agente de fermentação, na fabricação de pães, como suplemento nutritivo em produtos naturais, além do uso como matéria-prima para produção de autolisados e extrato de levedura (HALÁSZ & LASZTITY, 1991).

A levedura de cerveja apresenta grande potencial como fonte de proteínas, aminoácidos, vitaminas, ácidos nucléicos e diversas enzimas, sendo considerada importante como matéria-prima para obtenção de produtos de uso nas indústrias alimentares e farmacêuticas (BEHALOVA et al., 1991).

Muitos estudos utilizam a levedura de cerveja para obter extratos de levedura por meio de autólise, o qual inclui todo o conteúdo da lise das células. Este processo após centrifugação origina uma fração contendo apenas os componentes solúveis, além das proteínas solubilizadas e a parede celular (DZIEZAK, 1987 b).

Os principais componentes da parede celular da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), têm sido isolados e purificados com algumas de suas propriedades nutricionais estudadas (KOLLAR et al., 1992; ASSIS, 1996). A fração referente à parede celular integral da levedura de cerveja é composta de polissacarídeos que podem servir como fonte de fibra dietética e serem considerados como agentes hipocolesterolêmicos (ABREU & MILLÁN, 1994; ROSE, 1993).

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

As fibras apresentam grande importância na alimentação e na manutenção da saúde. Por isso, faz-se necessário avaliar e pesquisar mais sobre este componente alimentar e suas interações com outros compostos na dieta à nível metabólico. Tendo em vista que a parede celular é composta por carboidratos que auxiliam na redução do colesterol, é de interesse deste trabalho estudar a eficiência da parede celular como fonte de fibra no combate à hipercolesterolemia. Na tentativa de elucidar estes efeitos da fibra contida na parede celular, o presente trabalho teve como objetivos:

## **Geral**

Aproveitamento da parede celular obtida na extração de proteína de levedura para fins alimentares.

## **Específicos**

- quantificar o rendimento do processo da purificação da parede celular,
- determinar a composição centesimal da fração parede celular semipurificada (PC),
- preparo da dieta hipercolesterolêmica com base na AIN-93G, pela substituição do óleo vegetal por 2% de colesterol dissolvidos em 5% de gordura de coco em relação a dieta (p/p),
- verificar os efeitos da administração de 10% e 20% da parede celular semipurificada sobre o valor nutritivo da caseína tais como: consumo de dieta (CD), ganho de peso (GP), consumo de proteína (CP), digestibilidade aparente (Da) e quociente de eficiência da dieta (QED),
- comparar o comprimento do intestino e tempo de trânsito intestinal dos ratos alimentados com as dietas marcadas com carvão vegetal, contendo 10% e 20% de parede celular ou celulose,
- verificar a influência da dieta hipercolesterolêmica nos constituintes sangüíneos do rato, em termos de colesterol, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triacilgliceróis e lipídios totais, bem como o efeito da adição em quantidades crescentes (10% e 20%) da parede celular ou celulose sobre os mesmos constituintes sangüíneos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 AUTÓLISE E ROMPIMENTO DA PAREDE CELULAR

Geralmente, as leveduras contém de 40-60% de proteínas que podem ser isoladas por vários métodos. O método principal é a obtenção do extrato de levedura e parede celular, os quais são usados como suplementos em alimentos e realçadores de sabor em sopas e molhos (KOLLAR et al., 1992). Recentemente, pesquisadores têm despertado grande interesse no isolamento e na purificação de componentes da levedura para usos específicos em formulações de produtos com diferentes propriedades funcionais.

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

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

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

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

O fracionamento e caracterização estrutural dos polissacarídeos da parede celular de *S. cerevisiae*, refere-se ao material obtido por rompimento mecânico ou enzimático, de células cultivadas em meios otimizados em laboratórios. São utilizadas enzimas exógenas na lise enzimática da parede celular de leveduras, pois este tratamento ativa as proteases endógenas e conseqüentemente ajudam na rápida preparação de leveduras autolisadas. A hidrólise da parede celular permite liberar os constituintes intracelulares para obtenção do extrato e parede celular (KNORR et al., 1979).

O método de ruptura mecânica tem sido muito utilizado, principalmente quando se deseja obter produtos com boas propriedades funcionais. Esse procedimento permite uma recuperação eficiente das proteínas, pois evita a exposição das mesmas a tratamentos drásticos de temperatura e pH. A desintegração mecânica pode ser conduzida por vários meios tais como: homogeneizador convencional, desintegrador de alta pressão, exposição a ultrassom e desintegrador tipo moinho de bolas (ENGLER, 1970).

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

A autólise ocorre no estágio final do crescimento celular, quando as condições fisiológicas da célula apresentam-se satisfatórias. A autólise natural também pode ser causada pela presença de microrganismos que contaminam a cultura, promovendo microlises nas leveduras e provocando a desestruturação da parede celular o que leva ao rompimento das células. Terminado o processo de autólise das células faz-se a centrifugação para a separação da fração solúvel (extrato de levedura) da insolúvel (parede celular).

### 2.1.1 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA PAREDE CELULAR

A parede celular é obtida por centrifugação, após autólise das células de levedura de cerveja. A fração insolúvel de levedura, a parede celular, é composta principalmente de  $\beta$ -glicanas (BEHALOVA et al., 1991).

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

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

### 2.1.2 COMPONENTES DA PAREDE CELULAR

A composição da parede celular possivelmente está relacionada com sua morfologia. Nos estudos realizados sobre a morfogênese têm sido considerados a biossíntese e estrutura dos componentes da parede celular. Com relação às paredes celulares das leveduras e fungos, foi verificado que elas apresentam estruturas complexas e dinâmicas constituídas principalmente de múltiplas camadas de polissacarídeos, proteínas e lipídios (GANDER, 1974).

A parede celular de *S. cerevisiae* apresenta cerca de 18,3% de proteína (SGARBIERI, 1996) e o seu teor varia de 15,6% a 28,6% para a parede celular liofilizada rompida em moinho Dyno-Mill e parede celular residual seca do processo industrial de autólise da levedura, respectivamente (ASSIS, 1996). Segundo HALÁSZ & LÁSZTIY (1991), a maioria desses dados é baseado na determinação do nitrogênio total para obter o teor de proteína utilizando o fator 6,25, podendo, dessa forma apresentar erros devido a teores variáveis de nitrogênio não protéico, como N-acetil-glucosamina, presentes nesse material biológico.

Além das proteínas, a parede celular de levedura de cerveja é composta por 6,2% de lipídios, sendo este valor alto quando se trata de parede celular SGARBIERI (1996). No estudo realizado por ROSE (1993), foi observado que, durante o isolamento da parede celular de levedura de cerveja, podem ser recuperados fragmentos de membrana celular que estão ligados à parte interna

da parede, o que demonstra a presença de lipídios contaminantes na mesma. O elevado teor de lipídios nas frações insolúveis (parede celular) pode ser explicado pela presença de componentes lipídicos na membrana celular.

Além disso, segundo ASSIS (1996), a composição dos polissacarídeos presentes na parede celular pode sofrer alterações segundo a classe e família a que pertence o fungo ou a levedura. E também pode ser afetadas pelas condições de cultivo, idade de cultura e sua linhagem (GANDER, 1974).

A parede celular de levedura de cerveja, ao final do processamento de purificação, pode conter, cerca de 60 a 90% de carboidratos (ANHEUSER-BUSH, 1978).

A fração insolúvel da levedura, formada principalmente de parede celular quando processada em “spray drier”, contém cerca de 87% de carboidratos, 11% de proteínas, menos de 0,5% de ácidos nucleicos, 1% de cinza e 6% de umidade. Os polissacarídeos da parede celular de levedura são constituídos de unidades de glicana e manana, sendo a proporção glicana:manana de aproximadamente 2:1 (DZIEZAK, 1987a).

### 2.1.3 APLICAÇÕES DA PAREDE CELULAR

A biomassa celular de levedura pode ser consumida como alimento ou aditivo de alimento; porém, alguns problemas restringem o seu uso. A baixa digestibilidade da parede celular reduz a biodisponibilidade das proteínas, em células rompidas presença de substâncias fisiologicamente ativas e alergênicas, podem apresentar fatores que causam náusea e distúrbio gastrointestinal (flatulência e diarreia) em indivíduos sensíveis a estes componentes. A ingestão de ácidos nucleicos em níveis elevados, como nas leveduras, provocam aumento indesejável na concentração sangüínea de ácido úrico (MILLÁN & ABREU, 1996).

Finalmente, o uso da biomassa integral é bastante limitado, por sua influência sobre os atributos sensoriais de qualidade (odor, sabor, cor e textura) e pela ausência de propriedades funcionais conferidas pelas células secas e não rompidas (KNORR et al., 1979; MILLÁN & ABREU, 1996).

Por estas razões e outros potenciais de aplicação das proteínas, é desejável romper e separar a parede celular da levedura, fracionando os componentes majoritários da célula.

O uso de leveduras como fonte protéica, também tem sido limitado pela percentagem de ácidos nucléicos presentes; as leveduras contém de 6-12% de ácidos nucléicos (BEHALOVA et al., 1991). Torna-se importante reduzir a quantidade de ácidos nucléicos para utilização em consumo humano (MILLÁN & ABREU, 1996).

Por outro lado, os ácidos nucléicos são usados em cosméticos como bioemulsificantes (BEHALOVA et al., 1991), enquanto que as  $\beta$ -glicanas da parede celular podem ser utilizadas como estabilizantes, espessantes e texturizantes em doces e sobremesas congeladas, coalhadas, pastas de queijo e análogos (DZIEZAK, 1987a).

## 2.2 DEFINIÇÃO E COMPOSIÇÃO DAS FIBRAS ALIMENTARES

O reconhecimento do papel das fibras alimentares na dieta humana só foi elucidado após o trabalho de dois médicos ingleses, Dennis Burkitt e Hugh Trowell, desenvolvido na década de 70 na África. Estes médicos observaram que a dieta dos africanos rurais era baseada em alimentos ricos em fibras (cereais integrais, verduras, frutas e leguminosas) e que nesta população era praticamente inexistentes as doenças gastrointestinais, tais como prisão de ventre, diverticulite, diabetes, hemorróidas, colesterolemia e câncer de cólon. De acordo com FRANCO (1992), dietas mais saudáveis são aquelas mais naturais e

mais relacionadas com os hábitos primitivos do homem. A fibra tem grande importância na alimentação humana, tendo-se verificado, após mais de duas décadas de investigações, que a fração fibra dos alimentos desempenha papel significativo na nutrição, dependendo, entretanto do tipo e da quantidade presente na alimentação (FRIAS, 1996). As fibras alimentares são designadas como a porção residual dos vegetais resistente à hidrólise enzimática no trato gastrointestinal humano, que servem como alimento para as bactérias do cólon (YOUNES et al., 1996). Segundo ROBERFROID (1993), a fibra abrange uma grande parte de substâncias com diferentes propriedades físicas e vários efeitos fisiológicos. Do ponto de vista químico, estas substâncias pertencem à família dos carboidratos. Sendo assim, no sistema digestivo, todas elas resistem à hidrólise pelas enzimas digestivas, mas podem ser hidrolisadas e fermentadas pela microflora gastrointestinal.

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

## 2.2.1 PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DAS FIBRAS ALIMENTARES

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

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

cadeia curta, que podem ser usados pelas células do cólon como fonte de energia, podendo também influenciar no metabolismo lipídico e glicídico (HUGHES, 1991; YOSHIDA, 1991)

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

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

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

Tamanho da partícula: a propriedade de hidratação e a capacidade de fermentação de um alimento fonte de fibra são diretamente influenciadas pelo tamanho da partícula (SCHENEEMAN, 1989). O grau de trituração da fibra é um importante fator capaz de produzir efeitos diferentes; por exemplo, fibras com granulometria menor que 200 nm apresentam maior capacidade de hidratação e fermentabilidade, pois possuem maior superfície de contato (PARROTT & THRALL, 1978), fibras com granulometria de tamanho médio

entre 200-500 nm possui capacidade de reter água, enquanto que fibras com granulometria maior que 800 nm, são mais eficazes na estimulação da defecação, aumentando o volume fecal e evitando a constipação (EASTWOOD & MORRIS, 1992).

### 2.2.2 EFEITOS FISIOLÓGICOS DAS FIBRAS

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

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

Alguns componentes solúveis, como pectinas, gomas, mucilagens e certas hemilceluloses predominam em frutas, leguminosas e hortaliças (SHINNICK et al., 1991). Estas frações solúveis absorvem muita água a partir do estômago, formando sistemas viscosos de consistência gelatinosa que podem retardar o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal. Esses polissacarídeos tendem a formar uma camada viscosa de proteção à mucosa do estômago e intestino delgado, dificultando a absorção, principalmente de açúcares e gorduras, sendo este talvez, o mecanismo pelo qual, esses polissacarídeos ajudam a baixar os

níveis de lipídios e a concentração de glicose no sangue (PAK & ARAYA, 1996; SGARBIERI & PACHECO, 1999).

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

As hemilcelulosas sofrem degradação no intestino delgado e grosso, sendo que 70 – 90% são degradados pela ação bacteriana (FRANCO, 1992). Aumentam a viscosidade, podem se ligar a ácidos biliares, aumentam ácidos graxos de cadeia curtas, aumentam o volume fecal, aumentam a tolerância à glicose, diminuem o colesterol sanguíneo e diminuem a incidência de câncer de cólon (HUGHES, 1991).

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

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

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

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

Pelo exposto, verifica-se que as fibras apresentam efeitos fisiológicos no organismo humano. Embora algumas dietas com fibras reduzam o tempo de trânsito no intestino delgado, o efeito sobre a interação do complexo entre as diferentes funções no intestino delgado na avaliação e absorção de nutrientes não está claramente estabelecida (ACTON et al., 1982).

As fibras solúveis retardam o esvaziamento gástrico e a velocidade do trânsito intestinal, enquanto que as fibras insolúveis parecem acelerar a velocidade do trânsito intestinal. As fibras solúveis sofrem fermentação quase total no cólon (MONGEAU et al., 1990) e as fibras insolúveis praticamente não sofrem ação das bactérias no intestino grosso, pois não sendo digeridas completamente, sofrem reduzida fermentação das bactérias colônicas (EASTWOOD & MORRIS, 1992). Pode-se dizer que a fermentação afeta as propriedades fisiológicas da fibra provocando flatulência, acidificação do pH intestinal e produção de ácidos graxos de cadeias curtas (FRANCO, 1992).

### 2.2.3 REAÇÕES ADVERSAS DA FIBRA ALIMENTAR

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

A dieta com fibra apresenta um efeito mais acentuado em relação a ligação de cátions no intestino delgado. A dieta rica em fibras pode causar uma diminuição

na absorção dos principais cátions como cálcio, magnésio, ferro e zinco. FROLICH & ASP (1985), verificaram que a redução na absorção de minerais provocado pela dieta rica em fibra, pode estar associada com as proteínas ou fitatos. Contudo, o efeito da fibra, em relação à absorção de minerais, torna-se importante quando as dietas são deficientes nesses nutrientes, como ocorre na maioria dos países latinoamericanos.

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

#### 2.2.4 FIBRAS ALIMENTARES E COLESTEROL

Diversos trabalhos têm sido realizados, sobre o uso de suplemento de fibras alimentares na prevenção e tratamentos de doenças como diabetes, hipercolesterolemia, doença cardiovascular, doença diverticular e câncer de colón (SLAVIN, 1987).

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

De acordo com (SGARBIERI & PACHECO, 1999), algumas suposições procuram explicar a ação preventiva da fibra alimentar sobre a incidência de

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

Vários animais de laboratório tem sido utilizados como modelos no estudo de diversos problemas nutricionais. No entanto, para WADDELL & DESAI, 1981, o rato ocupa uma posição dominante devido as vantagens de sua utilização como tamanho, fácil manejo, fecundidade, baixo consumo, resistência a doenças e custo de manutenção.

Segundo MONGEAU et al. (1990), o metabolismo do colesterol em ratos tem controle limitado, diferente daquele verificado em humanos, sendo mais difícil de induzir mudanças nos níveis de colesterol no sangue do animal. HEXEBER et al. (1993), relata que apesar disso, o rato é ainda um modelo experimental muito estudado para esta finalidade. FRIAS & SGARBIERI (1998 a, b), verificaram o efeito da goma guar sobre os níveis séricos de lipídios e concentração de glicose em ratos Wistar diabéticos. Os resultados desta pesquisa, mostraram que a goma guar quando introduzida na dieta, em concentrações igual ou superior a 10%, reduzia significativamente a concentração de glicose no sangue e também os níveis de colesterol total e triacilgliceróis em ratos, podendo ser efetiva no tratamento da hipercolesterolemia, diabetes e obesidade.

A inclusão de 5% de fibra (farelo de trigo, soja e milho) em dietas hipercolesterolêmicas contendo 1% de colesterol, reduziu os níveis de lipídios

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

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

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

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

Pesquisas com humanos, utilizando dietas com altos teores de fibras solúveis, foram realizadas por TINKER et al. (1991), no estudo homens adultos entre

29-79 anos, que receberam dietas ricas em fibra, usando a ameixa como fonte de fibra. Os homens receberam diariamente 6% de fibra de ameixa, por um período de 8 semanas. Foram constatados uma diminuição nos níveis de colesterol sérico e um aumento deste componente na excreção fecal.

Considerando os diferentes estudos, pôde ser observado que as fibras alimentares influenciaram os níveis séricos de colesterol, tanto em humanos como em animais. Tem sido demonstrado que as fibras solúveis reduzem a absorção de ácidos graxos e os níveis de colesterol, através da sua capacidade de hidratação que resulta na formação de uma matriz gel no lume intestinal, interferindo na digestão e absorção de lipídios (SCHENEEMAN, 1989). Por outro lado, as fibras solúveis ao serem fermentadas no cólon levam à formação de metabólitos, aos quais se têm dado características hipocolesterolêmicas. Assim, os ácidos graxos de cadeias curtas (acetato, propionato e butirato) são produzidos pela degradação da fibra solúvel no intestino e podem, ou serem utilizadas como substrato energético pelas células intestinais ou serem absorvidos pela mucosa intestinal, passando para a corrente sanguínea (HUGHES, 1991). ROBERFRAID (1993), propuseram que ambos, acetato e propionato, afetariam o metabolismo dos lipídios. Porém, experimentos mostram que o efeito da redução do colesterol, depende dos níveis de colesterol, para verificar a influência das fibras alimentares como preventivo da hipercolesterolemia.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

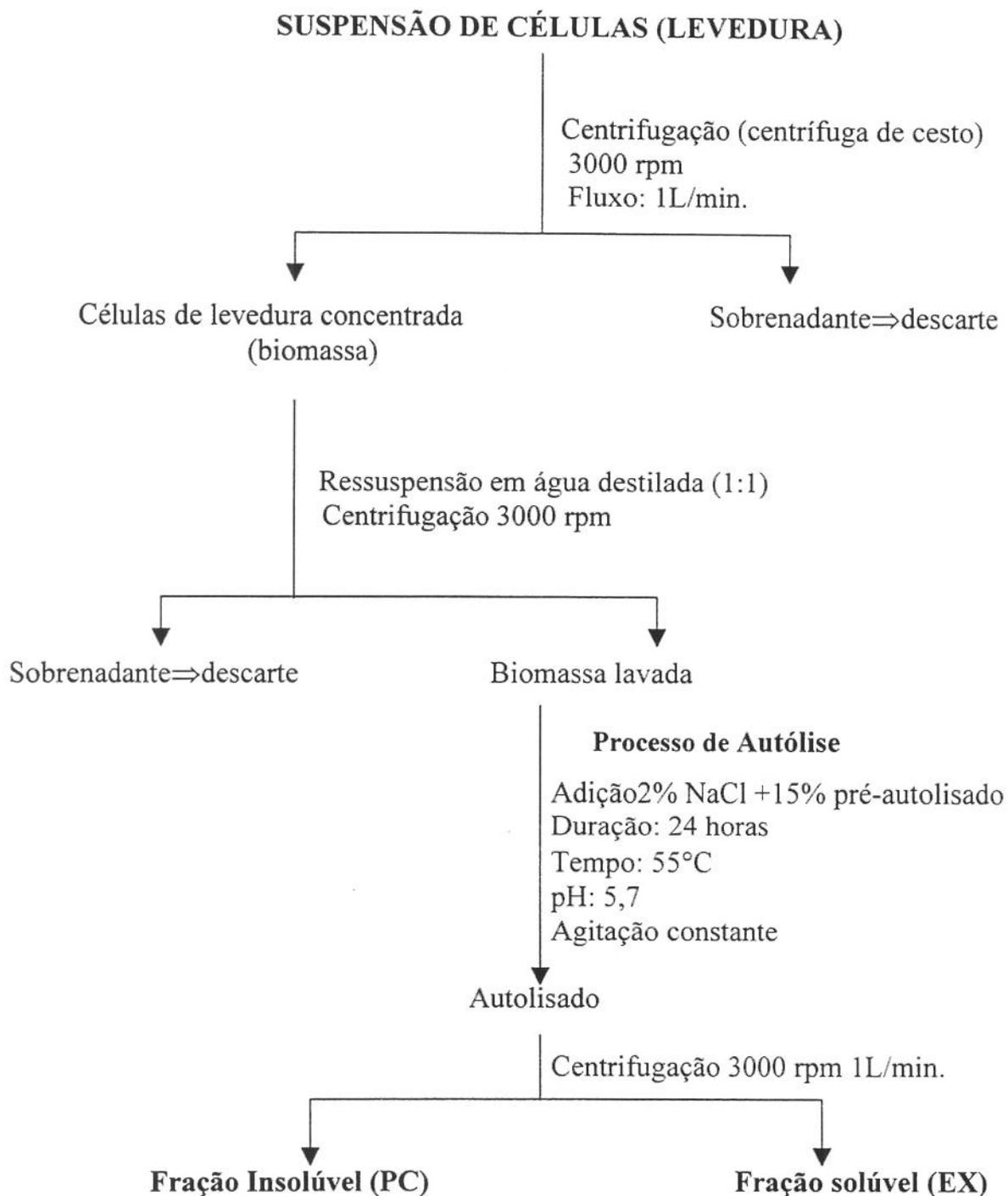
### 3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL

A levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*) foi fornecida pela empresa PRODESA (Campinas - SP). Foram realizados diversos tratamentos para obter-se a parede celular semipurificada utilizada como fonte de fibra. A parede celular foi isolada a partir da fração insolúvel da biomassa de levedura autolisada e seca em “spray drier”. O processo foi realizado no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), de acordo com os fluxogramas das figuras 1 e 2.

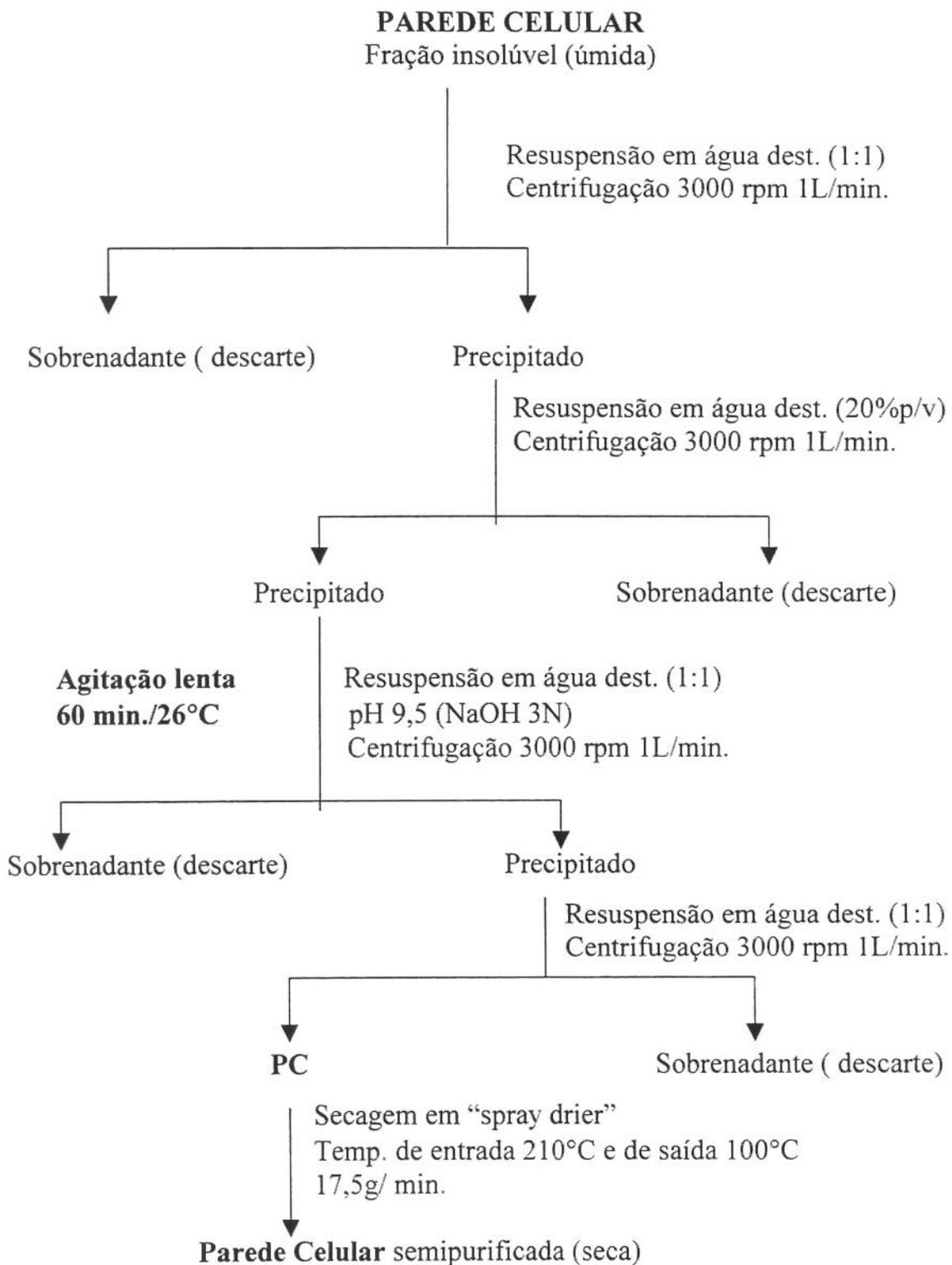
### 3.2 ANÁLISES QUÍMICAS DA PAREDE CELULAR SEMIPURIFICADA

**3.2.1 Cinzas:** o teor de cinzas foi analisado de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (1990), que fundamenta-se no resíduo que permanece após a incineração da amostra, a 500-550°C, com destruição da matéria orgânica.

**3.2.2 Lipídios totais:** foi determinado segundo o método de BLIGH & DYER (1959), usando a mistura de solventes: clorofórmio, metanol e água.



**Figura 1.** Fluxograma de preparo de autólise da biomassa de levedura e obtenção das frações insolúvel (parede celular) e solúvel (extrato).



**Figura 2.** Fluxograma de purificação parcial, homogeneização e secagem da fração insolúvel da levedura (parede celular).

**3.2.3 Ácidos nucleicos:** o teor de ácidos nucleicos na parede celular foi determinado pela reação de orcinol para RNA. Após extração do RNA com ácido perclórico 0,05M, à temperatura de 37°C por 2 horas, o mesmo foi hidrolisado a 100°C por 15 minutos, para liberação da ribose. Em etapa posterior, este complexa-se com o reagente de orcinol, resultando uma coloração esverdeada, cuja intensidade é medida por espectrofotometria (670nm). Foi utilizado para quantificação uma curva padrão realizada com RNA purificado de levedura (HEBERT et al., 1971).

**3.2.4 Proteína:** o nitrogênio da amostra da parede celular foi determinado pelo método de Kjeldahl para segundo AOAC (1990). Utilizou-se o sulfato de potássio, sulfato de cobre e dióxido de titânio como catalisadores (WILLIAMS, 1973). A proteína bruta foi calculada pelo produto entre a percentagem de nitrogênio e o fator de conversão 6,25.

**3.2.5 Carboidratos totais:** o teor de carboidratos foi determinado por diferença, subtraindo-se de 100% a soma dos valores encontrados nas outras determinações químicas, incluindo o teor de fibras solúveis e insolúveis.

**3.2.6 Fibra Solúvel e Insolúvel:** para determinação do teor de fibra utilizou-se o método enzimático/gravimétrico. Este método baseia-se na gelatinização e hidrólise parcial do amido com uma alfa-amilase termorresistente, seguida de hidrólise do amido residual com uma amiloglicosidase (PROSKY et al., 1984). Através deste método determinou-se as frações solúvel e insolúvel da fibra presentes na parede celular.

**3.3 Avaliação biológica:** o ensaio biológico teve duração de 2 meses e as dietas foram elaboradas seguindo-se as recomendações da AIN-93G (REEVES et al., 1993), com algumas modificações, descritas a seguir.

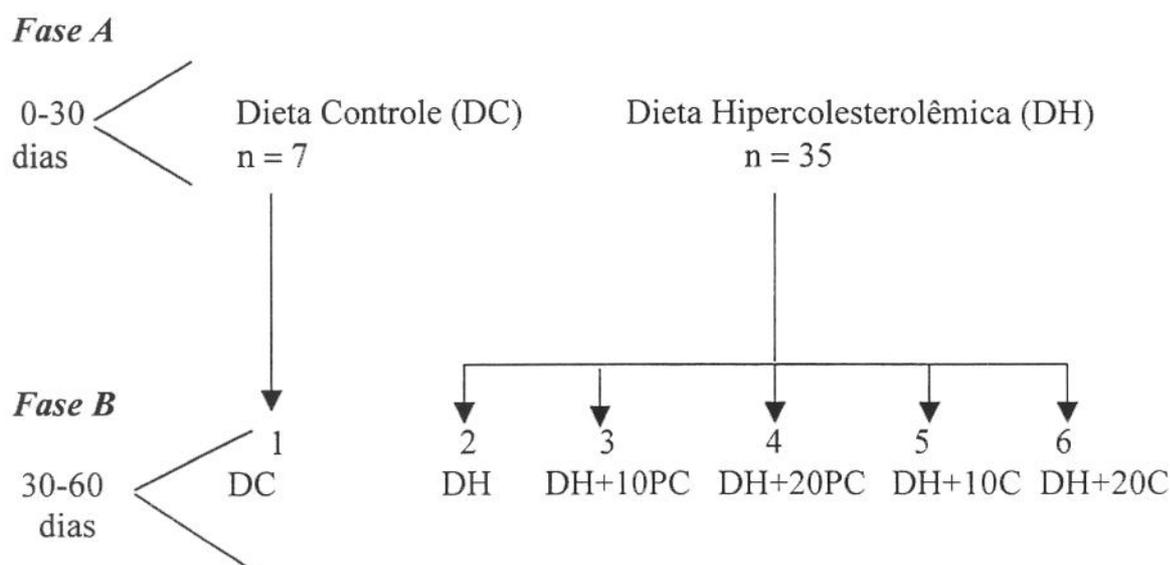
### 3.3.1 Preparações das dietas

Para o ensaio biológico foram elaboradas as seguintes dietas: 1. Dieta controle com caseína (AIN-93G), 2. Dieta hipercolesterolêmica contendo como fonte lipídica 2% de colesterol e 5% de gordura de coco, 3. Dieta hipercolesterolêmica + 10% de parede celular, 4. Dieta hipercolesterolêmica + 20% de parede celular, 5. Dieta hipercolesterolêmica + 10% de celulose e 6. Dieta hipercolesterolêmica + 20% de celulose. As dietas foram colocadas em sacos plásticos e mantidas em freezer a -18°C, enquanto não usadas. As dietas foram preparadas variando-se apenas o nível de fibras e os outros nutrientes corrigindo de acordo com a dieta controle (AIN 93-G) em detrimento do amido de milho e utilizando a caseína como fonte protéica a 17%. A fração lipídica das dietas do efeito das leveduras sobre a colesterolemia para o estudo está baseada em gordura de coco. Gordura de coco contém grande percentagem de ácidos graxos saturados e são frequentemente usados em dietas experimentais semipurificadas (MILLÁN & ABREU, 1996). A tabela 1 mostra a composição dessas dietas, e as tabelas 2 e 3 apresentam, respectivamente, a composição das misturas mineral e vitamínica acrescentadas às dietas.

### 3.3.2 Protocolo experimental

- **Fase A:** No primeiro mês de ensaio, o grupo 1 recebeu dieta controle (Dieta 1), enquanto que os outros 5 grupos receberam dieta hipercolesterolêmica contendo 2% de colesterol e 5% de gordura de coco. Todos os grupos (tratamentos), foram formados por grupos de 7 animais.
- **Fase B:** No segundo mês de ensaio, o grupo 1 (n=7) continuou recebendo dieta controle, o grupo 2 (n=7) também continuou recebendo a mesma dieta do primeiro mês, ou seja, dieta hipercolesterolêmica (Dieta 2). Para os outros grupos houve alteração das dietas, com a incorporação da parede

celular e celulose em diferentes proporções. O grupo 3 (n=7) recebeu a dieta hipercolesterolêmica + 10% de parede celular, o grupo 4 (n=7) hipercolesterolêmica + 20% de parede celular, o grupo 5 (n=7) hipercolesterolêmica + 10% de celulose e o grupo 6 (n=7) hipercolesterolêmica + 20% de celulose, de acordo com a figura 3.



### Legenda

DC - Dieta controle.

DH - Dieta hipercolesterolêmica (2% de colesterol + 5% de gordura de coco)

DH+10PC - Dieta hipercolesterolêmica + 10% de parede celular.

DH + 20PC - Dieta hipercolesterolêmica + 20% de parede celular.

DH + 10C - Dieta hipercolesterolêmica + 10% de celulose.

DH + 20C - Dieta hipercolesterolêmica + 20% de celulose.

n = número de ratos Wistar.

**Figura 3.** Fluxograma do ensaio biológico com ratos machos Wistar, durante 60 dias de experimento.

**Tabela 1** – Composição da dieta controle e das dietas hipercolesterolêmicas suplementadas com diferentes percentagens de fibras (parede celular e celulose) utilizadas no ensaio biológico (g/kg dieta).

Componentes	Grupos de animais					
	Dietas Controle		Dietas Experimentais (g)			
	1	2	3	4	5	6
Proteína (caseína)	170,00	170,00	110,66	51,32	170,00	170,00
Amido dextrinizado	132,00	132,00	132,00	132,00	132,00	132,00
Sacarose	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Óleo de soja	70,00	-	-	-	-	-
Colesterol (2%)	-	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Gordura de coco (5%)	-	50,00	41,76	33,52	50,00	50,00
Fibra	50,00	50,00	-	-	100,00	100,00
Parede Celular	-	-	181,48	362,96	-	-
Mist. Mineral	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00
Mist. Vitamínica	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
L-Cistina	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Bitartarato de colina	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
T. Butilhidroquinona	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
Amido de Milho	427,48	427,48	363,58	249,68	377,48	277,48

REEVES et al., (1993).

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**Tabela 2** – Composição da mistura mineral utilizada na elaboração das dietas experimentais.

Componentes	g/kg mistura
Carbonato de cálcio anidro – 40,04% Ca	357,00
Fosfato de potássio monobásico - 22,76% P; 28,73% K	196,00
Cloreto de sódio – 39,34% Na; 60,66% Cl	74,00
Citrato de potássio, tri-K, monohidratado – 36,16% K	70,78
Sulfato de potássio – 44,87% K; 18,39% S	46,60
Óxido de magnésio – 60,32% Mg	24,00
Citrato de ferro – 16,5% Fe	6,06
Carbonato de zinco – 52,14% Zn	1,65
Carbonato de manganês – 47,79% Mn	0,63
Carbonato de cobre – 57,47% Cu	0,30
Iodato de potássio – 59,3% I	0,01
Selenito de sódio anidro–41,79% Se	0,01025
Paramolibdato de amônio – 4H <sub>2</sub> O–54,34%Mo	0,00795
Meta-silicato de sódio – 9 H <sub>2</sub> O – 9,88% Si	1,45
Sulfato de potássio crômico – 12 H <sub>2</sub> O – 10,42% Cr	0,275
Cloreto de lítio 16,38% Li	0,0174
Ácido bórico –17,5% B	0,0815
Fluoreto de sódio – 45,24% F	0,0635
Carbonato de níquel – 45% Ni	0,0318
Vanadato de amônio – 43,55% V	0,0066
Sacarose	221,0260
Paramolibdato de amônio – 4 H <sub>2</sub> O – 54,34% Mo	0,00795

REEVES et al., (1993).

**Tabela 3** – Composição da mistura vitamínica utilizada na elaboração das dietas experimentais.

Componentes	mg/kg
Ácido Nicotínico	3,000
Pantotenato de Cálcio D	1,600
Tiamina – HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Piridoxina – HCl	0,700
Ácido Fólico	0,200
Biotina D	0,030
Cianocobalamina – (vitamina B <sub>12</sub> )	2,500
Retinil Palmitato ou Acetato – (vitamina A - 500.000 UI/g)	15,000
Dl - $\alpha$ - Tocoferol Acetato – (vitamina E - 500 UI/g)	0,800
Colecalciferol – (vitamina D <sub>3</sub> - 400.000 UI/g)	0,250
Menaquinona – (vitamina K)	0,750
Sacarose	974,655

REEVES et al., (1993).

### 3.4 Animais experimentais

Foram utilizados para o estudo ratos machos Wistar fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP, com idade de 21 dias, os quais foram inicialmente pesados e separados em grupos. Cada grupo continha 7 animais, com pesos médios de  $62,08 \pm 7,34$ g.

Para a realização do ensaio foram selecionados 49 animais, sendo que 7 animais foram sacrificados no início do experimento, após jejum de 16 horas, para coleta de sangue pela técnica de punção cardíaca. Este sangue foi analisado e os valores considerados como de referência. Os demais foram distribuídos em seis grupos de 7 animais, permanecendo por 2 meses nas dietas.

### 3.5 Acompanhamento nutricional

**Acompanhamento nutricional em gaiolas metabólicas:** os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, onde receberam as dietas experimentais e água “ad libitum”. Durante o ensaio a temperatura do laboratório foi mantida a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , sendo, que a iluminação foi controlada em períodos alternados de luz e obscuridade de 12h. Concomitantemente foram realizadas semanalmente as pesagens dos animais para acompanhamento da evolução do crescimento. Durante o segundo mês de experimento (Fase B) depois de uma semana de adaptação à dieta, foram recolhidas as fezes por um período de 7 dias, para determinação da digestibilidade aparente.

As fezes foram cuidadosamente coletadas, separando-as de possíveis contaminantes (partículas de alimentos, pelos, etc.), secas em estufa à temperatura ( $105^\circ\text{C}$ ), para moagem posterior. As fezes moídas foram analisadas pelo método descrito no item 3.2.4.

### 3.6 Métodos biológicos

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

$$Da = NI - NF / NI \times 100$$

Onde: Da = Digestibilidade aparente

NI = Nitrogênio Ingerido

NF = Nitrogênio Fecal

**3.6.2 Quociente de Eficiência da Dieta:** é usado para estimar a eficiência da dieta, como um todo. A equação utilizada no cálculo é a seguinte:

$$QED = GP(g) / DC(g)$$

Onde: QED = Quociente de Eficiência da Dieta

GP = Ganho de Peso (g)

DC = Dieta Consumida (g)

### 3.7 Tempo de Trânsito Intestinal e Comprimento Total do Intestino.

A técnica utilizada para determinação do tempo de trânsito intestinal foi realizada no último dia do experimento segundo BIANCHI et al., (1983). Foram utilizados os mesmos animais do ensaio biológico, para este teste.

Os animais, após jejum de 16 horas, receberam 2,5g de suas respectivas dietas, marcadas com 10% de carvão vegetal; os animais foram sacrificados após 20 minutos da ingestão da dieta, para retirada do intestino delgado. Foi medido o comprimento de cada intestino (do esfíncter pilórico à junção íleo-ceco) e a distância percorrida pela dieta marcada foi registrada como uma percentagem do comprimento total (% de trânsito).

### **3.8 Determinações químicas do material biológico recolhido**

**3.8.1 Determinação de nitrogênio total** das fezes dos grupos experimentais de ratos de acordo com o item 3.2.4.

**3.8.2 Índices séricos:** o sangue dos animais foram coletados por punção cardíaca, no início e no final do experimento, após jejum de 16 horas. As amostras de sangue individuais foram deixadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos, e a seguir centrifugadas a 2.500 rpm/15 minutos. Foram recolhidos os soros sobrenadante, onde se realizaram as análises bioquímicas: lipídios totais, triacilgliceróis, colesterol total, colesterol-HDL e colesterol-LDL, foram dosados através de “Kits” comerciais LABTEST, (Labcenter, Campinas – SP).

**3.8.2.1 Determinação de lipídios totais:** O princípio da metodologia utilizada no teste baseia-se na reação dos lipídios do soro com reagentes, ácido sulfúrico, formando o “íon carbonium”, que reage com o grupamento carbonil ativado do reagente de cor, produzindo um complexo de cor rósea, que é estabilizado por ressonância e tem absorção máxima em torno de 535nm.

**3.8.2.2 Determinação de triacilgliceróis:** Os triacilgliceróis são extraídos com uma mistura de varsol, isopropanol e ácido sulfúrico, havendo separação em fases com recuperação total dos triacilgliceróis na fase não polar (superior), ficando os fosfolípidos, glicose e bilirrubina na fase polar (inferior) juntamente com as proteínas. Os triacilgliceróis extraídos são saponificados a glicerol, que é oxidado a formaldeído e este é medido através da formação de um complexo dehidrolutidina amarelo (reação de Hantzsch).

**3.8.2.3 Determinação do colesterol total:** A medida do colesterol foi determinada pelo método enzimático, utilizando uma reação de oxidação catalisada pela colesterol oxidase, após hidrólise dos ésteres de colesterol, monitorada a 540nm. A 10µl de soro foi adicionado 1mL de reagente, incubando-se a 37°C por 10 minutos. Uma concentração de colesterol de 200mg/dL foi usada como padrão.

**3.8.2.4 Determinação do colesterol HDL e LDL:** As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (colesterol-HDL) é determinado no sobrenadante. O colesterol-LDL foi calculado segundo a fórmula de FRIEDEWALD et al. (1972):

$$\text{LDL colesterol} = \text{colesterol total} - \frac{\text{triacilgliceróis}}{5} - \text{HDL colesterol}$$

5

### 3.9 Análises estatísticas

Os resultados experimentais foram comparados utilizando a média e desvio padrão pelo método ANOVA e teste de Tukey para determinação da diferença estatística entre médias, com probabilidade mínima aceitável de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização da Parede Celular de Levedura de Cerveja Semipurificada

#### 4.1.1 Composição química

A composição centesimal da parede celular de levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*) parcialmente purificada foi determinada, apresentando os resultados obtidos na Tabela 4. Foi possível demonstrar que as duas maiores frações foram: proteína (32,8%) e fibra total (55%), sendo a maior parte representada pela fibra solúvel com 33,2%. Em relação aos lipídios foi encontrado um valor de 4,5%, o qual está dentro da faixa de 3 a 10% daquele encontrado por MACWILLIAN (1970) para a parede celular de levedura de cerveja. O teor de cinzas foi entre 4,9%, similar ao descrito por ASSIS (1996), que encontrou teores de cinzas entre 4,3 a 4,8% para a parede celular residual seca, onde a parede bruta foi obtida por processo industrial de autólise de levedura (rompida em moinho Dynamill).

**Tabela 4** - Composição centesimal da parede celular semipurificada (PC) de levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*).

Componente Químico	Porcentagem*
Proteína (N × 6,25)	32,76±0,61
Lipídios	4,54±0,50
Cinzas	4,88±0,16
Carboidratos totais:	56,10±0,92
• Fibra solúvel	33,16±0,72
• Fibra insolúvel	21,91±1,08
RNA	1,70±0,70

\* valor médio de no mínimo n = 3.

O teor encontrado de RNA na parede celular foi de 1,7%, um valor relativamente baixo quando comparado aos valores descrito por ASSIS (1996), que encontrou 3,0 e 3,5% de RNA na parede celular bruta, obtida por rompimento mecânico e na parede celular bruta do processo industrial de autólise, respectivamente. Os resultados podem indicar contaminação dos ácidos nucléicos na parede das células de levedura de cerveja indicando, assim, a necessidade da lavagem desse material para eliminação dos RNA residual.

#### 4.1.2 Rendimento da semipurificação da Parede Celular

O rendimento do processo de purificação foi de 56% para os sólidos totais e 69% em relação ao teor de fibras presente na massa inicial de parede celular bruta, contudo ocorreu uma elevação da percentagem de fibras em relação aos sólidos totais. Apesar do rendimento ser de 69% o produto seco apresentou um acréscimo aproximadamente, de 10,4% em fibras. ROSE (1993) cita que 60 a 90% da parede celular é composta de polissacarídeos, sendo os outros compostos proteína e lipídios; a maior parte dos polissacarídeos são  $\beta$ -glicanas e fosfomananas.

**Tabela 5** - Rendimento do processo de semipurificação da parede celular.

Variáveis	Parede Celular Bruta	Parede Celular Semipurificada
Massa Sólidos Totais (Kg)	13,89	7,81
Massa Fibra (Kg)	6,21	4,29
Fibra (%)	44,71	55,07
Rendimento em Sólidos totais (%)	—	56,22
Rendimento em Fibras (%)	—	69,26

## **4.2 Avaliação nutricional**

### **4.2.1 Ensaio biológico**

Na Tabela 6, foi encontrado o valor médio referentes à Fase A do experimento (0-30 dias), onde um grupo de ratos foram alimentados com dieta controle de caseína (AIN-93G), e os demais grupos receberam dieta hipercolesterolêmica. No primeiro período não teve dietas com fibras, na tentativa de conseguir dobrar o colesterol nos ratos. Não foram medidos os índices de colesterol no final desta fase, pois o grupo 2 se manteve em dieta hipercolesterolêmica até o fim do experimento, considerada por nós como controle referente a colesterolemia, nos proporcionando a comparação em relação as fibras empregadas neste estudo. Verificou-se que neste período, não houve diferença estatística significativa para o consumo de dieta (CD) entre os tratamentos. Ao contrário, o quociente de eficiência da dieta (QED) e o ganho de peso (GP) mostraram-se significativamente menores na dieta hipercolesterolêmica.

**Tabela 6** - Consumo de dieta (CD), ganho de peso (GP), consumo de proteína (CP) e quociente de eficiência da dieta (CED) para a Fase A experimento (0 - 30 dias) de ratos Wistar submetidos às dietas controle e hipercolesterolêmica.

Determinações	Dietas	
	controle	hipercolesterolêmica
Consumo de dieta (g)	429,86±29,88 <sup>a</sup>	452,32±29,92 <sup>a</sup>
Ganho de peso (g)	142,56± 6,36 <sup>a</sup>	128,06± 9,87 <sup>b</sup>
Quociente de eficiência da dieta	0,33 ±0,03 <sup>a</sup>	0,28± 0,02 <sup>b</sup>

\*Valores médios ± desvio padrão de 7 ratos por dieta.

a, b. Letras diferentes em linhas significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

O efeito da ingestão da parede celular sobre os vários índices relacionados com o valor nutritivo das dietas utilizadas na Fase B do experimento (30-60 dias) pode ser observado na Tabela 7. Verificou-se que os animais alimentados com a dieta contendo 20% de parede celular de levedura de cerveja apresentaram menor consumo diferindo estatística quando comparadas as dietas com fibras, conseqüentemente, o ganho de peso dos animais alimentados com 20% de PC foi também significativamente menor, demonstrando talvez a capacidade da fração PC de promover saciedade, resultando em perda de apetite promovendo baixo consumo de dieta e do ganho de peso. Os animais em dietas hipercolesterolêmicas contendo celulose (10% e 20%) foram os que consumiram maior quantidade de dieta em relação as demais, entretanto, quando se comparou o ganho de peso dos animais alimentados com essas dietas, não se observou diferença estatística significativa quando comparados às demais dietas. Esses resultados estão de acordo com FRIAS (1996), que trabalhou com fibras (goma guar e celulose) em ratos, que também observou que as dietas contendo

celulose (10% e 20%) aumentam o consumo de dieta quando comparadas com as demais dietas do experimento, mas também não altera o ganho de peso dos animais.

Quanto ao QED, observou-se que as dietas controle (C) e hipercolesterolêmica (H) apresentaram os melhores índices, os quais não diferiram da dieta H + 20% PC. O menor índice de QED foi do grupo em dieta H+20% C, o qual não diferiu estatisticamente das dietas com H+10% PC e H+10% C.

A Tabela 8 apresenta a digestibilidade aparente, a quantidade de nitrogênio fecal e ingerido durante o período de 7 dias de balanço. Os dados de excreção fecal de nitrogênio, mostraram que os animais alimentados em dieta (H+20%PC) apresentaram aumento significativo de nitrogênio nas fezes, quando comparados com aquelas nas outras dietas; por outro lado, o nitrogênio ingerido não foi diferente entre as dietas.

Observou-se que a digestibilidade aparente diminuiu significativamente para o grupo 4 (H+20%PC), quando comparada com as demais dietas; por outro lado, os grupos 3, 5 e 6 (H+10%PC; H+10%C e H+20%C) apresentaram menor digestibilidade que o grupo controle (C). As fibras fazem com que o volume fecal aumente, conseqüentemente, os animais perdem peso que leva a uma menor digestibilidade aparente para os grupos que ingeriram as dietas com fibra. Com relação as dietas 3 e 4 em que a percentagem de caseína fica diminuída em função do acerto dos nutrientes para que as dietas fiquem isoproteicas (Tabela 1). SGARBIERI et al. (1999), PACHECO et al. (1997) e RUMSEY et al. (1991), verificaram que a células de levedura como também os derivados: autolisado total, extrato e parede celular são excelentes fontes de proteína. Comparando-se os resultados obtidos com os dados da literatura, verificou-se, que apesar de ser uma mistura de proteínas todos os indicativos são de que o que realmente está fazendo reduzir a digestibilidade da proteína é a fibra adicionada na dieta, seja solúvel ou insolúvel (FRIAS et al., 1998 a, b).

**Tabela 7** - Consumo de dieta (CD), ganho de peso (GP), e quociente de eficiência da dieta (QED) do segundo período de experimento (30-60 dias – Fase B) de ratos Wistar submetidos às diferentes dietas experimentais.

Dietas	CD	GP	QED
C	362,60±38,28 <sup>b,c</sup>	81,08±17,54 <sup>a</sup>	0,22±0,04 <sup>a</sup>
H	359,16±29,14 <sup>b,c</sup>	78,83± 9,52 <sup>a</sup>	0,22±0,04 <sup>a</sup>
H+10%PC	396,16±32,95 <sup>a,b</sup>	64,13±12,54 <sup>a</sup>	0,16±0,03 <sup>b,c</sup>
H+20%PC	317,89±60,35 <sup>c</sup>	61,95±20,51 <sup>a</sup>	0,20±0,05 <sup>a,b</sup>
H+10%C	438,85±43,07 <sup>a</sup>	72,44±13,60 <sup>a</sup>	0,16±0,02 <sup>b,c</sup>
H+20%C	459,15±51,54 <sup>a</sup>	62,39±17,19 <sup>a</sup>	0,13±0,03 <sup>c</sup>

C=controle; H=hipercolesterolêmica; H+10%PC=hipercolesterolêmica + 10% de parede celular; H+20%PC=hipercolesterolêmica + 20% de parede celular; H+10%C=hipercolesterolêmica + 10% de celulose; H+20%C=hipercolesterolêmica + 20% celulose, do segundo período de experimento (30 - 60 dias).

\*Valores médios ± desvio padrão de 7 ratos por dieta.

a, b, c. Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8** - Efeito da fração parede celular purificada de levedura de cerveja na digestibilidade aparente (Da) da caseína, utilizando ratos Wistar em crescimento submetidos às diferentes dietas experimentais.

Dietas	Nitrogênio		Digestibilidade aparente
	Ingerido	Fecal	
C	5,73±0,55 <sup>b</sup>	0,42±0,073 <sup>d</sup>	92,63±1,05 <sup>a</sup>
H	6,54±0,70 <sup>ab</sup>	0,67±0,077 <sup>cd</sup>	89,51±1,79 <sup>ab</sup>
H+10%PC	6,08±0,84 <sup>ab</sup>	0,92±0,121 <sup>bc</sup>	84,55 ±3,09 <sup>c</sup>
H+20%PC	5,80±1,61 <sup>ab</sup>	1,28±0,304 <sup>a</sup>	76,89±5,30 <sup>d</sup>
H+10%C	7,56±1,50 <sup>a</sup>	0,93±0,205 <sup>bc</sup>	87,46±2,38 <sup>bc</sup>
H+20%C	7,42±0,97 <sup>ab</sup>	1,11±0,192 <sup>ab</sup>	84,77±3,01 <sup>bc</sup>

C=controle; H=hipercolesterolêmica; H+10%PC=hipercolesterolêmica + 10% de parede celular; H+20%PC=hipercolesterolêmica + 20% de parede celular; H+10%C=hipercolesterolêmica + 10% de celulose; H+20%C=hipercolesterolêmica + 20% celulose, do segundo período de experimento (30 - 60 dias).

\*Valores médios ± desvio padrão de 7 ratos por dieta.

a, b, c, d. Letras diferentes em colunas significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 Trânsito Intestinal

Na Tabela 9 estão demonstrados os dados de comprimento do intestino delgado e a percentagem do tempo de trânsito intestinal dos ratos alimentados com as dietas (C; H; H+10 e 20% PC; H+10 e 20% C). Observou-se que, as dietas contendo parede celular nas concentrações 10% e 20% proporcionaram um aumento significativo (cerca de 30% no comprimento do intestino delgado)

quando comparada com a dieta controle. Comparando com a dieta controle (C), todas as dietas experimentais com fibras provocaram aumento significativo no comprimento do intestino delgado.

O aumento do comprimento do intestino delgado dos animais alimentados com a fração PC (grupo 3 e 4), pode estar relacionado com a fermentação de fibras solúveis que, no caso das  $\beta$ -glicanas no intestino, estas agiriam como um estímulo para secreção de um ou mais hormônios gastrointestinais com atividade trófica. Segundo FELIPPE et al. (1997), os ácidos graxos de cadeia curta têm efeito trófico sob o intestino, sendo estímulos para as células e controlam a proliferação de células epiteliais. O enteroglucagon é um hormônio conhecido como fator de crescimento da mucosa intestinal, sendo que um dos mediadores para ativar esse mecanismo hormonal seria a presença dos ácidos graxos de cadeia curta, produzido durante a fermentação da fibra. FELIPPE et al. (1997) e ROBERFROID (1993) sugerem que o ácido butírico, produto da fermentação das fibras, seria também um importante componente do metabolismo intermediário do epitélio colônico, responsável pelas células epiteliais, o que promoveria uma hiperplasia da mucosa intestinal, acelerando a proliferação dessas células. Não foi encontrada na literatura uma explicação coerente em relação ao tamanho do intestino delgado em ratos, quando alimentados com dietas hipercolesterolêmicas.

Em relação aos animais alimentados com a celulose, EASTWOOD & MORRIS (1992) informam que a fibra insolúvel, no caso a celulose, está relacionada com a variação da sua forma física com o tempo de trânsito intestinal, aumento do peristaltismo das paredes intestinais e/ou alteração nas condições físicas do alongamento do trato gastrointestinal; isso explica a redução do tempo de trânsito intestinal em função da fibra alimentar.

Sabe-se que a fibra solúvel retarda e a fibra insolúvel diminui o tempo de trânsito intestinal (SGARBIERI & PACHECO, 1999), porém, neste experimento a parede celular (que contém maior quantidade de fibra solúvel),

reduziu significativamente o tempo de trânsito intestinal dos animais. Devido a inexistência de outros trabalhos com parede celular de levedura, fica evidente a necessidade de mais estudos sobre o verdadeiro efeito da parede celular no tempo de trânsito intestinal. Verificou-se pela Tabela 9 que o tempo relativo de trânsito intestinal, apresentou redução ( $p < 0,05$ ) em todos os tratamentos, quando comparados com a dieta controle, não ocorrendo diferença entre as dietas hipercolesterolêmicas (H) com ou sem adição de fibra.

Na retirada do intestino foi possível observar que o ceco dos animais alimentados em dieta com 20% de parede celular apresentou-se intumescido, diferindo dos demais grupos. Adicionalmente, os ratos deste grupo apresentaram diarreia no decorrer do ensaio. Sabe-se através da literatura que alguns tipos de fibras nas dietas podem melhorar a defecação, dependendo do tipo da fibra. Por outro lado, a fibra pode provocar em algumas pessoas diarreia ou constipação, devido à indigestibilidade que as mesmas apresentam (KANAUCHI et al., 1997). Segundo MONGEAU et al. (1990), os efeitos sobre o sistema gastrointestinal proporcionados pelas fibras estão relacionados com suas características físico-químicas, assim como sua fermentação e capacidade de retenção de água. Desta forma, a alta concentração de fibra solúvel na dieta com 20% de parede celular pode estar relacionada com a maior atividade fermentativa nos cecos e conseqüentemente, os tornaram intumescidos.

**Tabela 9** - Comprimento total do intestino delgado e o tempo relativo de trânsito intestinal de ratos Wistar alimentados as com diferentes dietas experimentais.

Dietas	Comprimento Total do Intestino Delgado (cm)	% Trânsito* Intestinal
C	103 ± 11 <sup>c</sup>	52 ± 05 <sup>b</sup>
H	108 ± 08 <sup>bc</sup>	72 ± 07 <sup>a</sup>
H+10%PC	124 ± 13 <sup>b</sup>	73 ± 06 <sup>a</sup>
H+20%PC	142 ± 10 <sup>a</sup>	67 ± 10 <sup>a</sup>
H+10%C	117 ± 11 <sup>b</sup>	73 ± 07 <sup>a</sup>
H+20%C	112 ± 06 <sup>b</sup>	65 ± 10 <sup>a</sup>

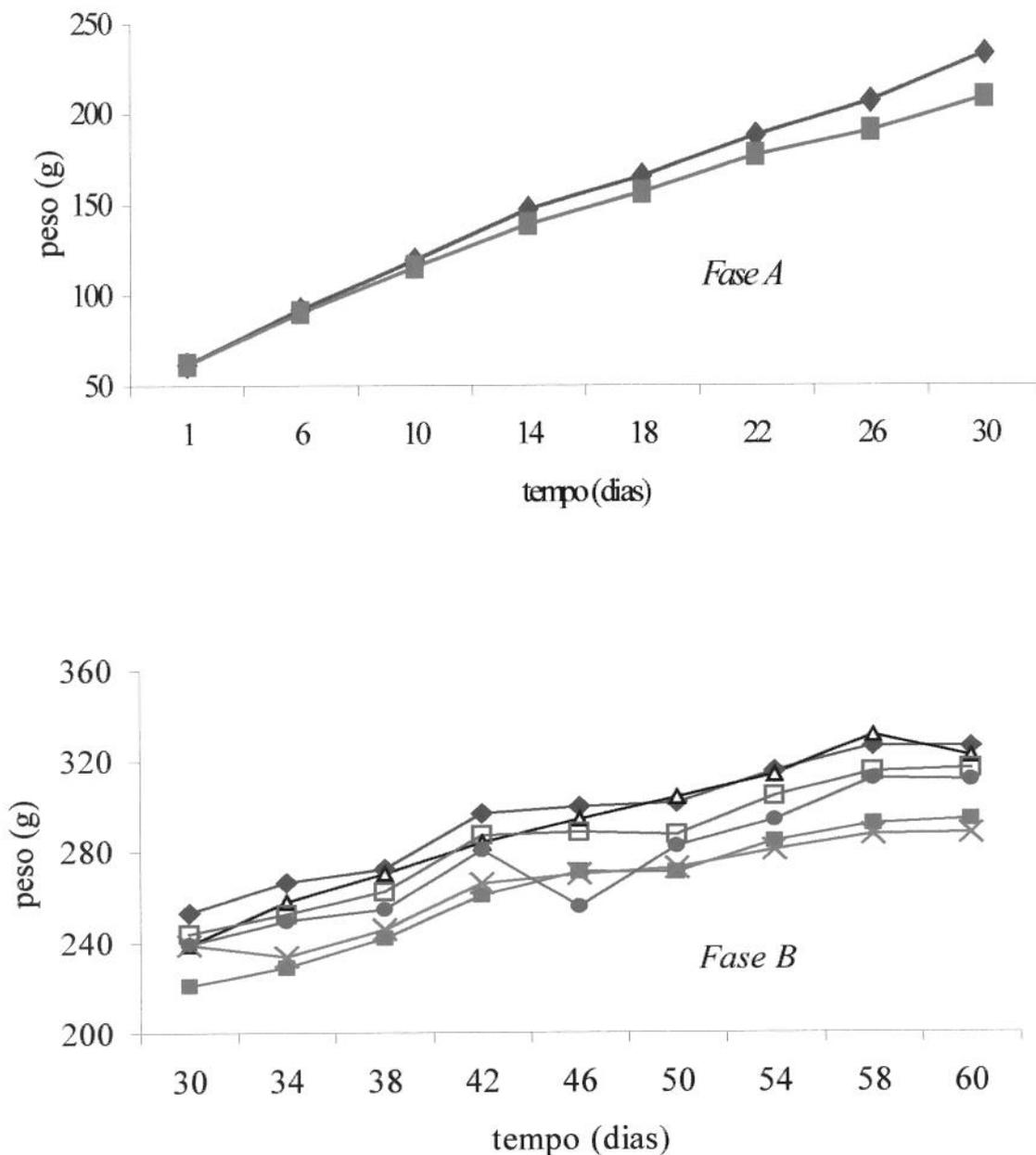
\* % que a dieta marcada com carvão vegetal percorreu no intestino delgado.

\* Valores médios±desvio padrão de 7 animais por dieta.

a, b, c, d. Letras diferentes significam diferença estatística (p<0,05).

#### 4.2.3 Ganho de peso corporal (Curvas de crescimento)

O ensaio biológico teve duração de 2 meses, sendo este dividido em Fase A (0-30d) e Fase B (30-60d), devido a substituição das dietas para os grupos 3, 4, 5 e 6, conforme Figura 4.



**Figura 4** – Curvas de crescimento para ratos Wistar mantidos em diferentes dietas por um período total de 60 dias: Fase A, período de 0-30 dias e Fase B, período de 30-60 dias. ♦ - controle (AIN-93G); ■ - hipercolesterolêmica; Δ - hipercolesterolêmica + 10% de parede celular; X - hipercolesterolêmica + 20% de parede celular; □ - hipercolesterolêmica + 10% de celulose; ● - hipercolesterolêmica + 20% de celulose.

Na Fase A (0-30d) a comparação é feita entre a dieta controle e a dieta hipercolesterolêmica; notou-se que os animais ganharam peso constantemente, e praticamente no mesmo ritmo. Já na Fase B (30-60d), observou-se que os grupos apresentaram variações de peso, mostrando um ritmo mais lento no ganho de peso, isto pode ter ocorrido em função da maior idade dos animais, sendo que os animais que consumiram as dietas com fibras apresentaram aumento na excreção fecal. Além dos animais apresentarem peso corpóreo mais lento, na Fase B, observou-se que as dietas controle e hipercolesterolêmica com 10% de PC, mostraram-se ligeiramente superiores que as demais dietas, seguidas pelas curvas das dietas com 10% ou 20% de celulose. A dieta hipercolesterolêmica (H) e hipercolesterolêmica com 20% de parede celular (H+20%PC) resultaram em curvas de crescimento inferiores a todas as dietas experimentais. A dieta com 10% de PC proporcionaram melhora no ganho de peso dos animais (figura 4). O grupo de animais em dieta com 20% de PC se mostrou inferior igualando a dieta hipercolesterolêmica, podendo estar relacionada com a diarreia que os animais apresentaram quando alimentados em dieta com 20% de PC.

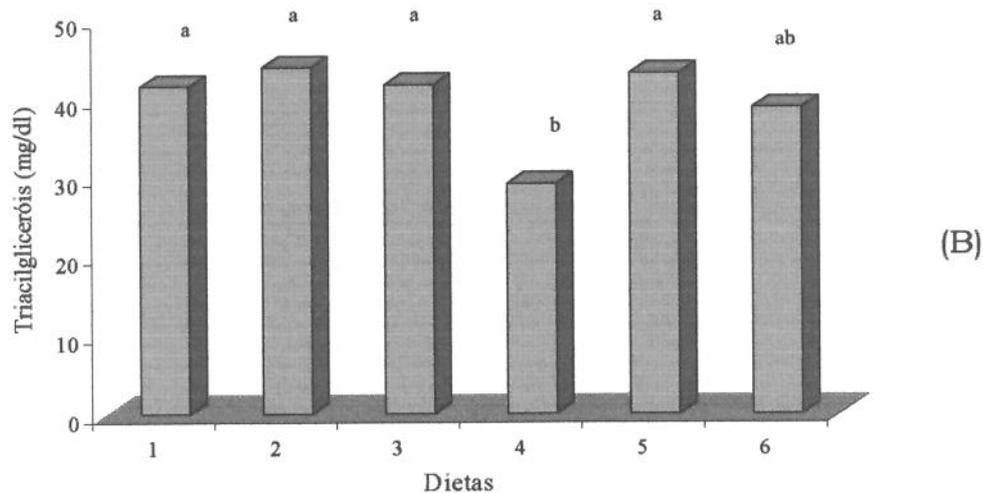
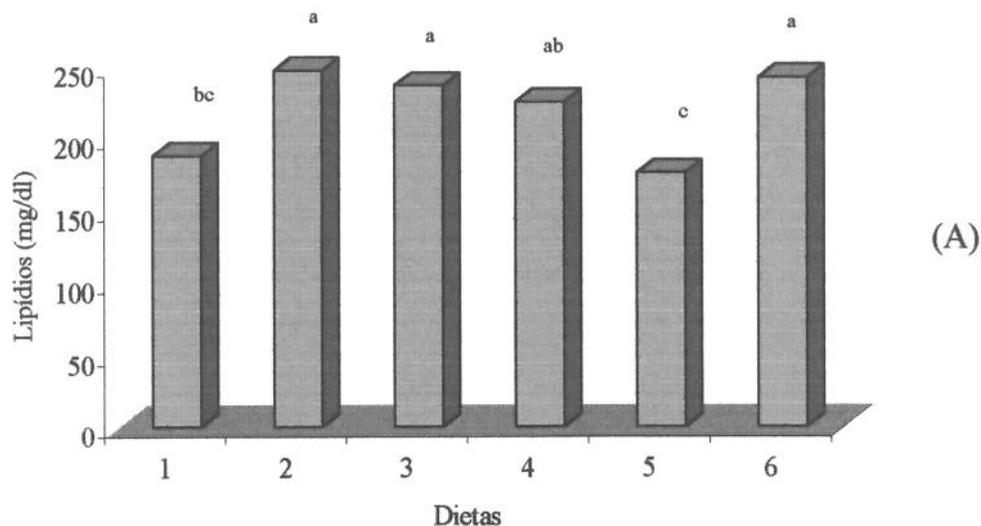
#### **4.3 Determinações sanguíneas (soro)**

Nas Figuras 5 e 6, são apresentados os resultados dos níveis séricos de lipídios totais, triacilgliceróis, colesterol, colesterol-HDL e colesterol-LDL nos animais experimentais, durante todo o ensaio biológico.

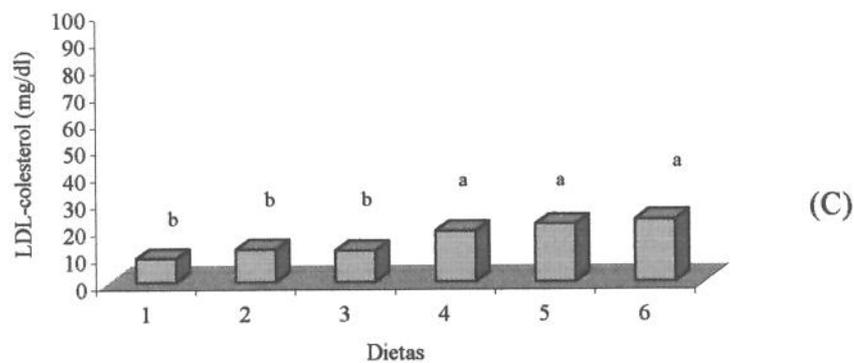
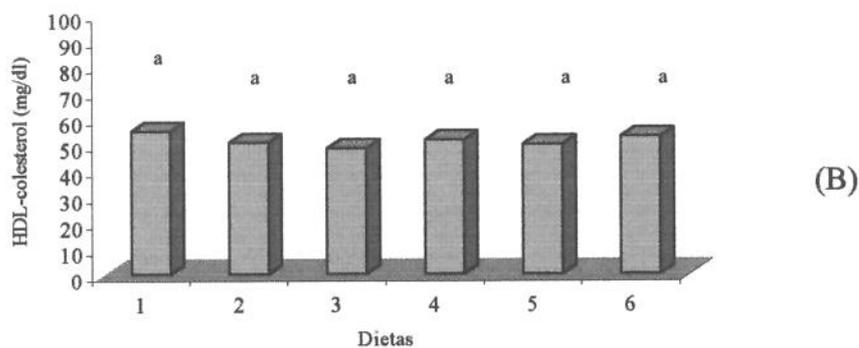
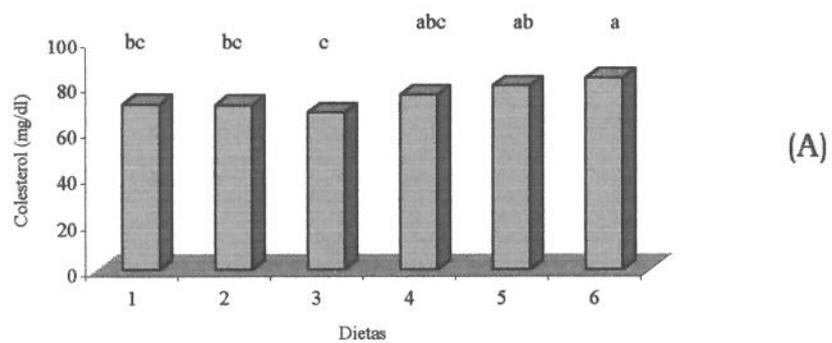
Na Figura 5 (A), observou-se os resultados dos níveis de lipídios totais de ratos Wistar alimentados em dietas com fibras, após um período prévio de 30 dias em dieta hipercolesterolêmica, não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Contudo os grupos que receberam as dietas contendo parede celular apresentaram níveis mais baixos de lipídios e apenas a dieta com 10% de celulose conseguiu diferir de forma significativa das demais dietas. Os resultados obtidos para lipídios estão de acordo com MONGEAU et al. (1990), que mostram que a dieta com fibra insolúvel no caso a celulose, em função de seu efeito gastrointestinal, apresenta um aumento de sais biliares no volume fecal, dificultando a absorção e aumentando a excreção de lipídios no sangue. Contudo, nada foi encontrado na literatura sobre os efeitos da fração da PC de levedura sobre os níveis de lipídios no soro sanguíneo de ratos.

Na Figura 5 (B) verificou-se que a dieta contendo 20% de PC reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis de triacilgliceróis, diferindo deste modo das demais dietas. Entretanto, observou-se que não houve diferença entre a dieta controle e a hipercolesterolêmica que também não diferiram das demais dietas.

Na Figura 6 (A, B, C) são apresentados os resultados dos níveis de colesterol sérico, colesterol-HDL e colesterol-LDL. Observou-se que a fração PC não conseguiu influir de forma significativa e positiva nos níveis séricos de colesterol e colesterol-HDL. Quanto ao colesterol-LDL não houve diferença entre as dietas controle (1), hipercolesterolêmica (2) e H + 10% PC (3), que promoveram níveis significativamente inferiores que as dietas hipercolesterolêmicas com 20% PC e 10% ou 20% C.



**Figura 5 (A, B)** – Níveis séricos de lipídios totais (A) e triacilgliceróis (B) em ratos machos Wistar alimentados com as seguintes dietas: 1. Controle (AIN-93G); 2. Hipercolesterolêmica (substituição do óleo de soja por 5% de gordura de coco e 2% de colesterol); 3 e 4. Hipercolesterolêmica adicionada, respectivamente, de 10 e 20% da fração parede celular (PC); 5 e 6. Hipercolesterolêmica adicionada, respectivamente, de 10 e 20% de celulose. Letras diferentes a,b,c (colunas) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos. \* valores de referência para lipídios totais e triacilgliceróis, (105,29 mg/dL e 15,06 mg/dL, respectivamente).



**Figura 6 (A, B, C)** – Níveis séricos de colesterol total, HDL colesterol e LDL colesterol em ratos machos Wistar, alimentados com as seguintes dietas: 1. Controle (AIN-93G); 2. Hipercolesterolêmica (substituição do óleo de soja por 5% de gordura de coco e 2% de colesterol); 3 e 4. Hipercolesterolêmica, adicionada de 10% e 20%, respectivamente, da fração parede celular (PC); 5 e 6. Hipercolesterolêmica adicionada, respectivamente, de 10% e 20% de celulose. Letras diferentes a, b, c (colunas) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos. \* valores de referência para colesterol total, HDL e LDL (35,50mg/dL; 25,08mg/dL e 8,27mg/dL, respectivamente).

Na figura 6 (B) não houve diferença significativa entre as dietas, e para o colesterol-LDL representado na figura 6 (C) as dietas 4, 5 e 6 apresentaram valores significativamente maiores que as demais dietas. Alguns estudos com aveia mostram também reduções favoráveis de colesterol-HDL e colesterol-LDL (KIRBY et al., 1981; TURNBULL et al., 1987), enquanto outros, confirmando nossos resultados mostram um aumento, também favorável da relação de colesterol-HDL e colesterol-LDL (HOAGLAND, 1989; NISHINA et al., 1991).

Os resultados deste estudo, utilizando a fração parede celular de levedura como fonte de fibra não confirmaram as expectativas, em reduzir significativamente os níveis de colesterol total no soro de ratos Wistar submetidos a dietas supostamente hipercolesterolêmicas, como se tem observado para outros tipos de fibra solúvel como a goma guar (FRIAS & SGARBIERI, 1998 a,b), farelinho de aveia e aveia integral (KIRBY et al, 1981; SHINNICK et al., 1991) e outras formas de fibra solúvel como pectina e *Psyllium* (KRITCHEUSKY, 1997).

Sendo a PC de levedura, formada principalmente de  $\beta$ -glicanas e de fosfomananas (ROSE, 1993), na fibra aveia também predomina a  $\beta$ -glicanas (DE SÁ et al., 1998), na goma guar predominam as galactomananas (FRIAS, 1996), apresentando, portanto, uma semelhança na composição dessas fibras dietéticas. Através da semelhança de composição e de comportamento físico-químico, era de se esperar maior aspecto funcional entre essas várias fontes de fibra alimentar.

Com relação às experiências aqui descrita, a gordura de coco adicionada de colesterol parece não ter sido suficiente para promover a colesterolemia e a trigliceridemia nos ratos. Pode-se observar que apenas lipídios totais apresentaram índice mais elevado na dieta considerada por nós hipercolesterolêmica, comparados com a dieta controle. Para triacilgliceróis e colesterol total, colesterol-HDL e colesterol-LDL, não houve diferença

significativa entre o grupo em dieta controle (7% de óleo vegetal) e o grupo em dieta hipercolesterolêmica (5% de gordura de coco mais 2% de colesterol) considerado como fonte lipídica, onde a gordura de coco contém 92% de ácidos graxos saturados, sendo principalmente ácido láurico e mirístico, que são considerados os principais ácidos graxos saturados com atividade hiperlipidêmica (MILLÁN & ABREU, 1996).

Um fator que possa ter interferido na interpretação dos resultados encontrados nesta pesquisa, pode estar relacionado com a fraca resposta para hiperlipidemia causada pela dieta hipercolesterolêmica.

É possível que, o isolamento e uma purificação parcial dos outros componentes da fibra parede celular (glicomananas) poderiam melhorar a sua ação anticolesterolêmica e modificar seu modo de ação sobre a lipidemia em ratos.

Com os dados reportados neste estudo, chegou-se a conclusão que é necessária maior informações sobre o protocolo utilizado. Pois levando-se em consideração que mesmo sendo um animal resistente a hipercolesterolemia, o rato sempre foi utilizado em experimentos similares (FRIAS & SGARBIERI, 1998 a, b; UBEROI et al., 1992; ROBBINS SEELEY, 1977). WADDELL & DESAI (1981), afirmam que o modelo animal mais adequado nas pesquisas de nutrição humana, é o rato, pois ele ocupa uma posição dominante devido a sua fisiologia semelhante ao homem e suas vantagens de utilização como fácil manejo, baixo consumo, tamanho e fator econômico de manutenção. Por estes motivos é que optamos por trabalhar com ratos, na tentativa de obter bons resultados, considerando que este animal já foi utilizado em experimentos anteriores.

## 5 CONCLUSÃO

Com os resultados do presente trabalho, pôde-se concluir que a fibra semipurificada da parede celular de levedura de cerveja, usada nas concentrações de 10 e 20% em dietas para ratos Wistar, ocasionou os seguintes efeitos:

- com relação ao valor nutritivo da caseína, ocorreu uma redução na digestibilidade aparente para as dietas experimentais com concentrações de 10 e 20% de parede celular semipurificada, respectivamente de 9 e 17%; e para as dietas com 10 e 20% de celulose, respectivamente de 5,5 e 8,5%.
- a fração parede celular semipurificada aumentou significativamente o comprimento do intestino delgado dos ratos em cerca de 30% e reduziu o tempo de trânsito intestinal em 35%, quando comparado com a dieta controle.
- com relação aos níveis sanguíneos, observou-se que no grupo de ratos alimentados com 20% de parede celular semipurificada, diminuíram significativamente os níveis séricos de triacilgliceróis, quando comparados com todos os outros grupos experimentais; a adição de 10% de parede celular semipurificada ou de 10 e 20% de celulose não ocasionaram reduções nos níveis séricos de lipídios totais, colesterol total e colesterol LDL.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, J.; MILLÁN, N. Effect of addition of brewer's yeast to soy protein and casein on plasma cholesterol levels of rabbits. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v.44, n.1, p.18-22, 1994.
2. ACTON, J.C.; BREYER, L.; SATTERLEE, L.D. Effect of dietary fiber constituents on the *in vitro* digestibility of casein. **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, n.2, p.556-560, 1982.
3. ANHEUSER-BUSCH, INC., ST. LOUIS, MO. E.A. Robbins; R. D. Seeley. **Process for the manufacture of yeast glycan**. Int.Cl.<sup>2</sup> A23J 1.18. US n. 4, 122, 196. 24 Oct. 1978.
4. ASSIS, E.M. **Polissacarídeos da parede celular de levedura de cervejaria (*Saccharomyces cerevisiae*), obtida por rompimento mecânico da célula e de processo industrial de autólise**. Campinas, 1996. 115p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
5. AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15th. ed. Arlington, 1990, v.2, p.1167-1174.

6. BABAYAN, T.L.; BEZRUKOU, M.G.; LATOU, U.K.; BELIKOU, V. M.; BELAUTSEVA, E. M.; TITOVA, E. Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: morphological effects, rheological, effects, and dynamics of accumulation of extracelular hidrolisis products. **Current Microbiology**, New York, v.5 n.3, p.163-168, 1991.
7. BEHALOVÁ, B.; BLAHOVÁ, M.; SILLINGER, V.; MACHEK, F. Comparison of various ways of extraction of nucleic acids and of preparation of yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* of *Candida utilis*. **Journal of Biotechnology in Industry, Agriculture, Health Care and Enviromental Protection**, Berlin, v.11, n.6, p.547-552, 1991.
8. BELL, P.L.; HECTORNE, K.; REYNOLDS, H.; BALM, L.T.; HUNNINGHAKE, B.D. Cholesterol-lowering effects of psyllium hydrophilic mucilloid. Adjunct therapy to a prudent diet for patients with mild to moderate hypercholesterolemia. **Journal of the American Medical Association**, Minneapolis, v.261, n.23, p.3419-3423, 1989.
9. BIANCHI, G.; FERRETTI, P.; RECCHIA, M.; ROCCHETTI, M.; TAVANI, A.; MANARA, L. Morphine tissue levels and reduction of gastrointestinal transit in rats. **Gastroenterology**, New York, v.85, n.4, p.852-858, 1983.
10. BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Phisiology**, Ottawa, v.37, n.7, p.911-917, 1959.

11. CHAUDHARY, K.V; WEBER, E.F. Dietary fiber ingredients obtained by processing brewer's dried grain. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, n.2, p.551-553, 1990.
12. DE SÁ, R.M.; FRANCISCO, A.; SOARES, F.C.T. Concentração de  $\beta$ -glucanas nas dirente etapas do processamento da aveia (*Avena sativa L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.4, p.425-427, 1998.
13. DZIEZAK, J.D. Yeasts and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. **Food Technology**, Chicago, v.41, n.2, p.104-121, 1987a.
14. DZIEZAK, J.D. Yeasts and yeast derivatives: applications. **Food Technology**, Chicago, v.41, n.2, p.122-125, 1987b.
15. EASTWOOD, A.M.; MORRIS, R.E. Physical properties of dietary fiber that influence physiological function: a model for polymers along the gastrointestinal tract. **American Society for Clinical Nutrition**, Scotland v.55, n.7, p.436-442, 1992.
16. ENGLER, C.R. New method of measuring cell-wall rupture. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.21, p.1861-1869, 1970.

17. FELIPPE, C.R.C.; PALACOW, M.L.O; CAMPOS, M.R.; VECCHIA, M.G.; CURI, R. Wheat bran-but not oat bran-enriched diets increase the mucosal height of the cecum and colon of newly weaned and aged rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Bethesda, v. 30, n. 8, p.1017-1022, 1997.
18. FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9. ed. São Paulo, Atheneu, 1992, p.177-183.
19. FRIAS, A.C.D. **Efeito da goma guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) sobre a ingestão de alimentos, lipidemia e glicemia em ratos normais e diabéticos**. Campinas, 1996. 117p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
20. FRIAS, A.C.D.; SGARBIERI, V. C. Guar gum effect on blood serum lipids and glucose concentrations of wistar diabetic rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.2, p.241-245, 1998a.
21. FRIAS, A.C.D.; SGARBIERI, V. C. Guar gum effects on food intake, blood serum lipids and glucose levels of wistar rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.48, p.1-14, 1998b.
22. FRIEDWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preprative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, New York, v.18, p.499-502, 1972.

23. FROLICH, W.; ASP, N.G. Minerals and phytate in the analysis of dietary fiber from cereals. **Cereal Chemistry**, St Paul, v.62, n.4, p.238-242, 1985.
24. FURCO, A.M. Produção de biomassa de levedura em destilarias de álcool. In: SGARBIERI, V.C.; DRAETTE, I.S. Workshop produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal. Campinas: **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 1996, p.52-58.
25. GANDER, J.E. Fungal cell wall glycoproteins and peptidopolysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.28, n.1, p.103-119, 1974.
26. HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. CRC Press, Boca Raton: 1991. 312p.
27. HEBERT, D.; PHILLIPS, P.J.; STRANGE, R.E. Chemical analysis of microbial cells In: NORRIS, J.P.; RIBBORS, P.W. **Method in Microbiology**, London: Academic Press, 1971. v.5B, 696p.
28. HEXEBER, S.; WILLUMSEN, N.; ROTEVATN, S.; HEXEBERG, E.; BERGE, R.K. Cholesterol induced lipid accumulation in myocardial cells of rats. **Cardiovascular Research**, London, v. 27, n. 3, p.442-446, 1993.

29. HEYDE, R.V.D. **Relação entre fibras alimentares, lipídios sanguíneos e excreção fecal de ácidos biliares. Um estudo experimental em ratos.** Londrina, 1991. 70p. Tese (Mestrado), Universidade Estadual de Londrina.
30. HOAGLAND, P.D. Binding of dietary anions to vegetable fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Philadelphia, v.37, 1343-1347, 1989.
31. HUGHES, J.S. Potencial contribution of dry bean dietary fiber to health. **Food Technology**, Chicago, v.45, n.9, p.122-126, 1991.
32. HUNNINGHAKE, B.D.; MILLER, T.V.; LAROSA, C.J; KINOSIAN, B.; BROWN, V.; HOWARD, J.W.; DISERIO, J.F.; O'CONNOR, R.R. Hypocholesterolemic effects of a dietary fiber supplement<sup>1-3</sup>. **American Society for Clinical Nutrition**, Minneapolis, v. 59, p. 1050-1054, 1994.
33. JENKINS, D.J.A.; WOLEVER, T.M.S.; VIDGEN, E.; KENDALL, C.W.C.; RANSOM, T.P.P.; MEHLING, C.C.; MUELLER, S.; CUNNANE, S.C.; CONNELL, N.C.O.; SETCHELL, K.D.R.; LAU, H.; TEITEL, J.M.; GARVEY, M.B.; FULGONI III, V.; CONNELLY, P.W.; PATTEN, R.; COREY, P.N. Effect of psyllium in hypercholesterolemia at two monoiinsaturated fatty acid intakes. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 65, n. 5, p. 1524-1533, 1997.
34. JONES, J.M. Cholesterol, cancer, and fiber. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v. 39, n. 4, p. 247-248, 1994.

35. KANAUCHI, O.; AGATA, K. Protein, and dietary fiber-rich newfoodstuff from brewer's spent grain increased excretion of feces and jejunum mucosal protein content in rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Gunma, v.61, n.1, p.29-33, 1997.
36. KINSELLA, J.E. Functional proteins from yeast nucleoprotein for food uses: methods for isolation. **Food Biotechnology**, New York, p. 363-391, 1987.
37. KIRBY, R.W.; ANDERSON, J.W.; SIELING, B.; REES, E.D.; CHEN, W.L.; MILLER, R.E.; KAY, R.M. Oat bran intake selectively lowers serum low density lipoprotein cholesterol concentrations of hypercholesterolemic men. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.34, n.5, 824-829, 1981.
38. KNORR, D.; SHETTY, K.J.; HOOD, L.F.; KINSELLA, J.E. An enzymatic method for yeast autolysis. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.5 p.1362-1365, 1979.
39. KOLLAR, R.; STURDIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v.6, n.3, p.225-237, 1992.
40. NISHINA, P.M.; SCHINEEMAN, B.O; FREEDLAND, R.A Effects of dietary fibers on nonfasting plasma lipoprotein and apolipoprotein levels in rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 12, n.4, p.431-437, 1991.

41. MACWILLIAM, I.C. The structure, synthesis and functions of the yeast cell wall a review. **Journal of the Institute of Brewing**, Surrey, v.76, n.4, p.524-535, 1970.
42. MILLÁN, N.; ABREU, J. Effect of the type of dietary fat on cholesterolemia in rabbits fed brewer's yeast. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v.46, n.1, p.1-17, 1996.
43. MONGEAU, R.; SIDDIQUI, R.I.; EMERY, J.; BRASSARD R. Effect of dietary fiber concentrated from celery, parsnip, and rutabaga on intestinal function, serum cholesterol, and blood glucose response in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Ontario, v.38, n.1, p.195-200, 1990.
44. PACHECO, M.T.B.; CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; SGARBIERI, V.C. Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrates. **Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology**, Tokyo, v.43, n.6, p.601-612, 1997.
45. PAK, N. & ARAYA, H. Macroalgas marinas comestibles de Chile como fuente de fibra dietética: Efecto en la digestibilidad aparente de proteínas, fibra y energía y peso de deposiciones en ratas. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Chile, v.46, n.1, p.42-46, 1996.
46. PEIXOTO, N. Processamento de produtos de biomassa de levedura para alimentação humana: potencial, mercado interno e externo. In: SGARBIERI, V. C.; DRAETTA, I. S. Workshop produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal. Campinas: **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 1996, p.90-98.

47. PROSKY, L.; ASP, N.G.; DEVRIES, J.W.; SCHWEIZER, T.F.; HARLAND, B.F. Determination of total dietary fibers in foods, food products and total diets: interlaboratory study. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, New York, v.67, n.6, p.1044-1052, 1984.
48. REEVES, P.G. NIELSEN, F.H.; FAHEY, J.G.C. AIN-93G purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.
49. ROBBINS, E.A.; SEELEY, R.D. Cholesterol lowering effect of dietary yeast and yeast fractions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, n. 3, p. 694-698, 1977.
50. ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutirtion**, Boca Raton, v.33, n.2, p.103-148, 1993.
51. ROSE, A.H. Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. **Journal of Applied Bacteriology**. Oxford, v.74, n.22, p.1105-1185, 1993. Symposium Supplemet.

52. RUMSEY, G.L.; HUGHES, S.G.; SMITH, R.R.; KINSELLA, J.E.; SHETTY, K.J. Digestibility and energy values of intact, disrupted and extracts from brewer's dried yeast fed to rainbow trout. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.33, p. 185-193, 1991.
53. SCHENEEMAN, B.O. Dietary fiber. A scientific status summary by the institute of food technologists' expert panel on food safety & nutrition. **Food Technology**, Chicago, n.8, p.133-139, 1989.
54. SGARBIERI, V.C. Obtenção de hidrolisados de levedura por via enzimática: composição, propriedades nutritivas e funcionais. *relatório científico – FAPESP*. Campinas, FEA/UNICAMP, 1996. 51p.
55. SGARBIERI, V.C. & PACHECO, M.T.B. Physiologically functional foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, n.(1,2), p. 7-19, 1999.
56. SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D.; VILELA, E.S.D.; BALDINI, V.L.S.; BRAGAGNOLO, N. Pilot plant production of yeast (*Saccharomyces* sp.) derivatives for use as ingredients in food formulations. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v.2, n.(1,2), P.119-125, 1999.
57. SHINNICK, F.L.; MATHEWS, R.; INK, S. Serum cholesterol reduction by oats and other fiber sources<sup>1</sup>. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v.36, n.9, p.815-821, 1991.

58. SLAVIN, J.L. Dietary fiber: classification, chemical analyses, and food sources. **Journal of the American Dietetic Association**. Chicago, v.87, n.9, p.1164-1171, 1987.
59. SUCHER R.W; ROBBINS E.A.; SIDOTI D.R.; SCHULDT E.H.J.; SEEKEY R.D. **Yeast glycan and process of making same**. Int. Cl A23j 1/18. US n. 3, 867,554. 18 Febr. 1975.
60. TINKER, L.F.; SCHNEEMAN, B.O.; DAVIS, P.A.; GALLAHER, D.D.; WAGGONER, C.R. Consumption of prunes as a source of dietary fiber in men with mild hypercholesterolemia<sup>1-3</sup>. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.53, n.5, p. 1259-1265, 1991.
61. TURNBULL, W.H.; LEEDS, A.R. Reduction of total and LDL - cholesterol in plasma by rolled oats. **Journal of Clinical Nutrition and Gastroenterology**, v.2, p.177-180, 1987.
62. UBEROI, S.K.; VADHERA, S.; SONI, G.L. Role of dietary fibre from pulses and cereals as hypocholesterolemic and hypolipidemic agent. **Journal of Food Science and Technology**, London, v.29, n.5, p.281-283, 1992.
63. WALKER, A.R.P. Does the dietary fiber hypothesis really 'work'? **Cereal Foods World**, Minneapolis, v.38, n.3, p.128-134, 1993.
64. WILLIAMS, P.C. The use of titanium dioxide as a catalyst for large scale kjeldahl determination of the nitrogen content of cereal grains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.24, n.3, p.343-348, 1973.

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

## ERRATA

<b>onde se lê</b>	<b>leia-se</b>	<b>página</b>	<b>parágrafo</b>	<b>linha</b>
Análises Estatísticas	Análise Estatística	47		
fibra total (55%)	carboidratos totais (56%)	48	1º	4
foi encontrado o valor médio	encontram-se os valores médios	51	1º	1
para a Fase A experimento (0-30dias)	do primeiro período de experimento (0-30 dias – Fase A)	52	Tabela 6	2, 3

Faltou esta referência.

WADDELL, C.A.; DESAI, I.D. The use of laboratory animals in nutrition research. **Review of Nutrition and Diabetics**, London, v.36, p.206-222, 1981.