

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Bianca Coelho

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO DA
INGESTÃO DE FARINHAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*
Crantz) NO PERFIL LIPÍDICO E GLICÊMICO DE RATOS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia e Biociências
da Universidade Federal de
Santa Catarina como parte dos
requisitos para a obtenção do
Título de Mestre em
Biotecnologia e Biociências
Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Maraschin.

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Coelho, Bianca

Caracterização química e avaliação do efeito da ingestão de farinhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) no perfil lipídico e glicêmico de ratos [dissertação] / Bianca Coelho ; orientador, Marcelo Maraschin - Florianópolis, SC, 2013.

197 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Farinha de mandioca. 3. Amido. 4. Dislipidemias. 5. Hipocolesterolemia. I. Maraschin, Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

**“Caracterização Química e Avaliação do
Efeito da Ingestão de Farinhas de
Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) no
Perfil Lipídico e Glicêmico de Ratos”**

por

Bianca Coelho

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 05/PPGBTC/2013) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

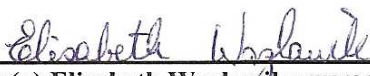
Banca Examinadora:



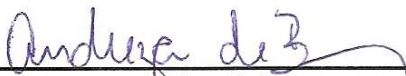
Prof(a) Dr(a) Marcelo Maraschin (FIT/CCA/UFSC)



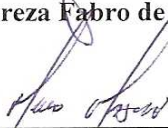
Prof(a) Dr(a) Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte
(NTR/CCS/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Elisabeth Wazlawik (NTR/CCS/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Andreza Fabro de Bem (BQA/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2013.

Aos amores da minha vida,
Ovalda, Giséli e Ercílio
Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Osvalda, a qual eu sou eternamente grata por todo o seu apoio e carinho em todas as escolhas que fiz. Obrigada por me ajudar em mais essa etapa vitoriosa. Amo você!

A toda minha a minha família, à minha irmã Giséli, minha amiga e meu porto seguro, e aos meus irmãos Mário e Ilson, obrigada pelo apoio e carinho. Amo vocês!

Ao meu namorado Ercílio, pela compreensão, e a companhia em alguns finais de semana, feriados e madrugadas lavando gaiolas de experimento animal e auxiliando nas formatações da dissertação, enfim, por tudo! Amo você!

Ao meu orientador, amigo e mestre, Marcelo Maraschin, pelo privilégio de ser sua orientada “mais uma vez” e pelas oportunidades de amadurecimento e crescimento através da sua filosofia de vida e acadêmica. Meus sinceros agradecimentos!

Ao meu coorientador “não oficial”, professor Edson Luiz da Silva, pela paciência e por suas infindáveis contribuições à dissertação nas etapas de criação, escrita e bancada e por disponibilizar seu laboratório para todas as análises bioquímicas dos ensaios com os animais.

Ao pessoal da EPAGRI, em especial ao Enilto e Peruch, pela logística das raízes e farinhas dos agricultores ao laboratório, pelas visitas aos engenhos que contribuíram de forma significativa na construção desse trabalho e por compartilharem enriquecedores conhecimentos a cerca de *M. esculenta*.

À professora Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte pela gentileza em ceder o biotério setorial e todo material necessário à pesquisa. Pelo carinho e preocupação no êxito do trabalho e pela “caça” a voluntários para me auxiliar no dia-a-dia de limpeza e cuidados com os animais. E ao querido Gerson Luis Faccin pela sua contribuição de forma imensurável ao meu trabalho, auxiliando na formulação das rações e nas práticas dos ensaios biológicos. A vocês um obrigado muito especial!

À professora Edna Regina Amante pelo auxílio e orientação nas metodologias e empréstimo de equipamentos, à professora Shirley Kuhnen por ceder seus estagiários nos inúmeros experimentos animais e a professora Elisabeth Wazlawik pelas discussões e contribuições para a dissertação.

A todos os colegas do LMBV pela companhia nestes dois anos, ao grupo de pesquisa sobre mandioca (Virgílio, Eduardo e Rodolfo) e em especial ao Bruno Bachiega, Priscila Rajche de Oliveira, Luiza Ferreira, (Lívia e Iana do LNE, e a Daniela Coelho) que apesar de todos os seus afazeres reservaram um tempinho para auxiliar no ensaio biológico. Saibam que vocês foram fundamentais nessa etapa e eu jamais esquecerei essa contribuição. Muito obrigada de coração!

E à minha querida amiga, Marcela Donato, por sua dedicação, responsabilidade, eficiência e agradável companhia no maçante trabalho, muitas vezes por até 10 horas diárias, para cumprir os experimentos animais. Foi muito importante contar com você, muito obrigada!

À Vanessa Gervin do LFH pelo auxílio nos ensaios de amilose/amilopectina.

Ao pessoal do laboratório de Pesquisa em Lipídios, Antioxidantes e Aterosclerose, que me receberam com muito carinho e sempre ajudaram no que fosse preciso. Às queridas Aline Minuzzi Becker e Fernanda Casagrande pelas ajudas estatísticas, à Heloisa pelas soluções e determinações no Cobas e a Fernanda Cruz, Antônio, Vitor, Alyne e Gabriela pelas maravilhosas tardes de muito experimento e risadas. Foi muito bom trabalhar ao lado de vocês!

À Jucilene do LCME e ao técnico do labmat (Eng. Mecânica) da UFSC, pelo auxílio nas análises de MEV e densidade do amido, respectivamente.

À minha grande amiga, Priscilla Lüdtke Espíndola, que apesar de aspirante a bibliotecária me auxiliou nos ensaios de resposta glicêmica num momento de apuros. Muito obrigada! A você, à Letícia, Gisele, Suellen e demais amigos por compreenderem a minha ausência e que mesmo à distância sempre estiverem torcendo pelo meu sucesso.

Ao Gil, Darlene e Mariana pelas palavras de apoio e o imenso carinho durante as fases finais da dissertação.

A CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq e a UFSC pelo financiamento da pesquisa e condições necessárias para realização desse trabalho.

E aos queridos agricultores por disponibilizaram as raízes e farinhas para a pesquisa. Espero que esse trabalho possa contribuir de alguma forma para melhorias no setor mandioqueiro.

RESUMO

Diferente da maioria das espécies exaustivamente estudadas como milho, trigo e aveia, por exemplo, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) tem sido uma espécie negligenciada. Apesar de estar muito tempo à margem das atenções governamentais, muitos agricultores ainda cultivam-na, viabilizando a produção de derivados de maior interesse econômico como a farinha e o amido. No entanto, alguns engenhos no estado de Santa Catarina ainda são bastante rústicos e funcionam a partir de máquinas ainda muito obsoletas que aliadas a uma falta de articulação de políticas públicas e baixa rentabilidade, tem desestimulado a produção de farinha. Nesse contexto, a EPAGRI, que possui o maior banco ativo de germoplasma (BAG) de mandioca no Brasil, desenvolveu um projeto em parceria com instituições e empresas nacionais e internacionais para modificar esse quadro e contribuir para avanços tecnológicos no setor. Este trabalho constitui uma subárea desse projeto, no contexto de estratégias para agregar valor aos produtos de *M. esculenta*. Nesse contexto, o presente estudo caracterizou físico-quimicamente as farinhas e amidos de genótipos de mandioca (GM) e investigou a ação do genótipo Torta da Penha sobre o perfil lipídico e glicêmico em ratos machos Wistar, como um parâmetro do potencial de atividade biológica daquela biomassa. Os amidos e as farinhas dos GM estudados foram bastante similares quimicamente e apresentaram resultados desejáveis ao uso industrial diante das variáveis estudadas, como por exemplo, a densidade e regularidade no tamanho dos grânulos de amido e teores de amido resistente. Com relação ao conteúdo de metabólitos secundários, as farinhas não se mostraram como fontes ricas em carotenoides, compostos fenólicos e flavonoides, sendo estas

informações relevantes a programas de melhoramento genético da espécie, especialmente visando a biofortificação. No ensaio biológico, a farinha de interesse mostrou-se eficiente, principalmente na redução da gordura retroperitoneal, concentração hepática de triglicerídeos e nos níveis de lipoproteínas potencialmente aterogênicas (não-HDL-colesterol), colesterol total e triglicerídeos plasmáticos dos ratos, confirmando seu potencial como alimento funcional. Em seu conjunto, os resultados subsidiam parcialmente o processo de solicitação de selo de qualidade nutricional e funcional junto à Sociedade Brasileira de Cardiologia, uma abordagem de interesse do setor produtivo visando à agregação de valor à farinha de mandioca. Assume-se que estudos clínicos do efeito da ingestão da farinha sobre o perfil lipídico e glicêmico e uma melhor caracterização físico-química da fração amido resistente são relevantes à elucidação do perfil funcional e nutricional das farinhas dos GM do BAG da EPAGRI

Palavras-chaves: *Manihot esculenta* Crantz, farinha de mandioca, amido, perfil lipídico, perfil glicêmico, ratos.

ABSTRACT

Unlike other well studied crop species such as corn, wheat, and oat, for example, cassava (*Manihot esculenta* Crantz) has been a neglected specie over the last decades. Further, despite it has been out of the scope of public policies for research and technological development for a long time, many farmers still cultivate it, guaranting the production of cassava-derived foods and raw materials of high economic interest, i.e. flour and starch, respectively. However, some cassava mills in Santa Catarina state (southern Brazil), are still quite rustic, using equipments quite obsolete that coupled to a lack of articulation of public policies and low profitability have discouraged the production of flour. In this context EPAGRI, which has the largest cassava germplasm active bank (GAB) in Brazil has an ongoing joined-project with national and international partners to modify this framework, contributing to technological advances in the industry. This work takes part of that effort as a strategy to add value to *M. esculenta* derived products. In this context, the present study aimed at to characterize physicochemically the flours and starches of genotypes of cassava (GC) and investigate the effect of the genotype Torta da Penha on the lipidic and glycemic profiles in Wistar rats, as a parameter of its potential of biological activity. The starches and flours of GC studied were very similar chemically and showed suitable traits for their industrial application such as starch density, regularity in the size of the starch granules and resistant starch content, for example. Regarding the content of secondary metabolites, the studied flours are not rich sources of carotenoids, flavonoids, and phenolic compounds, but this information is important for genetic breeding purposes of that germplasm. Biological

assays revealed that the flours efficiently reduced the retroperitoneal fat, hepatic concentration of triglycerides and in the levels of potentially atherogenic lipoprotein (non-HDL-cholesterol), total cholesterol and triglyceride in rat plasma, confirming the potential of cassava flour as a functional food. Taking together the results subsidize in any extension the process to obtain the functional and nutritional stamp afforded by Brazilian Cardiology Society, an approach of interest as one aims at to add value to cassava flour. Further clinical studies regarding the effect of cassava flour feeding on lipidic and glycemic profile are claimed as relevant, as well as a better physicochemical characterization of the resistant starch fraction in order to elucidate functional and nutritional profiles of the GC belonging to EPAGRI's GAB.

Key-words: *Manihot esculenta* Crantz, cassava flour, starch, lipidic profile, glycemic profile, rats.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 – Mapa geopolítico de Santa Catarina destacando as regiões de produção das farinhas dos genótipos de mandioca estudados.....10

Capítulo 1

Figura 1 – Micrografia eletrônica de varredura dos grânulos de amido dos genótipos de mandioca em estudo. **A** – Oriental, **B** - Samambaia, **C** – Torta da Penha, **D** - Amarelinha, **E** – Branca da Penha73

Capítulo 2

Figura 1 – Conteúdo médio de carotenoides totais ($\mu\text{g. g}^{-1}$, peso seco) de farinhas dos GM e do MIX comercial, determinado por espectrofotometria UV-visível - 450 nm. **AM** = Amarelinha; **TP** = Torta da Penha; **OR** = Oriental; **SB** = Samambaia; **BP** = Branca da Penha; **MIX** = Mix das farinhas comerciais.....93

Figura 2 - Conteúdo médio de flavonoides (**A**) e fenólicos (**B**) totais ($\mu\text{g. g}^{-1}$, peso seco) dos GM e da farinha comercial (MIX), determinado por espectrofotometria UV-visível - 420 nm (flavonoides) e 750 nm (fenólicos). **AM** = Amarelinha; **TP** = Torta da Penha; **OR** = Oriental; **SB** = Samambaia; **BP** = Branca da Penha; **MIX**= Mix das farinhas comerciais.....98

Capítulo 3

Figura 1 – Esquema das etapas do ensaio e do fluxo de atividades do estudo utilizando ratos Wistar como modelo biológico.....119

Figura 2 - Efeito dos tratamentos (**C** = Controle; **H** = Hiperlipídico; **Fr** = Farinha; **FrH** = Farinha-hiperlipídico) no ganho médio de peso corpóreo (g) de ratos machos Wistar durante as 5 semanas de experimento.....127

Figura 3 – Perfil glicêmico de ratos machos Wistar no período de jejum e pós-prandial (15 a 150 minutos), de acordo com os tratamentos em estudo, isto é, **C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-hiperlipídico.....129

Figura 4 – Valores médios de glicose pós-prandial (15 a 150 minutos) subtraídos dos valores basais (jejum) em cada ponto, de acordo com os tratamentos **C** (Controle), **H** (Hiperlipídico), **Fr** (Farinha) e **FrH** (Farinha-hiperlipídico).....131

Figura 5 – Concentrações plasmáticas de colesterol total (**A**) e triglicerídeos (**B**) (mg/dL) em plasma sanguíneo de ratos machos Wistar, conforme o tratamento (**C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-Hiperlipídico).....135

Figura 6 - Concentrações plasmáticas de HDL-C (**A**) e não-HDL-C (**B**) (mg/dL) em plasma sanguíneo de ratos machos Wistar, consoante ao tratamento (**C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-Hiperlipídico).....136

Figura 7 – Concentração plasmática de glicose (mg/dL) conforme o tratamento (**C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-Hiperlipídico) administrado a ratos machos Wistar.....140

Figura 8 – Peso de tecido adiposo retroperitoneal (g) de ratos machos Wistar, consoante às dietas em estudo (**C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-Hiperlipídico).....143

Figura 9 – Detalhe do depósito de gordura retroperitoneal de ratos machos Wistar, conforme o tratamento administrado. **A** – Hiperlipídico (H), **B** – Controle (C), **C** – Farinha (Fr), **D** – Farinha-hiperlipídico (FrH).....145

Figura 10 – Conteúdos (µg/mg proteínas homogenato hepático) de colesterol total (**A**) e triglicerídeos (**B**) hepáticos de ratos machos Wistar, segundo as dietas em estudo (**C** = Controle, **H**= Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-Hiperlipídico).....147

Figura 11 – Peso hepático (g) de ratos machos Wistar segundo a dieta tratamento em estudo, isto é, **C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-Hiperlipídico.....151

Figura 12 – Detalhes do tamanho e da coloração amarelada dos fígados gordurosos, possivelmente esteatóticos (**A** – Hiperlipídico (H) e **D** – Farinha-Hiperlipídico (FrH)), e de fígados com tamanho e aspectos normais (**B** – Controle (C) e **C** – Farinha (Fr)).....152

Figura 13 – Esquema ilustrativo da interação entre o consumo de dietas hiperlipídicas que resultam no aumento do tecido adiposo e consequentemente distúrbios metabólicos que conduzem à esteatose hepática (adaptado de NAGY, 2010).....154

Figura 14 – Peso de fezes (g) úmidas (**A**) e secas (**B**) de ratos machos Wistar, consoante ao tratamento (**C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-Hiperlipídico) na quantificação do peso de fezes úmidas e secas dos animais.....156

Figura 15 – Detalhe da coloração das fezes de ratos machos Wistar dos grupos experimentais em estudo. **A** – Hiperlipídico (H), **B** – Controle (C), **C** – Fr (Farinha) e **D** – FrH (Farinha-Hiperlipídico).....159

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - Caracterização físico-química (g/100g) das farinhas dos genótipos de mandioca em estudo. 51

Tabela 2 - Composição (g/100g) de fibras solúvel e insolúvel em amostras de farinhas dos genótipos de mandioca em estudo. 55

Tabela 3 - Conteúdo (g/100g) de amido resistente nas farinhas dos genótipos de mandioca em estudo. 59

Tabela 4 - Adsorção média de gordura e água (mL .g⁻¹)* de farinhas de genótipos de mandioca em estudo. 62

Tabela 5 - Teor de amilose (% , m/m) dos genótipos de mandioca em estudo, determinados pelos método do iodo e enzimático (Megazyme International Ireland®). 67

Tabela 6 - Densidades dos amidos extraídos dos genótipos de mandioca em estudo determinados em picnomêtro de gás hélio..... 71

Tabela 7 – Diâmetro (µm) dos grânulos de amido dos genótipos de mandioca..... 74

Capítulo 3

Tabela 1 - Composição (g/Kg) das rações experimentais utilizadas nos ensaios nutricionais e bioquímicos com ratos machos Wistar. 116

Tabela 2 - Teores de amido de milho e mandioca diferentes em cada tratamento 130

LISTA DE ABREVIATURAS

AM – Amarelinha

ADA - American Dietetic Association

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOC – Association of Official Analytical Chemists

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BAG – Banco Ativo de Germoplasma

BHT – Hidroxitolueno Butilado

BP – Branca da Penha

C – Controle

Con A - Concanavalina

CT – Colesterol Total

DCC – Doença Cardíaca Coronária

DCV – Doenças Cardiovasculares

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido Etilenodiaminoacético

EEUR – Estação Experimental de Urussanga

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

Fr – Farinha

FrH – Farinha-Hiperlipídico

GM – Genótipo de Mandioca

H – Hiperlipídico

IAL – Instituto Adolf Lutz

IDL – Lipoproteína de Densidade Intermediária

LDL-C – LDL-colesterol; Fração do colesterol associada à LDL

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MIX – Mix de Farinhas Comerciais

Não-HDL-C – Não-HDL colesterol; Diferença entre o colesterol total e aquele associado à fração HDL

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – Oriental

SB – Samambaia

SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TG – Triglicerídeos

TP – Torta da Penha

VLDL – Lipoproteína de Muita Baixa Densidade

CONTEÚDO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.5	Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	5
2.5.1	Importância sócio-econômica.....	5
2.5.2	Produção e classificação das farinhas de mandioca ..	6
2.5.3	Hábito de consumo no Brasil.....	7
2.6	Identificação do local de estudo.....	8
2.7	Caracterização química	12
2.7.1	Metabólitos primários.....	12
2.7.1.1	Caracterização físico-química das farinhas	12
2.7.1.2	Conteúdo de fibras	13
2.7.1.3	Amido resistente	14
2.7.1.4	Amido das raízes de mandioca	15
2.7.2	Metabólitos secundários	17
2.8	Potencial propriedade funcional das farinhas de mandioca	20
2.8.1	Doenças cardiovasculares	20
2.8.2	Metabolismo lipídico e dislipidemias	21
2.8.2.1	Terapia das dislipidemias	22
2.8.2.2	Terapia medicamentosa das dislipidemias	23
2.8.2.3	Mudanças no estilo de vida.....	23
2.8.2.4	Propriedades funcionais da farinha de mandioca ...	24
2.8.3	Selo – Sociedade Brasileira de Cardiologia.....	25
3.	OBJETIVOS.....	27
5.1	Objetivo geral.....	27
5.2	Objetivos específicos.....	27

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
Capítulo 1.....	39
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FARINHAS E AMIDOS DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA (<i>M. esculenta</i> Crantz) DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA EPAGRI	39
1. RESUMO.....	40
2. INTRODUÇÃO	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Amostras	43
3.2 Métodos analíticos.....	43
3.2.1 Variáveis analisadas nas farinhas de mandioca	43
3.2.1.1 Caracterização físico-química.....	43
3.2.1.2 Capacidade de adsorção de óleo e água	44
3.2.2 Variáveis analisadas no amido extraído das raízes .	45
3.2.3 Extração de amido	45
3.2.4 Determinação dos teores de amilose e amilopectina	46
3.2.5 Densidade absoluta	48
3.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	48
3.2.7 Análise estatística	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 Caracterização físico-química das farinhas	50
4.2 Fibra solúvel e insolúvel.....	55
4.3 Amido resistente	58
4.4 Capacidade de adsorção de gordura e água pelas farinhas .	61
4.5 Parâmetros exigidos pela SBC	65
4.6 Teor de amilose.....	66
4.7 Densidade absoluta.....	70
4.8 Forma e tamanho dos grânulos.....	72

5. CONCLUSÕES.....	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
Capítulo 2.....	85
DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOÍDICOS E CAROTENOÍDICOS DE FARINHAS DE MANDIOCA PRODUZIDAS EM SANTA CATARINA	
	85
1. RESUMO	86
2. INTRODUÇÃO.....	88
3. MATERIAL E MÉTODOS	90
3.1 Extração e quantificação de carotenoides totais	90
3.2 Extração e quantificação de compostos fenólicos totais ..	91
3.3 Flavonoides totais	91
3.4 Análise estatística.....	92
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
4.1 Carotenoides totais	93
4.2 Compostos fenólicos e flavonoídicos totais	95
5. CONCLUSÕES.....	101
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
Capítulo 3.....	108
AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INGESTÃO DE FARINHA DE MANDIOCA (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) NO PERFIL LIPÍDICO E GLICÊMICO DE RATOS	
	108
1. RESUMO	109
2. INTRODUÇÃO.....	111
3. MATERIAL E MÉTODOS	114
3.1 Protocolo experimental	114
3.1.1 Seleção do material vegetal.....	114
3.1.2 Ensaio biológico	114

3.1.3	Rações experimentais.....	115
3.1.4	Condução do experimento.....	117
3.2	Análises laboratoriais.....	120
3.2.1	Análises plasmáticas	120
3.2.1.1	Determinação do colesterol total	120
3.2.1.2	Determinação do conteúdo da fração HDL	120
3.2.1.3	Determinação da concentração de triglicerídeos... 121	
3.2.1.4	Estimativa do conteúdo de não-HDL-colesterol:... 121	
3.2.1.5	Determinação da Concentração de Glicose	121
3.2.2	Análises hepáticas	122
3.2.2.1	Preparação do homogenato hepático	122
3.2.2.2	Extração e determinação do teor de colesterol tecidual	123
3.2.2.3	Extração e determinação do conteúdo de triglicerídeos tecidual	124
3.2.2.4	Determinação de proteínas teciduais.....	124
3.2.3	Análise estatística	124
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	126
4.1	Consumo alimentar e ganho de peso corpóreo	126
4.2	Curva glicêmica	129
4.3	Análises de plasma sanguíneo	134
4.4	Tecidos adiposos periepídidimal e retroperitoneal.....	142
4.5	Parâmetros hepáticos.....	146
4.5.1	Colesterol e triglicerídeos	146
4.5.2	Peso do fígado.....	150
4.6	Análises de fezes úmidas e secas.....	155
5.	CONCLUSÕES.....	161

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 163

1. INTRODUÇÃO GERAL

O interesse econômico no cultivo de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), uma espécie nativa do Brasil, reside na produção de biomassa radicular à alimentação humana e animal e de amido, a qual tem ampla utilização nas indústrias química, farmacêutica, alimentar, cosmética e de papel, por exemplo (EMBRAPA, 2003). De fato, há diversas empresas de origem alemã, japonesa e norte-americana instaladas em países em desenvolvimento explorando a produção de amido de mandioca modificado. Em contraste com este nível de desenvolvimento tecnológico encontram-se países como o Brasil, Tailândia, Colômbia e Indonésia, que geram produtos derivados de raízes de *M. esculenta* muito consumidos, porém, pouco estudados (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007).

Dentre esses subprodutos de importância econômica e cultural encontra-se a farinha que é produzida e consumida em todas as regiões do Brasil (DIAS; LEONEL, 2006), e constituiu-se numa das principais fontes de carboidratos na dieta. Além das farinhas, o amido de mandioca, também chamado de fécula ou polvilho, possui inúmeras propriedades ainda não exploradas (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007). Esse tipo de pesquisa é importante para inserção do Brasil no mercado internacional, no entanto é necessário investimento em recursos humanos e tecnologia para o conhecimento das propriedades de amidos e desenvolvimento de produtos e subprodutos com valor agregado (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007).

Estudos sobre a caracterização estrutural de frações amídicas podem ser usados como marcadores bioquímicos para avaliar a diversidade química entre variedades e também são importantes para

uma rápida identificação de cultivares com aplicação industrial. Isso é extremamente relevante, pois, a maior parte dos amidos nativos não apresenta propriedades funcionais requeridas pela indústria, sendo, portanto de uso limitado (KHUNEN, 2007).

Numa segunda abordagem, a mandioca é cultivada por ser uma rica fonte energética devido ao acúmulo de amido em suas raízes, porém, estudos indicam seu potencial como fonte de compostos de interesse à saúde humana e nutrição, dada à presença de carotenoides pró-vitamina A (β -caroteno, por exemplo) e licopeno nas raízes de coloração amarela e rosada, respectivamente (NASSAR et al., 2007).

No organismo humano, os carotenoides possuem uma função importante como precursores da vitamina A e a sua deficiência é um grande problema nutricional em países em desenvolvimento, causando cegueira, xeroftalmia e mortes prematuras, especialmente em crianças (SCOTT; RODRIQUEZ-AMAYA, 2000).

Além dos carotenoides, outros metabólitos secundários também presentes nas raízes de mandioca são importantes à saúde humana como os compostos fenólicos e flavonoides, que possuem atividade antioxidante (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007). Todavia, a despeito dessa relevância, a maioria dos estudos relata apenas a produção destes compostos em raízes deterioradas, em contraste com a carência de informações quanto aos conteúdos destes metabólitos em raízes saudáveis e em seus subprodutos. De fato, a presença desses metabólitos secundários indica uma funcionalidade adicional à matéria-prima e aos produtos derivados de mandioca.

Outros constituintes das raízes e farinhas de *M. esculenta* também podem apresentar potenciais benefícios à saúde humana como

forma de valorização de seus subprodutos. Nesse contexto, em conexão com o tradicional hábito brasileiro de consumo de farinha de mandioca (EMBRAPA, 2003), com conteúdo de fibras brutas de 1,5 a 3,5% (m/m) nas farinhas (CHARLES; SRIROTH; HUANG, 2005), assume-se que a ingestão daquela biomassa pode ser de interesse à intervenção nutricional profilática e terapêutica nas dislipidemias.

Estudos clínicos randomizados demonstram que a modificação das concentrações séricas de lipoproteínas, isto é, a redução de LDL colesterol (LDL-C) em pacientes com doença cardíaca coronária (DCC) ou outras doenças ateroscleróticas, diabéticos e hipertensos, diminui o risco de acidente vascular, doenças coronárias recorrentes e outras causas de mortalidade relacionadas (SMITH et al., 2004).

As doenças do aparelho circulatório abrangem uma ampla gama de síndromes clínicas e aquelas relacionadas à aterosclerose são as principais responsáveis pela doença arterial coronariana, doença cerebrovascular e de vasos periféricos, por exemplo. As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morbidade e mortalidade no Brasil, com impacto relevante no orçamento do Ministério da Saúde (ARAÚJO; FERRAZ, 2005; BRASIL, 2006).

Neste contexto, a intervenção nutricional é fortemente indicada pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) devido à redução ou controle dos níveis séricos de colesterol (CT), LDL-C e triglicerídeos (TG), por exemplo, via consumo de alimentos ricos em antioxidantes, ácidos graxos insaturados, fitosteróis e fibras (SBC, 2007). Existem alguns relatos sobre propriedades farmacológicas atribuídas ao consumo da farinha de mandioca e seu efeito hipocolesterolêmico. No entanto,

apesar do conhecimento popular, até o momento não foram encontradas publicações que investiguem esses efeitos no contexto científico.

Assim, considerando a importância das dislipidemias no processo aterosclerótico e doença cardiovascular, as hipóteses do trabalho consideram que a ingestão de farinhas de genótipos de mandioca (GM) com conteúdos de fibras e amido resistente diferenciados apresentam efeitos positivos sobre o perfil lipídico e glicêmico em modelo biológico de ratos Wistar. Adicionalmente, assume-se que em função da variabilidade genética dos acessos de mandioca (GM) estudados, as características físico-químicas das farinhas e amidos derivados sejam discrepantes, permitindo aplicações em vários ramos industriais.

Dessa forma, o presente estudo objetivou caracterizar físico-quimicamente as farinhas de mandioca e a fração amídica das raízes, além da influência da ingestão de farinha do genótipo Torta da Penha sobre o perfil lipídico e glicêmico de ratos Wistar, considerando a importância das dislipidemias à saúde humana.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão apresentados em três capítulos, sendo o primeiro referente à caracterização físico-química de farinhas e amidos de GM. O segundo capítulo apresenta os resultados da determinação dos conteúdos totais de compostos fenólicos, flavonoídicos e carotenoídicos das farinhas, enquanto o terceiro capítulo descreve o estudo pré-clínico dos efeitos do consumo da farinha do genótipo Torta da Penha sobre o perfil lipídico e glicêmico em ratos Wistar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.5 Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

2.5.1 Importância sócio-econômica

O Brasil é o terceiro maior produtor de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do mundo, atrás apenas da Nigéria e Tailândia, respectivamente (EPAGRI, 2011). Essa cultura constitui o principal alimento na dieta de mais de 800 milhões de pessoas em diversos países e caracteriza-se por apresentar teores apreciáveis de carboidratos, sendo esta a principal fonte energética e de subsistência em países em desenvolvimento (NASSAR; ORTIZ, 2010; CEREDA et al., 2002; EMBRAPA, 2006). *M. esculenta* é uma espécie de elevada importância sócio-econômica na alimentação humana e animal, bem como à produção de fécula, uma biomassa de amplo uso industrial (EMBRAPA, 2006). Em sistemas de produção de agricultura familiar, onde predomina o cultivo desta espécie, a farinha é a principal fonte de renda. Este produto possui alta especificidade regional de acordo com o modo de fabricação, e é largamente fabricada em todo o país, sendo a principal forma de processamento da mandioca (EMBRAPA, 2003; EMBRAPA, 2006).

Apesar do potencial produtivo desta espécie, a participação do Brasil em transações comerciais de produtos e subprodutos desta biomassa no mercado mundial representa menos de 1% (EPAGRI, 2011). A busca de mercados diferenciados com maior agregação de valor e atributos diferenciados de qualidade gera oportunidades aos agricultores de pequeno e médio porte a novos nichos

de mercado nacional ou internacional, como já se verifica em produtos artesanais e naqueles com denominação de origem (MALUF, 2004).

2.5.2 Produção e classificação das farinhas de mandioca

Excetuando-se as sementes, todos os órgãos de *M. esculenta* apresentam teores de glicosídeos cianogênicos, entre eles o maior conteúdo é de linamarina (85%) e em menor expressão de latoaustralina (EMBRAPA, 2006). Quando há uma ruptura na estrutura celular da raiz, por exemplo, estes glicosídeos cianogênicos entram em contato com a linamarase, que é uma enzima que os degrada liberando ácido cianídrico (HCN) o qual é tóxico aos seres humanos por ingestão ou inalação (CARGNON; CEREDA; PANTAROTTO, 2002).

De acordo com os teores de HCN presentes na raiz, a espécie pode ser classificada em mandioca mansa ou de mesa (teores de HCN abaixo de 100 mg.Kg⁻¹), que também é popularmente chamada de macaxeira ou aipim e é utilizada, principalmente, para o consumo humano *in natura* ou fornecimento aos animais, e a mandioca brava (teores de HCN acima de 100 mg.Kg⁻¹) destinada principalmente a produção de farinha e amido (EMBRAPA, 2008). No entanto, é importante destacar que o cultivo de mandioca mansa, não exclui sua destinação também à produção de farinha, como ocorre em algumas regiões no estado de Santa Catarina.

A destinação de mandioca brava para a produção de farinha se dá, principalmente, pelo alto teor de HCN, haja vista que o processamento das farinhas é eficiente na destoxificação do cianeto na mandioca, reduzindo cerca de 97% do conteúdo de HCN principalmente por volatilização durante a etapa de torração no forno, culminando num

produto final que não representa perigo a saúde do consumidor (CHISTÉ et al., 2010).

No Brasil, a principal forma de aproveitamento da mandioca é através da farinha derivada da biomassa radicular para a alimentação humana (EMBRAPA, 2003). A farinha de mandioca precisa estar de acordo com as normas oficiais para ser comercializada. No Brasil, o Padrão Oficial de Classificação de farinha de mandioca foi aprovado pela Portaria MAPA nº 554, de 30/08/1995. A classificação é feita através de quatro especificações:

1. *Grupo*: Farinha d'água, seca (ou de mesa) e mista (que é a mistura da farinha seca e d'água);
2. *Subgrupos* (granulometria): fina, grossa, bijusada, etc;
3. *Classe* (coloração do produto): branca, amarela ou de outras cores;
4. *Tipos* (qualidade do produto): a classificação é numérica, de 1 a 3, sendo 1 o tipo de melhor qualidade (BRASIL, 2011a).

A diferença básica entre a farinha seca e a d'água é que esta última passa por um processo de fermentação e o produto final pode ser peneirado ou não, enquanto a farinha seca sempre passa pelo processo de peneiração o qual define sua granulometria e a classificação dentro dos subgrupos como fina, grossa, etc). A farinha seca é a mais produzida e consumida no país (EMBRAPA, 2003) e será o grupo de farinha utilizado na presente proposta de estudo.

2.5.3 Hábito de consumo no Brasil

A produção e o hábito de consumo de farinha se estendem por todas as regiões do Brasil. Contudo, as exigências do

consumidor no que se refere ao tipo de farinha fabricada variam de acordo os costumes regionais (EMBRAPA, 2003).

A farinha de mandioca é utilizada *in natura* ou constitui a base ao preparo de outros alimentos como beijus, mingaus e farofas. Como exemplo, na região Amazônica predomina a produção da farinha d'água, sendo um alimento básico para a população local. No nordeste, a farinha de mandioca é o alimento mais utilizado sendo acompanhada por feijão, carne seca, café e rapadura. De outra forma, na região sul, a alimentação dos pescadores nos estados do Paraná e Santa Catarina, geralmente, é à base de pirão de farinha de mandioca (chamado popularmente de pirão d'água) com peixe (SOUZA; HARDT, 2002). Além disto, no interior e litoral da região sul e no sudeste e centro-oeste é conhecida a tradição popular do consumo de churrasco acompanhado com farinha de mandioca. Apesar de não existir nenhuma comprovação científica, há um conhecimento tradicional popular associado que acredita que o consumo de farinha está de alguma forma ligado à hipocolesterolemia.

2.6 Identificação do local de estudo

Na safra 2009/2010 o estado de Santa Catarina produziu cerca de 541,5 mil toneladas, numa área colhida de 30,0 mil hectares, figurando no cenário nacional como o estado com o 5º maior rendimento e 13º produtor de mandioca (EPAGRI, 2011). Em Santa Catarina, a agricultura predominante é a familiar e que faz do estado um dos 6 principais produtores de alimentos no Brasil (EPAGRI, 2002).

Anualmente, muitos produtores catarinenses abandonam o cultivo da mandioca e apenas aqueles melhor estruturados permanecem na atividade com finalidade comercial, principalmente nas regiões sul,

vale do Itajaí e alguns municípios da grande Florianópolis, enquanto as demais regiões do estado cultivam mandioca para alimentação humana *in natura* e rações animais (EPAGRI, 2011).

De fato, grande parte dos engenhos que forneceram as farinhas dos genótipos de mandioca (GM) em estudo situa-se na microrregião de Tubarão, sul do estado de Santa Catarina, a exceção do genótipo Oriental (OR) que pertence ao município de Biguaçu (**Figura 1**). Os genótipos Branca da Penha (BP) e Torta da Penha (TP) são cultivados em Paulo Lopes, Imbituba e Garopaba, Samambaia (SB) é um material de abrangência limitada, encontrado no município de Laguna, nas comunidades do Siqueiro e arredores. O cultivo do genótipo Amarelinha (AM) se concentra principalmente nos municípios de Imbituba e Garopaba, com algumas poucas plantações em seu entorno, enquanto o genótipo OR é produzido em sistema agro-florestal e somente encontrado no município de Biguaçu.

Distinto dos demais genótipos que são produzidos em sistema de agricultura convencional, OR é produzido em sistema agro-florestal que, segundo Luca (2011), baseia-se no cultivo de aipim (mandioca mansa) em meio a florestas nativas e exóticas para a obtenção de lenha e aipim para a produção de farinha. Esse sistema agro-florestal é manejado através do uso da terra chamado de roça-de-toco, onde os agricultores realizam queimadas em determinada área, precedendo ao plantio de aipim e espécies florestais, como por exemplo, a bracatinga (LUCA, 2011). Aquele autor informa que após dois anos de cultivo os agricultores colhem os aipins para fabricação de farinha e a área é abandonada (*pousio*), enquanto a bracatinga cresce até atingir o volume adequado à produção de lenha. Após a remoção da lenha, a área é

abandonada para regeneração da vegetação e da sua fertilidade (LUCA, 2011). Por ser um sistema diferenciado de plantio que busca se aproximar do conceito de sustentabilidade, o GM OR foi incluído neste estudo pela hipótese de que o sistema agro-florestal influencia nas características físico-químicas das farinhas.

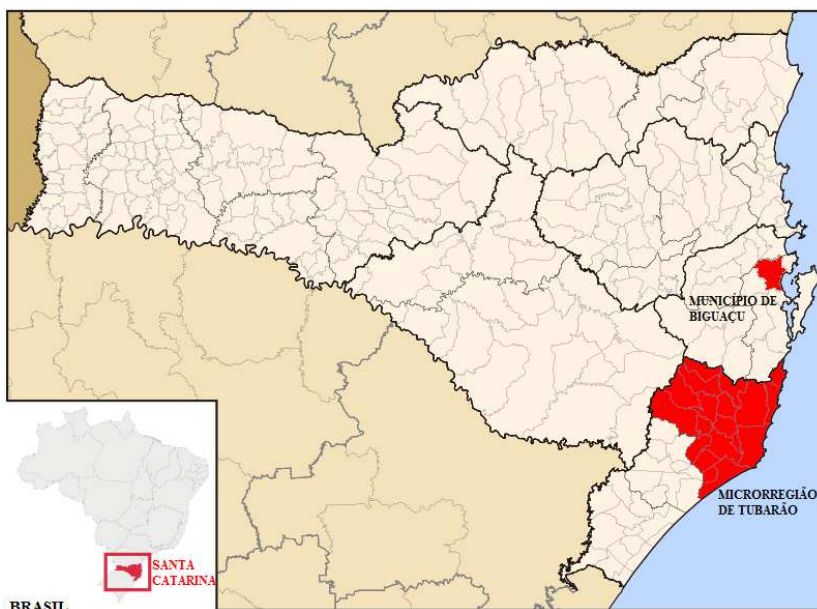


FIGURA 1 – Mapa geopolítico de Santa Catarina destacando as regiões de produção das farinhas dos genótipos de mandioca estudados (Retirado de http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:SantaCatarina_Micro_Tubarao.svg).

Os genótipos de interesse neste estudo são utilizados à produção de farinha branca fina. Esta é uma farinha típica da região aonde estas raízes são produzidas, mas os materiais genéticos citados também podem produzir farinha grossa, uma vez que esta é uma

característica definida pelo processo de produção e não pelo genótipo. O principal comércio dessas farinhas situa-se na região entre Laguna e Florianópolis, porém há relatos de compradores externos, do eixo Rio-São Paulo, mas com volumes de vendas reduzidos.

Em Santa Catarina, na região do alto vale do Itajaí predomina a utilização das raízes de mandioca à produção de amido, enquanto no sul catarinense além do amido encontram-se também muitos engenhos de farinha (EPAGRI, 2002).

Apesar do potencial e inúmeros subprodutos da cadeia produtiva da mandioca, os pequenos agricultores e as pequenas e médias agroindústrias de farinha e polvilho (amido) catarinenses apresentam sérias dificuldades para permanecer na atividade (EPAGRI, 2002). Entre os fatores que contribuem para tal cenário destacam-se a escassez de mão-de-obra, a baixa rentabilidade financeira, o uso de equipamentos obsoletos, a carência de marketing dos produtos e a falta ou desarticulação de políticas públicas (EPAGRI, 2002).

Diante deste contexto, estudos das características nutricionais e eventuais benefícios à saúde humana derivados do consumo da farinha de GM podem lhes agregar valor, amenizando o quadro de baixo retorno econômico associado ao seu cultivo e aumentando a competitividade do setor, estimulando-o. Além disso, criam-se oportunidades para que pesquisas contribuam ao desenvolvimento biotecnológico de *M. esculenta*, via estudos de caracterização e aplicação (processos e/ou produtos) dessas biomassas em escala industrial.

2.7 Caracterização química

2.7.1 Metabólitos primários

2.7.1.1 Caracterização físico-química das farinhas

As raízes de mandioca são reconhecidas por serem excelentes fontes de energia a partir do seu elemento majoritário, o amido, no entanto, são deficientes em enxofre (principal constituinte dos aminoácidos metionina e cisteína), proteínas e minerais. A partir desse cenário nutricional, e devido à importância econômica e cultural desta espécie, diversos programas de melhoramento genético em curso buscam, através da biofortificação, melhorar o conteúdo nutricional das raízes de *M. esculenta* (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009).

Conforme Montagnac, Davis e Tanumihardjo (2009), em comparação a outras culturas tradicionais, as raízes de *M. esculenta* cruas, em uma base de 100g, contém mais carboidratos que a batata e menos que o trigo, arroz e milho amarelo. Já o conteúdo de fibras pode variar com a idade da raiz e conforme a variedade (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009). Relatos na literatura descrevem valores médios de conteúdos para lipídios de 0,1 a 0,8% (m/m), proteínas 1,2 a 1,8%, fibra bruta 1,5 a 3,5%, cinzas 1,3 a 2,8% e carboidratos 80,1 a 86,3%. Este perfil químico das raízes implica diretamente na composição nutricional das farinhas que apresentam como constituintes majoritários as fibras e o amido (CHARLES; SRIROTH; HUANG, 2005).

2.7.1.2 Conteúdo de fibras

Diversos alimentos processados de origem vegetal, em geral, são fontes de fibras, o que é interessante, pois propiciam uma dieta com baixas calorias, gorduras e colesterol, além de funcionar como ingredientes funcionais a produtos derivados, melhorando suas propriedades físicas e estruturais de retenção de óleo, hidratação e vida de prateleira (ELLEUCH et al., 2011).

A orientação da *American Dietetic Association* é de que quantidades adequadas de fibras de fontes vegetais diversificadas devem fazer parte da alimentação diária das pessoas (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2008). Segunda esta mesma instituição, há uma correlação negativa entre populações que consomem mais fibras dietéticas e o aparecimento de doenças crônicas.

As fibras estão presentes em carboidratos de origem vegetal e abrangem uma ampla variedade de compostos que interferem em processos digestivos e sistêmicos dos indivíduos (BROWNLEE, 2011). Em geral, no estômago os alimentos com alto teor de fibras apresentam menor ritmo de esvaziamento gástrico, sendo benéficos, por exemplo, para pessoas obesas, propiciando uma menor ingestão de alimentos (MARLETT; SLAVIN, 1997; SBC, 2007). As fibras também são fonte de energia para as bactérias do intestino grosso, auxiliando na flora intestinal e ainda eliminando algumas substâncias tóxicas (BROWNLEE, 2011). Além disto, as fibras são indicadas pela Sociedade Brasileira de Cardiologia para diminuir ou auxiliar no controle de dislipidemias, o que, pode diminuir o risco de doença aterosclerótica aórtica e coronariana (SBC, 2007).

2.7.1.3 Amido resistente

O amido resistente tem sido classificado como um tipo de fibra solúvel e vem sendo bastante estudado devido as suas propriedades funcionais e potenciais benefícios à saúde (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010). Partes do amido ou de produtos amiláceos que resistem à digestão ao longo do trato gastrointestinal denominam-se amidos resistentes (NUGENT, 2005). O amido resistente abrange uma ampla e diversa gama de materiais (NUGENT, 2005), havendo vários fatores que contribuem à resistência do amido à digestão. Como resultado, os amidos resistentes são classificados em 4 categorias (HARALAMPU, 2000) e são definidos principalmente através das suas características físico-químicas (NUGENT, 2005).

A não digestão do amido resistente tipo 1 resulta de sua estrutura física, pois possui uma molécula compacta e inacessível às enzimas (HARALAMPU, 2000). Já o amido resistente tipo 2 tem uma resistência química, pois os grânulos estão estruturados de maneira que as enzimas não conseguem hidrolisá-los, como, por exemplo, em batatas cruas ou amidos de milho com alto teor de amilose (NUGENT, 2005). Dentre as características estruturais deste tipo de amido, a combinação ótima entre a fração amorfa e a semicristalina nos amidos lentamente digeridos explica essa função. Outros fatores como a granulometria ideal, elevado teor de amilopectina, interação com lipídios e proteínas (que inibem a digestão eficaz) também favorecem a digestão mais lenta dos amidos (LEHMANN; ROBIN, 2007).

Com relação ao tipo 3, é o amido retrogradado, ou seja, aquele amido que foi submetido a um processo de gelatinização (hidratação com aquecimento dos grânulos) e interrompido (retrogradado),

tornando-o acessível as enzimas digeríveis (HARALAMPU, 2000). Esse tipo de procedimento geralmente ocorre durante o preparo de alimentos (cozimento), tornando esse amido rapidamente digerível (HARALAMPU, 2000). No entanto, segundo Fuentes-Zaragoza et al. (2010), durante o resfriamento ou envelhecimento o gel de amido resultante torna-se novamente resistente em decorrência da formação de cristais de amido, isto é, recristalização. Por fim, o tipo de amido resistente tipo 4 refere-se aos amidos modificados quimicamente de tal maneira a reduzir a sua digestibilidade (NUGENT, 2005).

Os benefícios relacionados aos amidos resistentes e a saúde humana são inúmeros. Esse tipo de amido tem a digestibilidade lenta o que, por conseguinte, libera os resíduos de α -D-glucose de forma gradual (HARAMPU, 2000), o que é interessante para indivíduos diabéticos. Outras relações positivas entre esses amidos resistentes está ligada a saúde do cólon humano (NUGENT, 2005), e como redutores de gordura abdominal em ratos (KEENAN et al., 2006), sugerindo que alimentos com amido resistente podem ser interessantes no tratamento da obesidade como alimentos bioativos funcionais. De fato, parece ser consenso que alimentos ricos em amido resistente merecem uma atenção especial e estudos aprofundados quando se busca desenvolver alimentos funcionais para promoção da saúde (LOBO; LEMOS SILVA, 2003).

2.7.1.4 Amido das raízes de mandioca

O amido é constituído basicamente por duas macromoléculas, a amilose e amilopectina (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007). Enquanto a amilopectina é uma molécula altamente ramificada de cadeias curtas, a amilose tem cadeias essencialmente lineares e longas, com poucas ramificações (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007).

O amido comumente faz parte da alimentação diária como fonte de carboidratos e possui muitas propriedades tecnologicamente desejadas pela indústria e que dependem diretamente da sua estrutura e processamento (LEHMANN; ROBIN, 2007).

Dentre as características do grânulo de amido que afetam suas propriedades funcionais está a proporção entre amilose e amilopectina. Essa proporção é peculiar para a fonte botânica e proporções distintas contribuem para diferenciar e tipificar as pastas de amido (CEREDA et al., 2001). De fato, Peroni, Rocha e Franco (2006) ao estudarem seis espécies amiláceas (mandioca, araruta, batata-doce, inhame, cana e gengibre) observaram que as características estruturais dependem da fonte botânica e determinam o comportamento do amido. Consoante às espécies, diferenças entre os teores de amilose e o tamanho e formas dos grânulos de amido foram detectadas.

Portanto, o tamanho e a forma dos grânulos de amido, por exemplo, contribuem às diferenças de propriedades físicas e reológicas daquele polissacarídeo entre as fontes botânicas (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007). Além disso, a relação amilose/amilopectina é um parâmetro importante ao processamento de produtos amiláceos, ou simplesmente do amido, pois grande parte das propriedades físico-químicas desejadas pela indústria depende desta relação que determina muitas das suas funcionalidades (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007).

A nível mundial, a maioria das pesquisas com amido na Europa e Estados Unidos advém de relações de parcerias entre universidades e centros de pesquisas com indústrias, gerando muitas patentes e desenvolvimento tecnológico (CEREDA et al., 2001). No

entanto, no Brasil esse tipo de incentivo é bastante escasso, pois as fecundárias e indústrias não tem suporte financeiro para tal (CEREDA et al., 2001).

2.7.2 Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários não estão ligados ao desenvolvimento e crescimento do organismo e sim a respostas adaptativas visando à sobrevivência e competição entre espécies, mecanismos de defesa e até mesmo a reprodução da espécie, por exemplo, (VAISHNAV; DEMAIN, 2010).

A síntese de metabólitos secundários nas plantas muitas vezes é induzida por fatores ambientais como o ritmo circadiano, o estágio de desenvolvimento e idade da planta, a radiação UV, a sazonalidade, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Além dos fatores ambientais, os componentes bióticos do meio também influenciam na regulação das vias bioquímicas e na biogênese, transporte, acúmulo e degradação de metabólitos secundários (PAVARINI et al., 2012).

Dentre as diversas classes de metabólitos secundários, os carotenoides são pigmentos naturais encontrados nos vegetais com coloração amarela, vermelha ou laranja (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006). Esses compostos são classificados em carotenos ou xantofilas, sendo tetraterpenóides formados por 40 átomos de carbono (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006). Os carotenoides são importantes nas plantas como antioxidantes, corantes, precursores de hormônios e estão envolvidos nos mecanismos do aparato fotossintético (HOWITT; POGSON, 2006).

Na alimentação humana, os carotenoides mais abundantes são licopeno, zeaxantina, luteína, astaxantina, β -caroteno e β -criptoxantina

(RICCIONI, 2009). Esses pigmentos são componentes essenciais na dieta, como o β -caroteno, principal precursor da vitamina A (HOWITT; POGSON, 2006). O déficit dessa vitamina tem causado um considerável número de mortes prematuras e cegueira em crianças, principalmente, destacando a importância do conhecimento dos mecanismos de regulação do metabolismo desses pigmentos em culturas alimentares básicas, como tubérculos e cereais, a fim de melhorar seu valor nutricional (HOWITT; POGSON, 2006).

Nesse contexto, a mandioca como um alimento básico e principal e fonte energética em diversas populações, apresenta em sua constituição carotenoides de interesse à saúde humana. Mais frequente, constata-se a menção da presença de licopeno em genótipos de raízes rosadas (NASSAR et al., 2007), enquanto raízes com polpa amarelas são conhecidas por seus conteúdos de β -caroteno (NASSAR et al., 2007; MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009; BAYOUMI et al., 2010).

Além da importância de alguns carotenoides precursores de vitamina A como o β -caroteno, esta classe de compostos também caracteriza-se por sua atividade antioxidante, de importância à profilaxia de doenças cardiovasculares, por exemplo, (RICCIONI, 2009).

Diante dos potenciais benefícios dessa classe de compostos à saúde humana, programas de melhoramento genético de *M. esculenta* têm sido conduzidos em diversos países, visando sua biofortificação em carotenoides de suas raízes como forma de melhorar nutricionalmente aquela biomassa e produtos derivados (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009).

Além dos carotenoides, os compostos fenólicos formam outra classe de metabólitos secundários presentes nas raízes de mandioca e, subsequentemente, nas farinhas. Esses compostos, pouco estudados no que se refere à sua ocorrência em genótipos de mandioca, pertencem a uma classe que abrange uma grande diversidade de estruturas e, entre eles, estão inclusos os flavonoides (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007). Os compostos fenólicos estão envolvidos nas respostas de alelopatia nas plantas, bem como desempenham papéis importantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fungos (SANTOS, 2007). Da mesma forma, os flavonoides também estão distribuídos no reino vegetal com funções de defesa, como a proteção à radiação ultravioleta e ao ataque de fungos e bactérias, além da importância da sua coloração nas flores para atração de polinizadores (SANTOS, 2007).

Os compostos fenólicos são responsáveis pela coloração, odor e sabor encontrado em muitos vegetais e essas características tem sido empregadas na indústria como corantes de alimentos e bebidas, por exemplo, (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007). Esses compostos também são importantes na alimentação humana, pois, devido ao seu potencial antioxidante, sua ingestão está correlacionada positivamente ao retardo de doenças causadas por reações oxidativas.

Em geral, os estudos relacionam a presença de compostos fenólicos e flavonoides ao processo de deterioração das raízes quando má condicionadas, conforme já estudado por Buschmann et al. (2000) por exemplo. No entanto, poucas são as informações concernentes ao perfil de composição destes metabólitos em raízes saudáveis e, consequentemente, em seus subprodutos. Diante dos seus benefícios à

saúde humana, assume-se como importante conhecer o conteúdo desses compostos em farinhas de mandioca como forma de agregação de valor.

2.8 Potencial propriedade funcional das farinhas de mandioca

2.8.1 Doenças cardiovasculares

A despeito da redução de mortes por doenças cardiovasculares (DCV) nos países desenvolvidos (GRAHAM et al., 2012), há elevações rápidas e significativas em países emergentes, entre eles o Brasil (SBC, 2007). A doença cardiovascular aterosclerótica ainda é a principal causa de mortes no mundo (GRAHAM et al., 2012) e segundo projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS), há uma tendência à continuidade do aumento de DCV, agravando o quadro de morbimortalidade crescente nos países em desenvolvimento (SBC, 2007). Segundo o ministério da Saúde do Brasil, as DCV são a principal causa de morte no país, respondendo por 31,3% dos óbitos em 2009 (BRASIL, 2011b). O atendimento médico e os custos indiretos com DCV foram de aproximadamente \$450 bilhões de dólares naquele ano e em 2010 projeções indicaram que os custos deverão ultrapassar \$1 trilhão de dólares/ano até 2030 (WEINTRAUB et al., 2011).

As dislipidemias são um dos fatores de riscos que mais contribuem às DCV. Entretanto, sua elevada ocorrência se dá por fatores combinados, como hiperlipidemia, hipertensão, tabagismo (GRAHAM et al., 2012) e obesidade (ZHANG, et al., 2010).

Anualmente, cerca de 2,8 milhões de pessoas morrem devido à obesidade e ao excesso de peso (WHO, 2009) e este problema tem aumentado em todo o mundo em crianças e adolescentes (BRASIL, 2011b). Além disso, o sobrepeso e a obesidade assumem proporções

epidêmicas em alguns países desenvolvidos e crescimento rápido e progressivo em países emergentes (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 1998). O aumento de peso, isto é, o índice de massa corporal (IMC), também eleva significativamente o risco de várias patofisiologias como as DCV, o diabetes e o derrame (WHO, 2002).

Há uma forte e independente relação entre a concentração sérica de LDL-C e o risco de doença cardíaca coronária (DCC) e uma relação mais complexa entre o risco de doenças ateroscleróticas e os níveis séricos de HDL colesterol (HDL-C) e TG (SMITH, et al., 2004). O processo de formação da placa aterosclerótica pode iniciar muito cedo, durante juventude, e continuar evoluindo por muito tempo, levando a eventos cardiovasculares que podem ou não ser fatais, culminando num infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e morte súbita. Porém, vários estudos demonstram que a profilaxia e o tratamento de fatores de risco podem evitar, em grande parte, as doenças cardiovasculares (WEINTRAUB et al., 2011).

2.8.2 Metabolismo lipídico e dislipidemias

Aproximadamente 90% dos lipídios consumidos na dieta humana são (TG), os quais são transportados pela circulação sanguínea sob a forma de lipoproteínas (VOET; VOET; PRATT, 2008). Neste contexto, há cinco classes de lipoproteínas, como por exemplo, os quilomícrons, as lipoproteínas de densidade muito baixa (*very low density lipoprotein* - VLDL), lipoproteínas de densidade baixa (*low density lipoprotein* - LDL), lipoproteínas de densidade intermediária (*intermediary density lipoprotein* - IDL) e as lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoprotein* - HDL) responsáveis pelo transporte de colesterol na corrente sanguínea (VOET; VOET; PRATT, 2008).

Do ponto de vista da bioquímica clínica, as dislipidemias são classificadas considerando os valores de colesterol total (CT), LDL-C, TG e HDL-c, gerando quadros clínicos de hipercolesterolemia isolada (LDL-C $\geq$ 160 mg/dL) e hipertrigliceridemia isolada (TG $\geq$ 150 mg/dL) que resultam no aumento do volume de partículas ricas em TG, tais como o VLDL, IDL e os quilomícrons. A hiperlipidemia mista, por sua vez, caracteriza-se por um aumento simultâneo dos valores de LDL-C ($\geq$ 160 mg/dL) e TG ($\geq$ 150 mg/dL), enquanto o HDL-c baixo consiste na redução do HDL-C (homens $<$ 40 mg/dL e mulheres $<$ 50 mg/dL), de forma isolada ou associada à elevação de LDL-C ou de TG (SBC, 2007).

Quadros clínicos de dislipidemias correlacionam-se positivamente com o desenvolvimento de patofisiologias do sistema cardiovascular, tais como a aterosclerose e o acidente vascular cerebral (AVC). A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e de origem multifatorial. A elevação de lipoproteínas aterogênicas como LDL, IDL, VLDL e remanescentes de quilomícrons, a hipertensão arterial e o tabagismo são alguns dos fatores de risco que contribuem à formação da placa aterosclerótica (SBC, 2007).

2.8.2.1 Terapia das dislipidemias

A urbanização da dieta e do estilo de vida são as explicações mais prováveis ao aumento de DCV e outras doenças crônicas, via elevação e prevalência de fatores de riscos que estão diretamente associados à obesidade, diabetes, hipertensão e dislipidemias (ZHANG, et al., 2010).

Vários estudos clínicos já demonstraram que os tratamentos farmacológicos, políticas públicas adequadas e intervenções no estilo de

vida são importantes no tratamento desses fatores de riscos e, portanto, na prevenção das DCV. Na mudança de estilo de vida, preconiza-se o abandono ao tabagismo, o controle no consumo de sal, realização de exercícios físicos e melhoras na dieta (WEINTRAUB et al., 2011). Segundo a SBC (2007) o tratamento não medicamentoso, através da terapia nutricional com mudança de hábitos alimentares é importante no tratamento ou prevenção das dislipidemias, levando-se em conta fatores culturais, regionais, sociais e econômicos.

2.8.2.2 Terapia medicamentosa das dislipidemias

A escolha da classe do hipolipemiante é feita de acordo com o tipo de dislipidemia. Os medicamentos devem ser adotados quando não há efeitos significativos nas mudanças de estilo de vida ou por prioridades clínicas, onde não há possibilidade em aguardar os efeitos das alterações no estilo de vida (SBC, 2007).

Os medicamentos recomendados à hipercolesterolemia isolada são as estatinas e estas podem ser administradas em associação à ezetimiba, colestiramina e menos frequentemente a fibratos ou ácido nicotínico. No entanto, para o tratamento de hipertrigliceridemia isolada o tratamento é feito por fibratos e secundariamente é recomendado o ácido nicotínico ou a associação de ambos. No caso da hiperlipidemia mista, o tratamento farmacológico é guiado dependendo do nível de triglicérides (SBC, 2007).

2.8.2.3 Mudanças no estilo de vida

O tratamento inicial e recomendado às dislipidemias caracteriza-se pela mudança de estilo de vida, como por exemplo, prática de atividades físicas, cessação do tabagismo e alimentação

saudável (SBC, 2007). Neste contexto, para reduzir a concentração plasmática de LDL-C há alguns alimentos funcionais disponíveis no mercado (NIJJAR et al., 2010), sendo que diversos estudos demonstraram a eficiência de constituintes alimentares e fitoquímicos no controle das dislipidemias, tais como as fibras, os carotenoides e os flavonoides (RIBEIRO; SHINTAKU, 2004).

As fibras solúveis como as pectinas, ligam-se ao colesterol e gorduras e diminuem a sua absorção no intestino, resultando em uma diminuição moderada do colesterol total e lipídeos sanguíneos. As fibras insolúveis como a celulose hemicelulose e lignina, apesar de não atuarem na colesterolemia, são importantes na redução da ingestão calórica, porque aumentam a sensação de saciedade. Para os adultos, a recomendação de ingestão de fibra alimentar total é de 20 a 30 g/dia e 5 a 10g destas devendo ser solúveis (SBC, 2007).

2.8.2.4 Propriedades funcionais da farinha de mandioca

Nesse contexto, a farinha de mandioca pode ser promissora como um alimento portador de potenciais propriedades funcionais de interesse à saúde humana, como forma de valorização desse produto. Assim sendo, os benefícios de seu consumo regular pode ser uma alternativa para diminuir o avanço e prevenir o risco das enfermidades do aparelho circulatório discutidas acima.

No Brasil, a regulamentação de alimentos funcionais é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (1999), com publicação das resoluções, nº 18 e 19 (30 de abril de 1999) que aprovam o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e de saúde alegadas em

rotulagem de alimentos e o registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e de saúde em sua rotulagem. Para se obter o registro de um alimento com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde, deve ser formulado um relatório técnico científico comprovando os benefícios e a segurança de uso do alimento. Para a avaliação de segurança e comprovação de eficácia há necessidade de evidências científicas aplicáveis à comprovação da alegação de propriedade funcional e/ou de saúde.

Nesse contexto, ensaios nutricionais e ou fisiológicos em animais de experimentação deverão ser realizados, seguindo as normas da ANVISA, com o intuito de avaliar eventuais efeitos da farinha de mandioca em ratos e fornecer evidências científicas à comprovação da eficácia alegação de propriedade funcional e ou de saúde.

2.8.3 Selo – Sociedade Brasileira de Cardiologia

Desde 1991, a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) atribui o Selo de Aprovação SBC a diversos produtos comercializados nos supermercados em todo o país. O selo é uma garantia ao consumidor de que este está adquirindo um produto diferenciado e que auxilia na prevenção de doenças cardiovasculares (por exemplo, hipertensão, infarto do miocárdio, etc.). Para ser aprovado, o produto precisa adequar-se a critérios estabelecidos pelo Comitê do Selo de Aprovação SBC, o qual se baseia em padrões nacionais e internacionais (SBC, 2013).

Este projeto visa analisar a farinha de mandioca derivada de genótipo específico, segundo os critérios da SBC, a fim de fornecer

suporte aos agricultores para a obtenção da certificação (selo) oferecida por aquela entidade. Caso atendam as exigências necessárias, a conquista do uso do Selo de Aprovação SBC nas embalagens aumentará o valor agregado deste produto, favorecendo as vendas catarinenses e aumentando a competitividade, estimulando o setor mandioqueiro. No mercado mundial, o Brasil tem uma participação ínfima, respondendo por apenas 1% nas vendas externas de produtos e subprodutos de mandioca, atrás da Tailândia, líder absoluta, com 80,1% de participação, e o Vietnã com 14,1% (EPAGRI, 2011). Este cenário evidencia que apesar do potencial de crescimento da indústria nacional afim, ainda há inúmeras deficiências a serem corrigidas para promoção do setor.

3. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil de composição química das farinhas de cinco genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e um mix de variedade comercial, com ênfase nas frações amídica das raízes e analisar a influência do genótipo Torta da Penha sobre o perfil lipídico e glicêmico via ensaios biológicos.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar o teor de fibras (bruta, solúvel e insolúvel), cinzas, proteínas, lipídios, umidade, teor de amido e amido resistente das farinhas dos GM em estudo;
- 2) Determinar a capacidade de adsorção lipídica e de água das farinhas dos GM em estudo;
- 3) Extrair a fração amídica e quantificar a amilose e amilopectina das raízes dos GM;
- 4) Determinar a densidade absoluta dos amidos extraídos das raízes dos GM;
- 5) Determinar a morfologia e o tamanho dos grânulos de amido extraídos das raízes dos GM, via microscopia eletrônica de varredura;
- 6) Determinar o conteúdo total de carotenoides, compostos fenólicos e flavonoides das farinhas dos GM;

- 7) Avaliar o efeito da ingestão de farinha de mandioca do genótipo Torta da Penha sobre o perfil lipídico e glicêmico em ratos;
- 8) Avaliar o enquadramento das farinhas dos GM aos critérios da SBC para concessão do Selo de Aprovação SBC, a ser exposto nas embalagens de farinhas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA-. Resolução - nº 18 de 30 de abril de 1999 – **Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para a análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**; Diário Oficial da União, 03 de maio de 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA-. Resolução - nº 19 de 30 de abril de 1999 – **Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde em sua rotulagem**; Diário Oficial da União, 03 de maio de 1999.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMARA, F. de A.; CAMPOS, S.; FARO, Z. P. de. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19 n. 2, p.233-243, mar./abr. 2006.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION - ADA. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, p. 1716-1731, 2008.

ARAÚJO, D. V.; FERRAZ, M. B. Impacto econômico do tratamento da cardiopatia isquêmica crônica no Brasil. O Desafio da incorporação de novas tecnologias cardiovasculares. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 85, n. 1, p. 1-2, Jul. 2005.

BAYOUMI, S. A. L.; ROWAN, M.; BEECHING, J. R.; BLAGBROUGH, I. S. Constituents and secondary metabolite natural

products in fresh and deteriorated cassava roots. **Phytochemistry**, v. 71, p. 598-604, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Prevenção clínica de doença cardiovascular, cerebrovascular e renal**. Cadernos de Atenção Básica - n.º 14, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde recebe sugestões para plano nacional contra doenças crônicas não transmissíveis**. Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=13203>. Acesso em: 10/11/2011.

BROWNLEE, I. A. The physiological roles of dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 238-250, 2011.

BUSCHMANN, H.; RODRIGUEZ, M. X.; TOHME, J.; BEECHING, J. R. Accumulation of hydroxycoumarins during post-harvest deterioration of tuberous roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Annals of Botany**, v. 86, p.1153-1160, 2000.

CARGNON, J. R.; CEREDA, M. P.; PANTAROTTO, S. Glicosídeos cianogênicos da mandioca: biossíntese, distribuição, destoxificação e métodos de dosagem. In: CEREDA, M.P. (Orgs.). **Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas**. v. 1. São Paulo: Fundação Cargill, p. 83-99, 2002.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL,

E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS e Florianópolis: UFSC, p. 519–535, 2007.

CEREDA, M. P. (coord.). **Propriedades gerais do amido**. 1. ed. São Paulo: Fundação Cargill (Série Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas), v.1, 2001. 224 p.

CEREDA, M. P., et al. Importância das tuberosas tropicais. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas**. São Paulo: Fundação Cargill (Série Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas), v.1, p. 13-25, 2002.

CHARLES, A. L.; SRIROTH, K.; HUANG, T. Proximate composition, mineral contents, hydrogen cyanide and phytic acid of 5 cassava genotypes. **Food Chemistry**, v. 92, p. 615-620, 2005.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. de O.; MATHIAS, E. de A.; OLIVEIRA, S. S. Quantificação de cianeto total nas etapas de processamento das farinhas de mandioca dos grupos seca e d'água. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 221 – 226, 2010.

DIAS, L. T.; LEONEL, M. Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 692-700, jul./ago. 2006.

ELLEUCH, M.; BEDIGIAN, D.; ROISEUX, O.; BESBES, S.; BLECKER, C.; ATTIA, H. Dietary fibre and fibre-rich by-products of

food processing: characterisation, technological functionality and commercial applications: a review. **Food Chemistry**, v. 124, p. 411-421, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: Processamento da mandioca**. 1. ed. Brasília: Embrapa mandioca e fruticultura, 2003. 115 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. ALVES, A. A. C. Fisiologia da mandioca. In: SOUZA, L. da S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P.; FUKUDA, W. M. G. (Orgs.). **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. 1. ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 138-169, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Produção de mandioca (brava e mansa) com insumos orgânicos e químicos em cerrado de Roraima**. In: SCHWENGBER, D. R.; OLIVEIRA, J. M. F. de; SMIDERLE, O. J. (Orgs.). 1. ed. (eletrônica – comunicado técnico, 18). Boa Vista: Embrapa Roraima, 2008. 5 p.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA - EPAGRI. VIEIRA, L. M. (Org.). **Competitividade das farinheiras e polvilheiras na agricultura familiar catarinense**. Florianópolis: Instituto CEPA. set. 2002.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA - EPAGRI. VIEIRA, L. M. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina** – 2010/2011. Mandioca. Instituto CEPA/SC, 2011. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br>>. Acesso em: 20/01/2011.

FUENTES-ZARAGOZA, E.; RIQUELME-NAVARRETE, M. J.; SÁNCHEZ-ZAPATA, E.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Resistant starch as functional ingredient: a review. **Food Research International**, v. 43, p. 931-942, 2010.

GLOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRAHAM, I.; COONEY, M-T.; BRADLEY, D.; DUDINA, A.; REINER, Z. Dyslipidemias in the prevention of cardiovascular disease: risks and causality. **Current Cardiology Reports**, v. 14, p. 709–720, 2012.

HARALAMPU, S. G. Resistant starch – a review of the physical properties and biological impacts of RS. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 285-292, 2000.

HOWITT, C. A.; POGSON, B. J. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, p. 435-445, 2006.

KEENAN, M. J.; ZHOU, J.; MCCUTCHEON, K. L.; RAGGIO, A. M.; BATEMAN, H. G.; TODD, E.; JONES, C. K.; TULLEY, R. T.; MELTON, S.; MARTIN, R. J.; HEGSTED, M. Effects of resistant starch, a non-digestible fermentable fiber, on reducing body fat. **Obesity**, v. 14, n. 9, p. 1523-1534, set. 2006.

KUHNEN, S. **Metabolômica e Bioprospecção de Variedades Crioulas e Locais de Milho (Zeamays). (2007).** 267 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais), Curso de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

LEHMANN, U.; ROBIN, F. Slowly digestible starch – its structure and health implications: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 346-355, 2007.

LOBO, A. R.; LEMOS SILVA, G. M. de. Resistant starch and its physicochemical properties. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 219-226, abr./jun. 2003.

LUCA, F. V. de. **“Botar a roça”: Agricultura de corte e queima e manejo de bracingais em Biguaçu/SC. (2011).** 76 f. TCC (Graduação em Agronomia), Curso de Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MALUF, R. S. Mercados agroalimentares e a agricultura familiar no Brasil: agregação de valor, cadeias integradas e circuitos regionais. **Ensaio FEE**, v. 25, p. 299-322, 2004.

MARCON, M. J. A.; AVANCINI, S. R. P.; AMANTES, E. R. **Propriedades químicas e tecnológicas do amido de mandioca e do polvilho azedo**. 1. ed. Florianópolis: UFSC, 2007. 101 p.

MARLETT, J. A.; SLAVIN, J. L. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 97, n. 10, p. 1157(3), oct 1997.

MONTAGNAC, J. A.; DAVIS, C. R.; TANUMIHARDJO, S. A. Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 181-194, 2009.

NASSAR, N.; ORTIZ, R. Melhorar a mandioca e alimentar os pobres. **Scientific American Brasil**, p. 72 - 77, jun. 2010.

NASSAR, N.; VIZZOTTO, C. S.; SCHWARTZ, C. A.; PIRES JÚNIOR, O. R. Cassava diversity in Brazil: the case of carotenoid-rich landraces. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 1, p. 116-121, 2007.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE. **Clinical guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults**. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, 1998.

NIJJAR, P. S.; BURKE, F. M.; BLOESCH, A.; RADER, D. J. Role of dietary supplements in lowering low-density lipoprotein cholesterol: A review. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 4, p. 248–258, 2010.

NUGENT, A. P. Health properties of resistant starch. **British Nutrition Foundation**, v. 30, p. 27-54, 2005.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5-16, set. 2012.

PERONI, F. H. G.; ROCHA, T. S.; FRANCO, C. M. L. Some structural and physicochemical characteristics of tuber and root starches. **Food Science and Technology International**, v. 12, p. 505-513, dez. 2006.

RIBEIRO, K. C.; SHINTAKU, R. C. O. Influência dos lipídios da dieta sobre a aterosclerose. **Conscientiae Saúde**, v. 3, p. 73-83, 2004.

RICCIONI, G. Carotenoids and cardiovascular disease. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 11, p. 434-439, 2009.

SANTOS, R. I. dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS e Florianópolis: UFSC, p. 403–434, 2007.

SCOTT, K. J., RODRIQUEZ-AMAYA, D. Pro-vitamin A carotenoid conversion factors: retinol equivalents - fact or fiction? **Food Chemistry**, v. 69, p. 125-127, 2000.

SMITH, S.C.; JACKSON, R.; PEARSON, T.A.; FUSTER, V.; YUSUF, S.; PHIL, D.; FAERGEMAN, O.; WOOD, D.A.; ALDERMAN, M.; HORGAN, J.; HOME, P.; HUNN, M.; GRUNDY, S.M. Principles for national and regional guidelines on cardiovascular disease prevention. A scientific statement from the world heart and stroke forum. **Circulation**, v. 109, p. 3112-3121, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA - SBC. IV Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e prevenção de aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, p. 3-19, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA - SBC. **Selo de Aprovação SBC**. Disponível em: < <http://prevencao.cardiol.br/selo/pq-certificar.asp> >. Acesso em: 06/01/2013.

SOUZA, M. D. C. A.; HARDT, P. P. Evolução dos hábitos alimentares no Brasil. **Brasil Alimentos**, v. 15, p. 32-39, 2002.

VAISHNAV, P.; DEMAINE, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223-229, 2010.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p.590 - 626, 2008.

WEINTRAUB, W. S.; DANIELS, S. R.; BURKE, L. E.; FRANKLIN, B. A.; GOFF JR, D. C.; HAYMAN, L. L.; LLOYD-JONES, D.; PANDEY, D. K.; SANCHEZ, E. J.; SCHRAM, A. P.; WHITSEL, L. P.

Value of primordial and primary prevention for cardiovascular disease: a policy statement from the American Heart Association. **Circulation – Journal of the American Heart Association**, v. 124, p. 967-990, 2011.

WHO 2002. The World health report 2002: **Reducing risks, promoting healthy life**. Geneva, World Health Organization, 2002.

WHO 2009. **The global burden of disease: 2004 update**. Geneva, World Health Organization, 2009.

ZHANG, L.; QIN, L.Q.; LIU, A.P.; WANG, P.Y. Prevalence of risk factors for cardiovascular disease and their associations with diet and physical activity in suburban Beijing, China. **Journal of Epidemiology**, v. 20 n. 3, p. 237-43, 2010.

Capítulo 1

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FARINHAS E AMIDOS DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA (*M. esculenta* Crantz) DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA EPAGRI

1. RESUMO

Os principais produtos e subprodutos da mandioca (*M. esculenta* Crantz) são a farinha e o amido. A farinha é tradicionalmente consumida em todas as regiões do Brasil e tem importância econômica e cultural, além do amido que é importante matéria-prima das indústrias alimentícia, têxtil, de papel e farmacêutica, por exemplo. A EPAGRI/EEUR possui o maior banco ativo de germoplasma (BAG) de mandioca do país, e, no entanto, há escassez de informações a respeito das características (bio)químicas desses genótipos. Nesse contexto, o intuito do presente trabalho foi caracterizar o perfil de composição química de farinhas de cinco genótipos de mandioca do BAG e um comercial, com ênfase na fração amídica. Buscou-se, adicionalmente, caracterizar àquelas biomassas quanto às variáveis de importância à obtenção do Selo de Aprovação da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) aos produtos derivados dos genótipos em estudo. As farinhas dos genótipos de mandioca mostram-se semelhantes quanto à maioria das variáveis analisadas. De interesse, ressalta-se que a regularidade no tamanho dos grânulos, conteúdo de fibras insolúveis e amido resistente e densidade absoluta do amido apresentaram valores desejáveis, ou acima da média em relação ao observado na literatura, à aplicação industrial. Em seu conjunto, os resultados corroboram as potenciais propriedades funcionais das farinhas de mandioca e sugerem a necessidade de estudos complementares, principalmente quanto à completa caracterização dos amidos.

2. INTRODUÇÃO

As farinhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) são produzidas e consumidas em todas as regiões do Brasil, com destaque para um elevado consumo nas regiões norte e nordeste (DIAS; LEONEL, 2006). A farinha é uma biomassa fonte de energia devido aos elevados teores de amido, destacando-se ainda por seus conteúdos de fibras, fósforo, potássio, ferro, cálcio e sódio (DIAS; LEONEL, 2006). A importância econômica das raízes de *M. esculenta* reside em seu constituinte majoritário, o amido, o qual pode ser utilizado na alimentação humana e animal, além de uma gama diversa de aplicações nas indústrias alimentícias, cosméticas, farmacêuticas, têxtil e química, por exemplo (EMBRAPA, 2003).

Nos países desenvolvidos, as indústrias são os maiores consumidores de amido, haja vista seu emprego em inúmeros alimentos processados, como por exemplo, espessante em sopas, caldos e molhos de carne, geleificante em balas e pudins e estabilizante de molhos de saladas (CEREDA et al., 2001). Além da indústria alimentícia, o amido tem importância como matéria-prima na indústria têxtil, de papel, na elaboração de excipientes farmacêuticos e na elaboração de materiais termoplásticos biodegradáveis (CEREDA et al., 2001).

Estudos a partir de amidos de espécies nativas do Brasil, como a mandioca, representam importantes contribuições, principalmente quanto à ampliação de conhecimentos e desenvolvimento de culturas pouco exploradas, contribuindo à valorização de seus (sub)produtos (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007).

A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) possui um dos maiores bancos ativos de

germoplasma (BAG) de mandioca do país, junto à estação experimental de Urussanga (EEUR). Contudo, a caracterização genética, bioquímica e agronômica dos genótipos, bem como das características físico-químicas de seus produtos de maior interesse, isto é, farinhas e amido, são bastante escassas. Diante desse contexto, este trabalho objetivou determinar o perfil de composição química de farinhas de cinco GM e um comercial, com ênfase na fração amídica. Além disto, buscou caracterizar aquelas biomassas quanto ao perfil químico necessário à comprovação do seu potencial como alimento funcional, subsidiando a obtenção do Selo de Aprovação da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) pelos produtores de farinha catarinenses.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Amostras de farinhas puras (~3000 g) de 6 GM, a saber: Branca da Penha (BP), Samambaia (SB), Amarelinha (AM), Torta da Penha (TP) e Oriental OR (produzida em sistema de manejo agro-florestal) foram coletadas junto aos produtores catarinenses em engenhos da microrregião de Tubarão (genótipos BP, TP, SB e AM) e no município de Biguaçu (genótipo OR). As amostras, oriundas da safra 2010/2011, pertencem ao grupo seca (farinha de mesa) e subgrupo fina e constituem parte do BAG da EPAGRI/EEUR. Adicionalmente, uma amostra comercial (~3000 g), isto é, mistura de farinhas de genótipos (MIX), foi obtida em estabelecimento de venda em Florianópolis.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Variáveis analisadas nas farinhas de mandioca

3.2.1.1 Caracterização físico-química

As farinhas de mandioca foram caracterizadas físico-quimicamente consoante às variáveis descritas na sequência:

- Fibra alimentar (solúvel e insolúvel), amido resistente e proteína (N_2 total x 6,25 – método AOAC nº 991.23) segundo as metodologias da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005);
- Cinzas (IAL, p. 105), fibra bruta (matéria fibrosa) (IAL, p. 54), lipídios (IAL, p. 105) e umidade e substâncias voláteis à 105°C

(IAL, p. 98), segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005);

- Teor de amido, segundo a Instrução Normativa nº 20, de 21/07/1999 (BRASIL, 1999b).

Os valores das variáveis acima descritas foram expressos em g/100 g de farinha seca.

3.2.1.2 Capacidade de adsorção de óleo e água

A capacidade de adsorção de óleo e água das farinhas em estudo foi determinada a partir da metodologia original de Beuchat (1977), com adaptações. Em tubos falcon devidamente tarados foram adicionados 1g de farinha das amostras e 15 mL de óleo de soja comercial, ou água destilada, respectivamente para o ensaio de capacidade de adsorção de óleo ou água. Estes conteúdos foram misturados (Vórtex) e incubados sob agitação em banho-maria (30 min, 37 ± 1 °C). A mistura foi centrifugada (4000 rpm, 30 min), o sobrenadante descartado e o conjunto (tubos falcon + farinha adsorvida com óleo/água) foi pesado. Subtraindo-se peso do falcon e peso inicial da farinha (1g peso seco) foi mensurada a quantidade de óleo/água adsorvida em gramas (massa de óleo/água adsorvida). Esse resultado foi aplicado na fórmula (equação 1), em função da densidade do óleo (0,87743 g.mL⁻¹) ou água (1 g.mL⁻¹), para obtenção do volume (mL) de óleo/água. Os valores, média de três repetições, foram expressos em mL de óleo, ou água, adsorvido por grama de farinha seca.

Equação 1:

$$d = \frac{m}{v}$$

Onde:

d = densidade do óleo, ou da água (g.mL⁻¹);

m = massa de óleo, ou água adsorvida (descontadas as massas do tubo falcon e farinha, 1g (g));

v = volume do óleo, ou água (mL).

3.2.2 Variáveis analisadas no amido extraído das raízes

3.2.3 Extração de amido

Amostras de raízes (500g, peso fresco) foram trituradas utilizando ralador manual de cozinha, seguido da extração da fração amídica por filtração da biomassa em suporte de tecido *voil* sobre duas peneiras (60 *mesh*) sobrepostas. Para tal, 1000 ml de água destilada foram adicionados à biomassa triturada, seguido da coleta do filtrado, isto é, fração amídica. Este procedimento foi repetido sequencialmente três vezes, resultando em um filtrado incolor, isto é, sem amido. Os volumes de filtrados foram reunidos, decantando (4 h), descartando-se o sobrenadante e recuperando-se o precipitado, o qual foi ressuspensionado em água (~ 1000 mL) e novamente decantado *overnight*. A fração amídica precipitada foi transferida para bandejas plásticas e seca em estufa (45° C), com circulação de ar (SCHOCH; MAYWALD, 1968).

3.2.4 Determinação dos teores de amilose e amilopectina

O teor de amilose foi determinado através de dois métodos: o colorimétrico, o qual utiliza uma solução de I-KI (iodo – iodeto de potássio) e baseia-se na formação de um complexo amilose-iodo e através de kit comercial para determinação daqueles polissacarídeos (Megazyme International Ireland Limited®, Wicklow, Irlanda).

O método colorimétrico utilizou metodologia descrita por Williams, Kuzina e Hlinka (1970), aonde 40 mg de amido foram adicionados de 10 ml de 0,5 N KOH e incubados *overnight* até completa gelatinização das amostras. A suspensão foi agitada (Vórtex) e transferida a balão volumétrico (100 mL), completando-se o volume com água destilada. Uma alíquota da solução de amido (10 ml) foi adicionada de 5 mL de 0,1 N HCl e 0,5 mL de lugol. O volume foi diluído para 50 mL, seguido da leitura da absorbância (625 nm) em espectrofotômetro (Hiatachi U-1800). Para efeito de cálculos a quantificação de amilose utilizou curva-padrão externa de amilose e amilopectina de mandioca (0 a 12 mg.mL⁻¹, (amilose) e 8 a 20 mg.mL⁻¹, (amilopectina) – $y = 38,923x$; $r^2 = 0,99$), extraídas segundo McCready e Hassid (1943). As amostras de amilose e amilopectina de mandioca foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Tecnologia de Frutas e Hortaliças (LFH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os valores, média de três repetições foram expressos em porcentagem de amilose.

Para determinação do teor de amilose através do kit Megazyme, amostras (25 mg) foram dispersas em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), sob aquecimento em banho-maria. As

amostras foram precipitadas com a adição de 6 mL de etanol (95%), centrifugadas (4000 rpm, 2 min) para delipidização e o amido precipitado foi coletado, diluído em DMSO (2 mL) em banho-maria (15 min), e transferido para balões volumétricos (25 mL) que foram aferidos para diluição com solução salina contendo Concanavalina (Con A).

A partir dessa solução A (amido + Con A) foram obtidos o amido total e a amilose hidrolisados para quantificação, conforme descrito a seguir:

1) Amilose hidrolisada: foi obtida com a adição de 1 mL da solução A e 0,5 mL do solvente Con A. Esse solvente tem a função de precipitar a amilopectina que é removida da solução após centrifugação (10.000 rpm a 10 min). Dessa forma, alíquotas (1 mL) do sobrenadante contendo (amilose) foram hidrolisadas enzimaticamente a α -D-glucose e adicionadas de 4mL do reagente contendo oxidase/peroxidase;

2) Amido total hidrolisado: foi obtido com a adição de 1 mL da solução A e 0,5 mL do solvente Con A. O teor de amido total hidrolisado a α -D-glucose foi determinado colorimetricamente a partir de 4mL do reagente contendo oxidase/peroxidase.

As absorbâncias das soluções dos itens 1 (amido total hidrolisado) e 2 (amilose hidrolisada) foram lidas em espectrofotômetro UV-vísivel (Hiatachi U-1800 - 510nm). A determinação de amilose foi feita em duplicata e calculada em porcentagem a partir da equação 2:

Equação 2:

$$\text{Amilose (\%)} = \frac{\text{Amilose hidrolisada}}{\text{Amido total hidrolisado}} \times 66,8$$

Onde:

Amilose hidrolisada = absorbância da solução do item 1;

Amido total hidrolisado = absorbância da solução do item 2;

66,8 = constante obtida a partir da razão entre 6,15 e 9,2, que são valores de diluição dos fatores de Con A e do amido total extraído, respectivamente, em porcentagem.

Os valores, média de duas repetições foram expressos em porcentagem de amilose.

3.2.5 Densidade absoluta

A determinação da densidade absoluta utilizou picnomêtro de gás hélio (QuantaChrome, modelo MVP-4DC), conforme descrito por (SCHAEFER, 2007). Os valores de densidade absoluta (g.cm^3) representam a média de cinco repetições.

3.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os detalhes da morfologia e tamanho dos grânulos de amido foram obtidos a partir de MEV realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Amostras (~ 10 mg – peso seco) de farinhas foram depositadas sobre fita adesiva dupla face de carbono e transferidas para suporte de alumínio (*stub*). Posteriormente, a amostra foi recoberta com uma fina camada de ouro, usando polarina E5001. A amostra recoberta foi visualizada em microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM- 6390LV, operando em 10 Kv, de modo a permitir a visualização dos detalhes morfológicos dos grânulos

de amido. O tamanho dos grânulos foi medido com o auxílio do software *ImageJ* versão 1.45s, e as formas foram observadas através das micrografias com magnificação de 500 vezes. As medidas de tamanho de grânulos foram coletadas em três áreas/micrografia/amostra e consideraram quatro grânulos/área ($n = 12$) para efeitos de cálculo da variável

3.2.7 Análise estatística

A estatística descritiva foi apresentada na forma de média e desvio padrão, ou mediana (interquartis: mínimo 25% - 75% máximo) quando apropriado. Uma função logarítmica foi aplicada ao conjunto de dados amostrais, quando requerido. Aos dados com distribuição gaussiana aplicou-se a análise de variância de uma via (ANOVA) e o teste complementar de Tukey ($P < 0,05$). Aos dados com distribuição não-gaussiana aplicaram-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste complementar de Dunn's. As análises estatísticas foram realizadas com o suporte dos programas *SigmaStat* (v. 3.5) e *Excel* (Microsoft Office, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química das farinhas

As farinhas dos GM analisados não diferiram estatisticamente quanto às características químicas de interesse (**Tabela 1**).

De acordo com a Instrução Normativa nº 52 (7 de novembro de 2011, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - BRASIL, 2011) não há referências com relação aos teores de lipídios e proteínas da farinha de mandioca. A farinha de *M. esculenta* é um produto que reconhecidamente apresenta teores muito baixos de lipídios e proteínas (EMBRAPA, 2006) e, de fato, os resultados do presente trabalho revelaram teores inferiores a 1% (m/m) de lipídios e, em média, 1,36% (m/m) de proteínas (**Tabela 1**).

TABELA 1 - Caracterização físico-química (g/100g) das farinhas dos genótipos de mandioca em estudo.

<i>Genótipos</i>	<i>Lipídios</i>	<i>Proteína</i>	<i>Teor de Amido</i>	<i>Fibra Bruta</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Umidade</i>
<i>Amarelinha</i>	0,55	1,47	81,70	1,80	0,72	6,00
<i>Branca da Penha</i>	<0,5	1,51	78,10	1,90	0,69	6,69
<i>Samambaia</i>	0,69	1,27	78,30	1,20	1,08	8,56
<i>Torta da Penha</i>	0,93	1,40	79,01	2,15	1,66	6,20
<i>Oriental</i>	0,77	1,21	82,70	1,30	1,18	5,61
<i>Mix</i>	0,79	1,27	81,10	1,30	1,10	7,30

Comparativamente aos conteúdos de proteínas descritos por Dias e Leonel (2006), isto é, 0,57% a 1,08% (m/m), para amostras de genótipos do grupo farinha seca produzidos em outros estados brasileiros, todos GM catarinense destacam-se positivamente. De forma similar, amostras comerciais de farinhas de mandioca do grupo seca e fina, comercializadas em Belém/PA, apresentaram teores de proteínas (0,53% a 0,93%) e lipídios (0,11% a 0,31%) inferiores às amostras catarinenses (EMBRAPA, 2006). Obviamente, a análise comparativa do teor de nutrientes entre genótipos e biomassas oriundas de regiões edafoclimáticas discrepantes deve ponderar o efeito daqueles fatores sobre a variável em estudo, notadamente quanto à seleção de genótipos candidatos à aplicação industrial, ao melhoramento genético, ou à função nutricional, por exemplo. Além disto, não raro, metodologias distintas de extração e análise de metabólitos levam a resultados discrepantes, um fato relevante à considerar em ensaios comparativos do potencial nutricional de biomassas alimentares como os GM em estudo.

Levando em consideração o genótipo BP que apresentou o maior conteúdo proteico, e diante da importância das raízes de mandioca como alimento básico e o tradicional consumo diário de suas farinhas, pode ser relevante à atenção de programas de melhoramento genético a estes dados, buscando melhorar nutricionalmente as raízes.

Com relação à umidade, todos os GM analisados enquadram-se nos padrões da Instrução Normativa MAPA 52/2011 (BRASIL, 2011), o qual exige um teor de umidade inferior a 13% para a farinha de mandioca comercializada. O teor de umidade das farinhas de mandioca é uma variável importante, pois valores acima do estipulado pela legislação brasileira favorecem o crescimento de micro-organismos e a

deterioração do produto. De outra forma, valores inferiores a 13% de umidade favorecem a estabilidade e o tempo de prateleira (SOUZA et al., 2008) daquela biomassa.

Em relação ao teor de cinzas das farinhas, apenas o genótipo TP apresentou um valor algo superior ao prescrito na legislação vigente, isto é, $\leq 1,4\%$. A determinação do teor de cinzas informa a respeito da composição de elementos minerais da amostra (SILVA; QUEIROZ, 2002), um aspecto importante, pois valores elevados de cinzas podem indicar fraudes no produto como, por exemplo, a adição de areia ou um processamento inadequado das raízes, como lavagem e descascamento incompletos (DIAS; LEONEL, 2006). Dias e Leonel (2006) encontraram no grupo farinha seca (farinhas comerciais dos estados de SP, MT, MG, PA, SE) teores de cinza entre 1,12 e 1,11%, próximos aos observados no presente trabalho, aonde somente os GM AM e BP apresentaram teores abaixo de 1%.

De modo geral, assume-se que a variação do conteúdo de lipídios, proteínas e cinzas de farinhas de mandioca gera um fenótipo que pode ser explicado por fatores genéticos e ambientais de natureza diversa, considerando as inúmeras condições edafoclimáticas e sistemas de manejo das regiões de cultivo no Brasil, por exemplo, (SOUZA, et al., 2008). De outra forma, os teores de umidade estão ligados mais especificamente à tecnologia de fabricação do produto (CHISTÉ, et al., 2006).

No que concerne à fração amídica, segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2011) as farinhas de mandioca devem ter valores mínimos de conteúdos (m/m) amido de ≥ 86 , $\geq 82-85,9$ ou $\geq 80-81,9$, respectivamente para as classificações de farinhas do tipo 1, 2 e 3,

respectivamente. Analisando as farinhas do presente trabalho apenas o genótipo OR se enquadra no tipo 2, enquanto AM e o Mix pertencem ao tipo 3. Os demais genótipos apresentaram valores abaixo do prescrito na legislação vigente. Tal fato não é raro, conforme descrito por EMBRAPA (2006), aonde as dez amostras, do grupo farinha seca coletadas em feiras e supermercados na região metropolitana de Belém/PA, investigadas apresentaram valores abaixo da tolerância mínima, isto é, 65,67% a 79,59%. Em seu conjunto, estes dados revelam a necessidade de análises regulares das biomassas em comercialização para a variável em estudo, como forma de enquadramento da qualidade destas à legislação vigente.

Com relação ao conteúdo de fibra bruta, a amostra de farinha do genótipo TP apresentou o maior teor e, por esse motivo, foi selecionada ao ensaio biológico descrito no capítulo 3. Além disso, todos os genótipos analisados se encontram dentro dos limites requeridos pela legislação, isto é, teores $\leq$ a 2,3g/100g. De forma comparativa, Dias e Leonel (2006) obtiveram valores superiores (2,00g/100g para farinhas do MT a 2,44g/100g para farinhas de SP e MG) em relação aos GM do presente estudo. Esses resultados são interessantes, haja vista que além do interesse no consumo de farinha de mandioca como fonte de carboidratos, as fibras acarretam benefícios à saúde humana. De fato, dietas pobres em fibras estão associadas a doenças coronarianas, diabetes e câncer do cólon entre outros distúrbios do trato gastrointestinal (COSTA; BORÉM, 2003). Por isso, há recomendações de ingestão de 20 a 30 g de fibras/dia para adultos (SBC, 2007). Este contexto será abordado de forma mais específica no capítulo

3 para as biomassas de amido e fibras dos GM em estudo, considerando seus efeitos sobre o perfil lipídico em modelo animal.

4.2 Fibra solúvel e insolúvel

De maneira geral, as fibras insolúveis, não-viscosas e não-fermentáveis são aquelas representadas pela celulose, lignina e algumas hemiceluloses. Por sua vez, as pectinas, gomas, mucilagens e outros tipos de hemiceluloses compõem a fração de fibras solúveis, em geral viscosas e fermentáveis (COSTA; BORÉM, 2003). As farinhas de mandioca estudadas não apresentaram diferenças estatísticas em seus conteúdos de fibras solúvel e insolúvel, havendo um claro predomínio destas últimas no material amostral (**Tabela 2**).

TABELA 2 - Composição (g/100g) de fibras solúvel e insolúvel em amostras de farinhas dos genótipos de mandioca em estudo.

<i>Genótipos</i>	<i>Fibra Solúvel</i>	<i>Fibra Insolúvel</i>
<i>Amarelinha</i>	0,50	7,10
<i>Branca da Penha</i>	0,60	7,90
<i>Samambaia</i>	< 0,5	5,70
<i>Torta da Penha</i>	0,70	7,70
<i>Oriental</i>	< 0,5	3,60
<i>Mix comercial</i>	< 0,5	3,30

De forma similar, Bednar et al. (2001) ao investigarem os conteúdos de fibra total, solúvel e insolúvel de farinhas de milho, trigo, arroz integral, batata, soja, cevada e sorgo constaram o predomínio da fração de fibras insolúveis e que o processamento destas também reduz o conteúdo de fibra total e suas frações, comparativamente às biomassas cruas. Em relação ao conteúdo de fibra total, valores inferiores foram encontrados no presente trabalho, assemelhando-se apenas ao sorgo (1,3%) e sendo muito inferior às farinhas de trigo, soja e cevada, isto é, 12,1 %, 15,4% e 22,9%, respectivamente. Quanto aos teores das frações de fibras insolúveis, o presente estudo foi superior ao sorgo e batata (1,1%), arroz integral (3,4%) e milho (2,8%). De outra forma, para as análises da fração solúvel apenas o milho (0,0%) e o sorgo (0,2%) apresentaram teores abaixo dos GM estudados, enquanto soja apresentou valores similares (0,7%) a TP e as demais farinhas apresentaram teores sutilmente maiores (1,0% para batata e 3,6% para trigo).

Esses resultados comparativos são importantes, pois demonstram que apesar da predominância da fração insolúvel em farinhas, cada fonte botânica apresenta teores significativamente distintos entre e dentre as frações, os quais podem influenciar nos efeitos fisiológicos. A composição das fibras individuais, suas quantidades e proporções de frações solúvel e insolúvel lhes conferem propriedades nutricionais, respostas fisiológicas e efeitos físico-químicos distintos (ELLEUCH et al., 2011).

Alimentos ricos em fibras são reconhecidos como redutores na resposta glicêmica e essenciais para indivíduos diabéticos (MARGARETA; NYMAN, 2003). Dentre os fatores envolvidos nesses

mecanismos mencionam-se a estrutura do alimento, as características intrínsecas da fração fibra e, principalmente, a capacidade de aumento da viscosidade na digestão (MARGARETA; NYMAN, 2003), uma propriedade em geral atribuída às fibras solúveis. Dessa forma, a ingestão de fibras indutoras de respostas glicêmicas baixas é recomendada a pacientes portadores de diabetes tipo II, os quais precisam evitar a evolução da doença e à população mais jovem para diminuir a manifestação da síndrome de resistência à insulina (MARGARETA; NYMAN, 2003).

Algumas fibras são degradadas por bactérias do cólon e podem ter efeitos positivos contra o câncer do cólon, sendo importante sua identificação (HARRIS; FERGUSON, 1993). Embora estudos com animais produzam resultados bastante variáveis, sabe-se que as fibras insolúveis são mais eficazes que a fração solúvel na prevenção de tumores intestinais (HARRIS; FERGUSON, 1993). Costa e Borém (2003) também atribuem às fibras insolúveis a redução do tempo do trânsito gastrointestinal e o aumento do volume fecal, em contraste com fibras solúveis, como as pectinas, que não possuem essa funcionalidade. Essa propriedade de aumento da velocidade no trânsito da massa alimentar reduz o contato de potenciais carcinógenos com a superfície da mucosa do cólon e o aumento da massa e do volume das fezes também auxilia a diluir esses carcinógenos. Adicionalmente, outros mecanismos associados à prevenção do câncer do cólon intestinal como, por exemplo, a fermentação de fibras solúveis produzindo ácidos graxos de cadeias curtas, promove a diminuição do pH da luz intestinal. Tais ácidos graxos estimulam a proliferação celular no cólon uma situação benéfica para indivíduos saudáveis. Contudo, devido a influência das

fibras nos processos de divisão celular, reduzindo ou elevando a concentração de fatores mitogênicos livres na concentração luminal, se houver a presença de carcinogênicos no ambiente do cólon intestinal, este cenário poderá evoluir à carcinogênese. Além disso, a fermentação, que ocorre principalmente pelas fibras solúveis, não é tão eficiente na diluição dos carcinogênicos, comparativamente às fibras insolúveis que são menos fermentadas (BORÉM; COSTA, 2003). Nesse contexto, a análise detalhada da composição química das frações solúvel e insolúvel de fibras dos GM em estudo pode auxiliar na exploração racional daquelas biomassas, notadamente na determinação e entendimento de mecanismos de respostas fisiológicas em animais e em seres humanos como um alimento com propriedades funcionais.

4.3 Amido resistente

Devido ao potencial benéfico à saúde, semelhante a fibras solúveis, e as suas propriedades funcionais, o amido resistente vem sendo bastante estudado (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010). No presente trabalho, apesar de diferenças significativas ($P < 0,05$) de conteúdo desta variável não terem sido detectadas nas amostras de farinhas dos GM, estes apresentaram teores apreciáveis de amido resistente (**Tabela 3**).

TABELA 3 - Conteúdo (g/100g) de amido resistente nas farinhas dos genótipos de mandioca em estudo.

<i>Genótipos</i>	<i>Amido Resistente</i>
<i>Amarelinha</i>	4,05
<i>Branca da Penha</i>	4,94
<i>Samambaia</i>	1,31
<i>Torta da Penha</i>	4,64
<i>Oriental</i>	0,94
<i>Mix comercial</i>	2,12

O genótipo BP apresentou o maior teor de amido resistente, seguido de TP. Este último genótipo, aliado ao seu teor elevado em fibras, quando comparado aos demais GM, foi selecionado para o ensaio biológico discutido no capítulo 3 e que confirma alguns dos potenciais benefícios das fibras e amido resistente.

Embora os teores de amido resistente, encontrados nas farinhas dos GM analisados, sejam relevantes, não devem ser comparados a outras fontes de alimentos não processados. Isso porque, segundo Bednar et al. (2001), as concentrações de amido resistente são baixas em farinhas em geral. De fato, 74% do amido total dos grupos de cereais em grãos é um amido digerível e após seu processamento para produção de farinhas, este valor sobe para 95% (BEDNAR et al., 2001). Além disso, no caso dos cereais, o revestimento do pericarpo e semente torna a amilose inacessível às enzimas do trato digestivo (BEDNAR et al., 2001). Além disto, os autores, acima citados, justificam a redução do percentual de amido resistente nas farinhas de cereais processados em decorrência da redução do padrão cristalino do tipo A,

comparativamente aos cereais crus. Assim, infere-se que os tratamentos térmicos e o processamento das farinhas alteram a estrutura cristalina do amido, proporcionando um aumento no percentual de amido digerível.

Da mesma forma que para os cereais, a farinha e outras formas de processamento do amido de mandioca, como por exemplo, a tapioca, sofrem processos térmicos durante a sua fabricação para o consumo humano e, provavelmente, também apresentam modificações em seus teores de fibras e amido resistente em relação às raízes não processadas.

Em uma abordagem comparativa, os teores de amido resistente das farinhas dos GM em estudo, principalmente BP, TP e AM, os GM, foram bastante superiores ao observado para soja (0,6%) e trigo (1,7%) (BEDNAR et al., 2001), revelando que aqueles GM destacam-se quanto a esta importante variável à saúde humana dentre as farinhas de outras espécies botânicas. Tal fato é relevante, tendo em consideração os benefícios que o amido resistente pode proporcionar à saúde humana, como por exemplo, redução do nível de colesterol sanguíneo, do índice glicêmico e o auxílio no funcionamento do aparelho digestivo (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010). Além dessas propriedades para a saúde, o amido resistente também possui vantagens adicionais com relação às propriedades sensoriais dos alimentos, quando comparado a fontes de fibras tradicionais, por exemplo, frutas, farelo, cereais integrais, pois não alteram significativamente as características organolépticas dos alimentos.

4.4 Capacidade de adsorção de gordura e água pelas farinhas

Na **Tabela 4** são apresentados os valores médios de adsorção de gordura e água das farinhas dos seis GM em estudo. Não foram detectadas diferenças significativas quanto ao potencial de adsorção de gordura e água destas farinhas, sendo que as médias de adsorção foram de 1,66 mL óleo.g⁻¹ e 2,76 mL água.g⁻¹.

TABELA 4 - Adsorção média de gordura e água ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)* de farinhas de genótipos de mandioca em estudo.

<i>Genótipos</i>	<i>Adsorção de Gordura</i>	<i>Adsorção de Água</i>
<i>Amarelinha</i>	$1,55 \pm 0,06$	$2,57 \pm 0,21$
<i>Branca da Penha</i>	$1,67 \pm 0,06$	$3,18 \pm 0,37$
<i>Samambaia</i>	$1,63 \pm 0,14$	$3,02 \pm 0,54$
<i>Torta da Penha</i>	$1,71 \pm 0,00$	$2,71 \pm 0,03$
<i>Oriental</i>	$1,62 \pm 0,08$	$2,59 \pm 0,32$
<i>Mix</i>	$1,79 \pm 0,09$	$2,5 \pm 0,07$

* Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3)

Iwuoha e Kalu (1995) demonstraram que farinhas de taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) adsorveram, em média, 1,06 mL óleo.g⁻¹ e 2,49 mL água.g⁻¹, valores estes inferiores ao encontrado no presente estudo. Quando as farinhas de taioba foram cozidas por períodos de 3 a 40 minutos, detectou-se o aumento da adsorção, por exemplo, 1,11 a 1,45 mL óleo.g⁻¹ e 2,96 mL água.g⁻¹ a 3,44 mL água.g⁻¹, revelando que o cozimento das farinhas promove alterações na estrutura química dos constituintes daquela biomassa, aumentando sua capacidade de adsorção de gordura e água. Especula-se que as farinhas de mandioca poderão apresentar comportamento similar quando submetidas a tal processamento.

De forma similar ao observado por Iwuoha e Kalu (1995), as farinhas dos GM do presente estudo apresentaram uma capacidade de adsorção de água mais pronunciada que a adsorção de gordura. Segundo Doporto et al. (2012), a adsorção de água dos alimentos é um parâmetro importante a ser analisado, pois demonstra a estabilidade e qualidade destes durante o período de armazenamento e acondicionamento.

Doporto et al. (2012) ao analisarem farinhas de mandioca e ahipa (*Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi) uma espécie de leguminosa com raízes tuberosas comestíveis, detectaram maior capacidade de adsorção de água nas farinhas de ahipa, comparativamente às farinhas de mandioca e sugerem que tal fato decorre do maior teor de proteínas nas farinhas daquela espécie em relação à mandioca. De fato, ao analisar os teores de proteínas dos GM em estudo (**Tabela 1**), constata-se que aqueles com maiores conteúdos apresentaram a maior capacidade de adsorção de água (**Tabela 4**), com destaque para o genótipo BP. Wang et al. (2009) observaram que farinhas mista cruas de soja com trigo (20:

80, m/m) apresentaram maior capacidade de retenção de água quando comparadas às farinhas de trigo cruas ou mistas com uma proporção menor de soja (10: 90, m/m). Wang et al. (2009) discutem que adsorção de água ocorre devido à disponibilidade nas biomassas de grupos hidrofílicos livres e atribuem o resultado observado ao aumento da proporção de soja na mistura, o qual resulta na elevação da disponibilidade de grupos hidrofílicos oriundos de compostos proteicos daquela espécie. De outra forma, aqueles autores observaram que farinhas mistas de soja e trigo, quando extrusadas têm sua capacidade de adsorção de água reduzida, provavelmente pela desnaturação das proteínas no processo de extrusão e pela formação de um complexo proteína-amido devido ao aumento da temperatura.

Um dos benefícios de farinhas com alta capacidade de adsorção segundo Wang et al. (2009), é a utilização dessas biomassas em produtos industrializados, porque estas têm a propriedade de manter a umidade, conferindo por maior tempo um aspecto de produtos frescos à mercadoria.

Harris e Ferguson (1993) estudaram, *in vitro*, a retenção de água de 17 preparações de fibras dietéticas insolúveis e solúveis e observaram que os alimentos com maiores conteúdos da fração solúveis adsorveram mais água. Analisando a estrutura química das fibras, constataram que a existência de moléculas com grupos ionizáveis, como por exemplo, ácidos urônicos, na fibra relaciona-se ao mecanismo de adsorção de água. Em comparação às fibras de frutas e vegetais, as fibras de farelo de trigo apresentam menor capacidade de adsorção de água e isso é atribuído à maior lignificação das paredes celulares daquela espécie (HARRIS; FERGUSON, 1993). De fato, durante o

período de lignificação ocorre a substituição de água por lignina nas paredes celulares, aumentando o grau de hidrofobicidade daquela ultra-estrutura celular (NORTHCOTE, 1972) e, portanto, reduzindo seu potencial de adsorção de água (HARRIS; FERGUSON, 1993).

A capacidade de adsorção de gordura foi menos pronunciada que a adsorção de água e, provavelmente, os mecanismos de adsorção também ocorram devido a interações das regiões hidrofóbicas das proteínas e fibras com os grupos hidrofóbicos da gordura. Essa tendência pode ser visualizada nas **Tabelas 1 e 2**, onde os genótipos com maiores teores de proteína, fibra bruta e fibras insolúveis também apresentaram maior adsorção de gordura. Esses resultados podem ser ainda melhor explorados através do uso de técnicas analíticas mais refinadas como a ressonância magnética nuclear e a espectroscopia vibracional de infravermelho, permitindo a identificação dos grupamentos funcionais constituintes das fibras envolvidos no processo de adsorção das gorduras. Esses dados tornam-se relevantes diante dos inúmeros efeitos relatados na literatura a respeito das fibras e suas interações com as gorduras dietéticas e suas possíveis consequências na redução de dislipidemias, e profilaxia a aterosclerose e doenças crônicas como as cardiovasculares.

4.5 Parâmetros exigidos pela SBC

O selo da SBC indica a que o produto diferencia-se quanto às suas características nutricionais e funcionais, auxiliando na promoção da saúde através da profilaxia de doenças cardiovasculares, via redução de colesterol e hipertensão arterial, por exemplo (SBC, 2013). No entanto, para que o produto seja meritório do selo é necessário que ele atenda a uma série de rigorosos critérios que são estabelecidos pelo comitê da

citada associação (SBC, 2013). Esses critérios seguem padrões elaborados por reconhecidas instituições no Brasil (ANVISA e SBC) e exterior (*American Heart Association* e *Heart and Stroke Foundation of Canada*) para a promoção da saúde cardiovascular (SBC, 2013). A solicitação do selo requer o laudo de análises físico-químicas do produto, o registro no ministério da saúde ou da agricultura, a embalagem, ou rótulo, do produto e documentos que comprovem as propriedades diferenciais do produto (SBC, 2013). A partir de 2008, o selo foi modificado para apresentar frases autoexplicativas sobre o diferencial do produto que lhe conferiu a certificação (SBC, 2013).

Dentre os critérios citados, até o momento apenas o registro no ministério da agricultura precisa ser realizado pelos agricultores. A presente dissertação, a partir do conjunto de resultados positivos apresentados fornece informações relevantes que evidenciam as potenciais propriedades funcionais dos GM estudados.

4.6 Teor de amilose

Os valores do teor de amilose, determinados pelo método de iodo, segundo metodologia descrita por Williams, Kuzina e Hlinka (1970), e pelo kit enzimático comercial para os amidos extraídos dos GM em estudo são apresentados na **Tabela 5**. Os métodos mostraram-se bastante adequados devido à repetibilidade dos resultados obtidos, o que pode ser evidenciada pelo baixo desvio padrão e/ou valores dos interquartis máximos e mínimos.

TABELA 5 - Teor de amilose (% m/m) dos genótipos de mandioca em estudo, determinados pelos métodos de iodo e enzimático (Megazyme International Ireland®).

<i>Genótipos</i>	<i>Amilose - Método de Iodo*</i>	<i>Amilose - Kit Enzimático**</i>
<i>Amarelinha</i>	17,71 ± 0,33	15,54 (15,24 - 15,84)
<i>Branca da Penha</i>	17,67 ± 0,31	16,52 (16,14 - 16,90)
<i>Samambaia</i>	17,04 ± 0,51	16,78 (16,35 - 17,22)
<i>Torta da Penha</i>	16,98 ± 0,33	16,57 (16,44 - 16,70)
<i>Oriental</i>	17,30 ± 0,13	16,55 (16,22 - 16,89)

* n = 3 determinações/genótipo e valores expressos em média ± desvio padrão (ANOVA);

** n = 2 determinações/genótipo e valores expressos em mediana (interquartis: mínimo 25% -75% máximo), (ANOVA *on ranks* seguido do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis).

Há diversas metodologias à determinação do teor de amilose descritas na literatura, porém, conforme Cereda et al. (2001), nenhuma é totalmente aceita como a ideal. Tal fato se torna evidente ao analisar os resultados encontrados na literatura, os quais revelam grande variação nos teores de amilose de uma mesma amostra, o que expõe a fragilidade dos métodos de quantificação disponíveis. Destaca-se que a despeito da evolução das metodologias de quantificação de amilose, um complicante dos métodos refere-se à obtenção de amostras com alto grau de pureza, notadamente em relação à fração amilopectina.

As metodologias analíticas do presente estudo não revelaram ocorrer diferenças estatísticas entre os conteúdos médios/medianos dos GM. De forma geral, observou-se que o método do iodo apresentou valores médios algo superiores ao método enzimático, porém a similaridade no teor de amilose dos amidos das farinhas foi detectada, independentemente do método analítico.

O método de quantificação do teor de amilose através da formação do complexo amilose-iodo é bastante criticado, pois a molécula de amilose na presença de iodo forma um complexo de coloração azul que permite a determinação do teor de amilose por espectrofotometria. Contudo, a amilopectina, o congênere amídico de maior ramificação, também reage com o iodo formando uma coloração avermelhada que interfere na leitura da absorbância, gerando dados superestimados do teor de amilose (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007). Apesar das críticas, diversos trabalhos ainda utilizam esse método colorimétrico, principalmente devido à rapidez e simplicidade. Em função das críticas a esta metodologia e para confirmar os resultados obtidos no presente trabalho, decidiu-se pela

utilização de um segundo método cujo mecanismo da reação de detecção do analito de interesse é discrepante, isto é, não químico, baseando-se em reação enzimática.

Além dos aspectos previamente discutidos quanto à aceitação dos métodos de dosagem de amilose, é importante mencionar que, em alguma extensão, parte dos erros advêm da construção da curva padrão a partir de amostras de amilose e amilopectina de fontes amiláceas distintas da espécie em estudo (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007), haja vista as diferenças entre a morfologia e as características peculiares dos amidos de cada fonte botânica que culminarão, eventualmente, em resultados não confiáveis.

Outros fatores determinantes de erro experimental em análises dos teores de amilose referem-se à idade da raiz e às condições climáticas no momento da colheita. Segundo Sriroth et al. (1999), as condições ambientais no momento da colheita das raízes de mandioca podem ser uma fonte de variação do conteúdo de amido, alterando respostas à absorção de água do grânulo e consequentemente da gelatinização. Como exemplo, raízes jovens com 6 meses, apresentaram um teor elevado de amilose (21% - 24%, m/m) e amido com alta viscosidade final, quando comparadas a raízes colhidas mais tardiamente durante o período da estação seca, as quais apresentam menor teor de amilose e viscosidade. Assim, sugere-se que análises comparativas do potencial de genótipos como fontes de amido levem em consideração o grande número de variáveis interferentes dos valores detectados, evitando conclusões errôneas.

Conhecer os teores de amilose e amilopectina de amidos de genótipos de mandioca, por exemplo, é um parâmetro importante na

qualidade do processamento de produtos amiláceos, haja vista que a proporção entre essas duas macromoléculas contribuiu na elucidação de uma série de propriedades reológicas do amido e produtos derivados (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007). Além disso, segundo Marcon, Avancini e Amante (2007), a aceitabilidade do amido é determinada a partir das suas características físico-químicas para sua aplicação e funcionalidade em diversos setores da indústria, as quais dependem e relacionam-se diretamente com a proporção de amilose/amilopectina.

4.7 Densidade absoluta

Assim como a proporção amilose/amilopectina, a densidade do amido também é um importante parâmetro à caracterização dos amidos, isso porque, diferenças físicas contribuem para explicar comportamentos discrepantes de produtos amiláceos derivados (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007). Além do estabelecimento das propriedades funcionais do amido, a medida da densidade dos grânulos daquele polissacarídeo mostra-se como função direta do processo de extração, através da velocidade ou facilidade de decantação desses grânulos (CEREDA et al., 2001).

Oliveira (2011), ao investigar a densidade dos amidos em genótipos de mandioca que também fazem parte do banco de germoplasma da EPAGRI-EEUR, obteve valores entre 1,28 a 1,53 g.cm³, enquanto Nunes, Santos e Cruz (2009) encontraram densidades de 1,51 a 1,58 g.cm³, e Marcon (2009) 1,56 e 1,66 g.cm³.

Os amidos dos GM investigados não diferiram significativamente para a variável em estudo, porém apresentaram valores acima dos valores encontrados na literatura, exceção ao

observado por Marcon (2009), isto é, $1,66 \text{ g. cm}^3$, o que demonstra uma característica diferencial dessas raízes, conforme pode ser visualizado na **Tabela 6**.

TABELA 6 - Densidades dos amidos extraídos dos genótipos de mandioca em estudo determinados em picnomêtro de gás hélio.

<i>Genótipos</i>	<i>Densidade (g/cm³)*</i>
<i>Torta da Penha</i>	1,65 (1,64 - 1,66)
<i>Samambaia</i>	1,62 (1,61 - 1,63)
<i>Amarelinha</i>	1,67 (1,64 - 1,68)
<i>Oriental</i>	1,68 (1,63 - 1,70)
<i>Branca da Penha</i>	1,63 (1,62 - 1,64)

* n = 5 determinações/genótipo e valores expressos em mediana (Interquartis: mínimo 25% - 75% máximo), (ANOVA *on ranks* seguido do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis).

Conforme Nunes, Santos e Cruz (2009), a densidade é um parâmetro fundamental na etapa de extração e influencia economicamente na escolha da variedade a ser processada, haja vista que essa característica afeta diretamente a velocidade de decantação do amido no momento da extração, reduzindo o tempo de uso de decantadores e/ou centrífugas. Nesse contexto, e diante dos resultados encontrados na literatura, as raízes do GM analisados estão, em geral, acima da média, o que os valoriza quanto ao seu potencial de uso industrial.

4.8 Forma e tamanho dos grânulos

A forma dos grânulos de amido é um importante parâmetro na identificação da sua origem, sendo uma característica relevante quando se deseja identificar fraudes ocasionadas por misturas indevidas em produtos amiláceos. Nesse caso, se o rótulo do produto apresenta a indicação de um determinado amido, através da morfologia do grânulo, a sua origem botânica poderá ser comprovada através da microscopia eletrônica de varredura (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007). De fato, cada espécie vegetal possui grânulos de amidos com tamanhos e formas características (CEREDA et al., 2001) e, conforme Rickard, Asaoka e Blanshard (1991), as formas encontradas para o amido de mandioca são redonda, truncada, oval, cilíndrica e poligonal. Na **Figura 1** é possível observar as formas redonda, oval, truncada e côncavo-convexa dos amidos dos GM em estudo.

Conforme Bello-Pérez, Montealvo e Acevedo (2006), o tamanho dos grânulos e a sua distribuição estão entre os fatores que mais influenciam suas propriedades funcionais. Uma característica importante é a regularidade no tamanho, de acordo com uma amplitude de valores de diâmetro (CEREDA et al., 2001), sendo esta característica requerida pela indústria para a produção de papéis como, por exemplo, para cópia e fax (SATIN, 2000).

Os amidos dos GM analisados apresentaram uma amplitude reduzida de valores de diâmetros máximo e mínimo, o que evidencia a regularidade citada por Satin (2000). Além dessa regularidade observada em todos os genótipos, detectou-se haver diferença estatisticamente significativa entre os genótipos AM e OR, onde o primeiro apresenta grânulos maiores (**Tabela 7**).

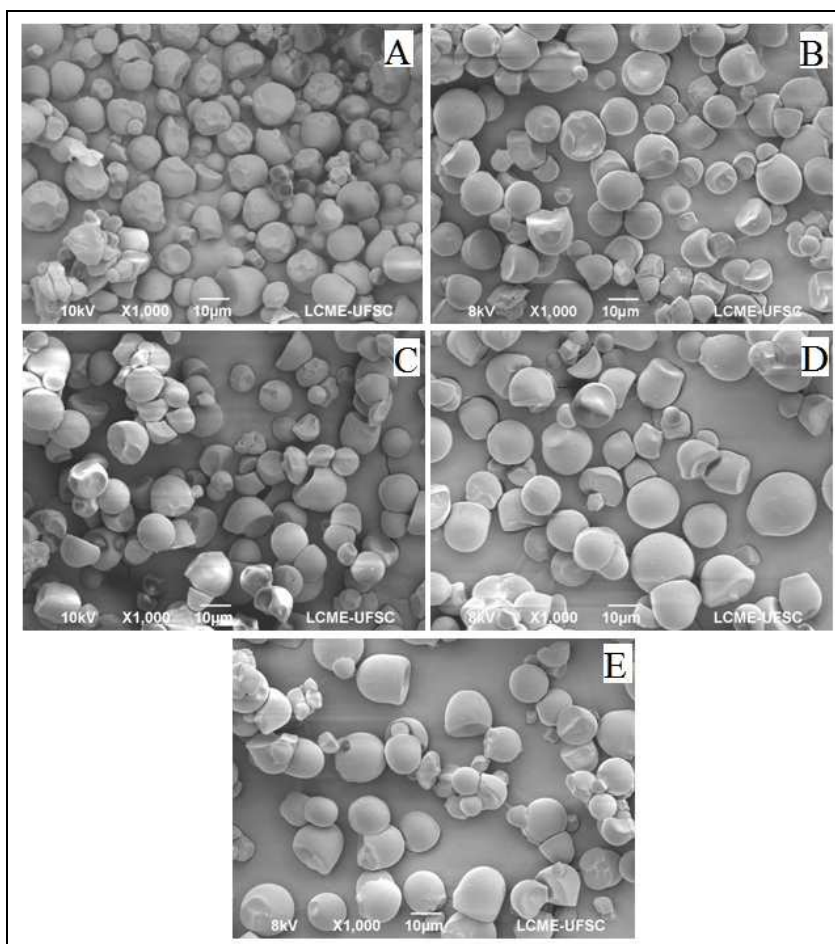


FIGURA 1 – Micrografia eletrônica de varredura dos grânulos de amido dos genótipos de mandioca em estudo. **A** – Oriental, **B** - Samambaia, **C** – Torta da Penha, **D** - Amarelinha, **E** – Branca da Penha.

TABELA 7 – Diâmetro (μm) dos grânulos de amido dos genótipos de mandioca em estudo determinado por microscopia eletrônica de varredura.

<i>Genótipos</i>	<i>Diâmetros*</i> <i>mínimos</i> <i>(μm)</i>	<i>Diâmetros*</i> <i>máximos</i> <i>(μm)</i>
<i>Amarelinha</i>	14,19 (12,28 - 15,52) **	16,37 (14,02 - 17,88) **
<i>Branca da Penha</i>	11,82 (8,81 - 12,87)	12,83 (9,90 - 14,36)
<i>Samambaia</i>	12,78 (11,55 - 13,93)	14,63 (13,17 - 15,60)
<i>Torta da Penha</i>	10,80 (7,04 - 12,28)	12,02 (8,91 - 14,51)
<i>Oriental</i>	9,68 (8,54 - 10,80) **	11,59 (10,02 - 12,58) **

* n = 12 medidas/genótipo e valores expressos em mediana (mínimo 25% - 75% máximo),

e ** denotam diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos (ANOVA *on ranks* seguido do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste complementar de Dunn's - $P < 0,05$).

Oliveira (2011) obteve uma amplitude de valores de diâmetros máximo e mínimo de grânulos de amido de mandioca bastante discrepante do presente estudo, isto é, 5,54 a 17,86 μm , o que demonstra grânulos muito menos regulares do que os apresentados na **Tabela 7**. De forma, similar Nwokocha et al. (2009) detectaram variações entre 2,81 a 14,03, enquanto Siroth et al. (1999), investigando amostras de amidos oriundas de raízes de mandiocas com 6, 10, 14 e 16 meses, observaram diâmetros de grânulos variando entre 8 a 22 μm . Por sua vez, Leonel (2007) ao analisar amidos de fontes botânicas de açafraão, ahipa, araruta, batata doce, biri, gengibre, mandioca, mandioquinha-salsa, taioba, taro e zedoária, encontrou valores de 14,39 a 17,1 μm de diâmetro para grânulos de amidos de mandioca. Em seu conjunto, os dados descritos na literatura evidenciam uma grande variação nos tamanho dos grânulos

de amido de mandioca, comparativamente aqueles do presente trabalho. De acordo com Oliveira (2011), tais discrepâncias são normais, pois além das variações entre tamanho e forma dos grânulos derivadas da origem botânica, tal fato também pode acontecer entre variedades e cultivares de uma mesma espécie (OLIVEIRA, 2011), como no presente trabalho.

Segundo Cereda et al. (2001), o tamanho dos grânulos de amido de mandioca possui uma ampla faixa de variação relacionada ao tamanho, isto é, entre 5 a 35 μm e média de 20 μm . Tal fato sugere que é possível encontrar, mesmo em genótipos de uma mesma espécie, características muito distintas e que podem ser relevantes quanto à funcionalidade daquele polissacarídeo para os diversos setores da indústria. Essas variações ocorrem, pois os grânulos de amido possuem um ponto central (hilo), a partir do qual são depositadas e sobrepostas diversas camadas, formadas pelas cadeias de amilose e amilopectina. O hilo pode estar posicionado centralmente ou deslocado, sendo que a deposição destas camadas é influenciada pelo nível de hidratação do amido em formação, decorrente da proporção entre amilose e amilopectina. As deposições das camadas sobre o hilo, com larguras uniformes ou não, geram grânulos de formato simétrico ou assimétrico, respectivamente (CEREDA et al., 2001).

5. CONCLUSÕES

De maneira geral os resultados obtidos demonstram que os GM são bastante similares. Apesar da hipótese não ter sido confirmada, isso não invalida as propriedades funcionais das farinhas estudadas, pois ainda existem outros parâmetros, tão importantes quanto, a serem avaliados para completar a caracterização, principalmente dos amidos destas raízes, no que se refere às estruturas cristalinas e amorfas, tamanho de cadeia de amilose e amilopectina que influenciam em várias propriedades funcionais de importância à indústria alimentícia, por exemplo.

Outro aspecto relevante com relação aos resultados obtidos refere-se às características desejáveis pela indústria e que esses GM em estudo possuem acima da média comparada com os dados da literatura. Como exemplo, cita-se a regularidade no tamanho dos grânulos de amido, o conteúdo de fibras insolúveis e amido resistente e a densidade que é um dos fatores econômicos decisivos na escolha de um genótipo para a extração de amido.

Com relação aos teores de fibras insolúveis e principalmente de amido resistente, quando comparado com outras farinhas de fontes botânicas extensivamente estudadas como o milho, os teores dos GM estudados são bem superiores e, aliado aos resultados discutidos no capítulo 3, inicia-se uma base de informações e algumas confirmações de hipóteses sobre as potenciais propriedades funcionais dos GM.

Além disso, destaca-se que apesar destes genótipos comporem um dos maiores BAG de mandioca do Brasil, até então não havia informações disponíveis a respeito das características físico-químicas ou

mesmo composição centesimal das biomassas de raízes, as quais são a base para estudos ainda mais refinados.

Nesse contexto, estes resultados vêm ao encontro do intuito de agregar valor ao aos GM e, principalmente, aos seus produtos e subprodutos, como amido e farinha, a fim de estimular o setor mandioqueiro. Como objetivo de médio prazo, isto é, a obtenção do selo SBC às farinhas dos GM, assume-se que as informações do presente estudo revelam que as exigências são satisfeitas pelos genótipos em alguma extensão, sendo, entretanto necessária a complementação das análises através da ampliação das variáveis de estudo, conforme determina a legislação vigente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of the AOAC International**, 18th ed. Maryland/USA: AOAC, 2005.

BEDNAR, G. E.; PATIL, A. R.; MURRAY, S. M.; GRIESHP, C. M.; MERCHEN, N. R.; FAHEY JR, G. C. Starch and fiber fractions in selected food and feed ingredients affect their small intestinal digestibility and fermentability and their large bowel fermentability in vitro in a canine model. **The Journal of Nutrition**, Urbana, v. 131, p. 276-286, 2001.

BELLO-PÉREZ, L. A.; MONTEALVO, M. G. M.; ACEVEDO E. A. Almidón: definición, estructura y propiedades. In: LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. (Orgs.). **Carbohidratos en Alimentos Regionales Iberoamericanos**. 1. ed. São Paulo: Edusp, 2006. 648 p.

BEUCHAT, L. R. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, p. 258-261, 1977.

BICUDO, S. C. W. **Caracterização de amidos nativos de diferentes fontes botânicas através de técnicas termoanalíticas e teor de amilose**. (2008). 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Métodos analíticos Físico-Químicos para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes – Sal e Salmoura**. Instrução Normativa nº 20, de 21/07/1999, DOU. 09/09/99. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Regulamento Técnico da Farinha de Mandioca**. Instrução Normativa nº 52, de 07/11/2011, DOU. 08/11/2011. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

CEREDA, M. P. (coord.). **Propriedades gerais do amido**. 1. ed. São Paulo: Fundação Cargill (Série Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas), v.1, 2001. 224 p.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. de O.; MATHIAS, E. de A.; RAMOA JÚNIOR, A. G. A. Qualidade da farinha de mandioca do grupo seca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 861-864, out./dez. 2006.

COSTA, N. M. B.; BORÉM, A.. **Biotecnologia e nutrição: saiba como o DNA pode enriquecer os alimentos**. 1. ed. São Paulo:Nobel, 2003. 214 p.

DIAS, L. T.; LEONEL, M. Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 692-700, jul./ago. 2006.

DOPORTO, M. C.; DINI, C.; MUGRIDGE, A.; VIÑA, S. Z.; GARCÍA, M. A. Physicochemical, thermal and sorption properties of nutritionally differentiated flours and starches. **Journal of Food Engineering**, v. 113, n. 4, p. 569-576, dez. 2012.

ELLEUCHA, M.; BEDIGIAN, D.; ROISEUX, O.; BESBES, S.; BLECKER, C.; ATTIA, H. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: characterisation, technological functionality and commercial applications: a review. **Food Chemistry**, v. 124, p. 411-421, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Estudo do processo de fabricação da farinha de mandioca**. CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. de O. (Orgs.). 1. ed. (eletrônica). Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 75 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: Processamento da mandioca**. 1. ed. Brasília: Embrapa mandioca e fruticultura, 2003. 115 p.

FUENTES-ZARAGOZA, E.; RIQUELME-NAVARRETE, M. J.; SÁNCHEZ-ZAPATA, E.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Resistant starch as functional ingredient: a review. **Food Research International**, v. 43, p. 931-942, 2010.

HARRIS, P. J.; FERGUSON, L. R. Dietary fibre: its composition and role in protection against colorectal cancer. **Mutation**

Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 290, p. 97-110, nov. 1993.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4 ed. Brasília: MS, 2005. 1018 p.

IWUOHA, C. I.; KALU, F. A. Calcium oxalate and physico-chemical properties of cocoyam (*Colocasia esculenta* and *Xanthosoma sagittifolium*) tuber flours as affected by processing. **Food Chemistry**, v. 54, p. 61-66, 1995.

LEONEL, M. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27 n.3, p. 579-588, jul./set. 2007.

MARCON, M. J. A. **Proposta para o mecanismo de expansão do polvilho azedo com base nas características físico-químicas**. (2009). 187 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MARCON, M. J. A.; AVANCINI, S. R. P.; AMANTE, E. R. **Propriedades químicas e tecnológicas do amido de mandioca e do polvilho azedo**. 1. ed. Florianópolis: UFSC, 2007. 101 p.

MARGARETA, E.; NYMAN, G. L. Importance of processing physico-chemical and physiological properties of dietary fibre. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, p. 187-192, 2003.

McCREADY, R.M.; HASSID, W.F. The separation and quantitative estimation of amilose and amylopectin in potato starch. **Journal of the American Chemical Society**, v. 65, p. 1154, 1943.

NORTHCOTE, D. H. Chemistry of the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 23, p. 113-132, 1972.

NUNES, L. B.; SANTOS, W. de J. dos; CRUZ, R. S. Rendimento de extração e caracterização química e funcional de féculas de mandioca da região do semi-árido baiano. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 129-134, jan./mar. 2009.

NWOKOCHA, L. M.; AVIARA, N. A.; SENAN, C.; WILLIAMS, P. A. A comparative study of some properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) and cocoyam (*Colocasia esculenta*, Linn) starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 362-367, 2009.

OLIVEIRA, D. C de. **Caracterização e potencial tecnológico de amidos de diferentes cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. (2011). 142 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

PERONI, F. H. G.; ROCHA, T. S.; FRANCO, C. M. L. Some structural and physicochemical characteristics of tuber and root starches. **Food Science and Technology International**, v. 12, p. 505-513, dez. 2006.

RICKARD, J. E.; ASAOKA, M.; BLANSHARD, J. M. V. The physicochemical properties of cassava starch. **Tropical Science**, v. 31, p. 189-207, 1991.

SATIN, M. Functional properties of starches. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL ROOT AND TUBER CROPS, 2000, **Proceedings...**, Thiruvananthapuram (Trivandrum), 2000. p. 1-9.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA - SBC. **Selo de Aprovação SBC**. Disponível em: < <http://prevencao.cardiol.br/selo/pq-certificar.asp> >. Acesso em: 06/01/2013.

SCHAEFER, C. O. **Avaliação dos metais pesados presentes nos agregados reciclados de resíduos da construção e demolição (RCD) influência no potencial de lixiviação de matrizes cimentícias**. (2007). 218 f. Dissertação (Engenharia Civil), Curso de Pós-graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SCHOCH, T. J.; MAYWALD, E. C. Preparation of properties of various legums starchs. **Cereal Chemistry**, v. 45, p. 564, 1968.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. de. **Análise de Alimentos – Métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.

SILVA, F. I.; CABELLO, C. Caracterização das estruturas moleculares de amido de mandioca utilizando metodologia de permeação em gel. **Energia Agrícola**, Botucatu, v. 21, n.1, p. 50-68, 2006.

SOUZA, J. M. L. de; NEGREIROS, J. R. da S.; ÁLVARES, V. de S.; LEITE, F. M. N.; SOUZA, M. L. de; REIS, F. S.; FELISBERTO, F. Á. V. Variabilidade físico-química da farinha de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 907-912, out./dez. 2008.

SRIROTH, K.; SANTISOPASRI, V.; PETCHALANUWAT, C.; KUROTJANAWONG, K.; PIYACHOMKWAN, K.; OATES, C. G. Cassava starch granule structure-function properties: influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 161-170, 1999.

WANG, S. H.; BATISTA, G. da S.; NASCIMENTO, T. P. do; NASCIMENTO, K. de O. do; NASCIMENTO, M. R. F. Efeitos dos parâmetros de extrusão na absorção de água e absorção de gordura de farinhas extrusadas de trigo e soja. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, p. 641-647, 2009.

WILLIAMS, P. C., KUZINA, F. D., HLYNKA, I. A rapid colorimetric procedure for estimating the amylose content of starches and flours. **Cereal Chemistry**, v. 7, p. 412-420, 1970.

Capítulo 2

DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOÍDICOS E CAROTENOÍDICOS DE FARINHAS DE MANDIOCA PRODUZIDAS EM SANTA CATARINA

1. RESUMO

As raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) tem recebido maior atenção por parte de programas de melhoramento genético buscando a biofortificação daquela biomassa, especialmente com relação aos conteúdos de β -caroteno, um carotenoide precursor de vitamina A. Isso porque, em países em desenvolvimento, a mandioca constitui a principal fonte alimentar energética, sendo, contudo, pobre em outros nutrientes. Além dos reconhecidos benefícios dos carotenoides à saúde humana, as raízes e, portanto as farinhas de *M. esculenta*, também podem apresentar outros constituintes derivados do metabolismo secundário, como por exemplo, compostos fenólicos e flavonoides, com ação antioxidante relevante. Nesse contexto, o presente estudo objetivou determinar a concentração de metabólitos secundários das farinhas dos genótipos de mandioca (GM) e do MIX da farinha comercial, com ênfase em compostos carotenóidicos e fenólicos. De maneira geral, as farinhas de mandioca não apresentaram conteúdos elevados dos compostos estudados. A concentração de carotenoides totais não foi superior, em média, a $1 \mu\text{g.g}^{-1}$, sendo o genótipo OR aquele com maior conteúdo, isto é, $0,72 \mu\text{g.g}^{-1}$. Para os flavonoides, valores inferiores a $2 \mu\text{g.g}^{-1}$ foram detectados, com destaque para o genótipo BP e o MIX comercial que apresentaram os maiores conteúdos, $1,43 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $1,55 \mu\text{g.g}^{-1}$ respectivamente. Em relação ao conteúdo médio de fenólicos totais, os valores encontrados foram superiores aqueles observados para carotenoides e flavonoides, porém pouco expressivos comparativamente a outras fontes botânicas de interesse alimentar. As amostras do genótipo SB ($30,32 \mu\text{g.g}^{-1}$), do MIX ($22,65 \mu\text{g.g}^{-1}$) e do genótipo BP ($20,17 \mu\text{g.g}^{-1}$) destacaram-se por seus teores superiores em relação aos

demais genótipos em estudo. A literatura relata que os metabólitos secundários estudados são, em geral, encontrados em raízes coloridas de *M. esculenta*, especialmente amarelas, sendo instáveis quando expostos ao calor. Dessa forma, a coloração branca das raízes dos genótipos estudados e o aquecimento durante o processamento à obtenção da farinha justificam os baixos valores de conteúdos dos metabólitos secundários de interesse. De outra forma, essas informações são relevantes à contribuição da caracterização química e avaliação dos potenciais de uso dos GM do banco de germoplasma da EPAGRI/EEUR.

2. INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários têm sido bastante estudados devido a suas aplicações no tratamento de patofisiologias, como por exemplo, câncer, hipercolesterolemia, viroses e infecções bacterianas e fúngicas, por exemplo, (VAISHNAV; DEMAIN, 2010).

Os metabólitos secundários são compostos naturais e dentre os organismos produtores encontram-se os vegetais superiores e algas marinhas que possuem diversas vias de síntese, de acúmulo e de degradação que são controladas por fatores (a)bióticos e genéticos (PAVARINI et al., 20102).

Os carotenoides são pigmentos naturais geralmente encontrados em plantas com atividade antioxidante devido a sua estrutura química, isto é, cadeia poliênica típica e grupamentos hidroxilas ionizáveis (RICCIONI, 2009). Os principais carotenoides encontrados nos alimentos são o β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, zeaxantina, luteína e astaxantina. Alguns destes tem sido descritos em estudos epidemiológicos como benéficos à saúde humana, quando administrados profilaticamente ou terapeuticamente em decorrência de sua atividade antioxidante (RICCIONI, 2009). Além disso, diversos carotenoides são percussores de vitamina A (SAYRE et al., 2011), cuja falta em humanos afeta o crescimento, a reprodução e causa xerofthalmia (TANUMIHARDJO, 2011). Diversos trabalhos de melhoramento genético em curso buscam elevar o conteúdo de compostos pró-vitamina A em cultivares de mandioca (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009), ainda que as informações sobre a biodisponibilidade de β -caroteno a partir de *M. esculenta* sejam escassas (FRANO et al., 2013). Frano et al. (2013) obtiveram resultados

satisfatórios avaliando amostras de genótipos de mandiocas biofortificadas em mulheres adultas saudáveis, corroborando o potencial desta espécie à redução da deficiência de vitamina A, principalmente em populações carentes, tipicamente encontradas em países em desenvolvimento aonde a xeroftalmia constitui um sério problema de saúde pública.

Além dos carotenoides, os compostos fenólicos, que incluem uma ampla gama de metabólitos, como por exemplo, flavonoides, antocianinas, flavonas, flavonóis, são relatados como benéficos a saúde humana (SOTO-VACA et al., 2012). Entre os benefícios descritos, de forma predominante destacam-se aqueles derivados da atividade antioxidante destes metabólitos, a qual acredita-se estar ligada, por exemplo, à expressão e regulação gênica associadas a vias inflamatórias (SOTO-VACA et al., 2012). No entanto, estudos detalhados do(s) mecanismo(s) associado(s) àquela atividade são necessários, de modo a elucidar questões sobre o impacto do hábito de consumo de alimentos ricos nestes metabólitos e seus efeitos à saúde humana.

Nesse contexto, assume-se como relevante investigar as farinhas dos GM quanto à composição em metabólitos secundários antioxidantes e precursores de vitamina A, contribuindo à sua caracterização e definição do potencial de uso alimentar. Adicionalmente, em seu conjunto os resultados subsidiarão o programa de melhoramento genético da espécie, conduzido junto a EPAGRI/EEUR, visando à obtenção de variedades biofortificadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração e quantificação de carotenoides totais

Amostras (2g - peso seco) de farinhas com granulometria padronizadas (60 *Mesh*) dos GM e da farinha comercial (MIX) foram maceradas na presença de 2 volumes (20 mL) de solução de hexano: acetona (v/v), contendo 100 mg.L⁻¹ de hidroxitolueno butilado (BHT) e incubadas por 30 minutos, na ausência da luz. Subsequentemente, as amostras foram filtradas em suporte de celulose, sob vácuo, e centrifugadas (3.000 rpm, 5 min). O extrato organossolvente foi transferido para um frasco âmbar, seguido da evaporação do solvente em fluxo de N₂. O extrato concentrado foi ressuspensão em 3 mL de hexano e posteriormente submetido à espectrofotometria UV-visível (Hiatachi U-1800) para determinação do teor de carotenoides totais, através da leitura da absorbância a 450 nm (AMAN et al., 2005). A concentração de carotenóides totais foi calculada usando o coeficiente de extinção molar (ϵ) de 2590 L.cm⁻¹.mol⁻¹ (β -caroteno, em hexano), conforme previamente descrito (BRITTON, 1982). Os valores de concentração de carotenoides totais das amostras, média de três repetições, foram expressos em μ g de carotenoides/ grama de farinha (peso seco), com auxílio da fórmula proposta por Davies (1976).

$$\frac{\mu g \text{ de carotenoide}}{g \text{ de amostra}} = \frac{Abs \times V_{sol} \times 10000}{\epsilon \times 1cm \times m_{amostra}}$$

Onde:

Abs = Absorbância no comprimento de onda de máxima absorção, isto é, 450 nm.

V_{sol} = Volume do solvente usado na diluição.

ε = Coeficiente de extinção molar para β -caroteno (hexano), $2590 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$.

m = massa da amostra em gramas

3.2 Extração e quantificação de compostos fenólicos totais

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais baseou-se na metodologia de Rumbaoa, Cornago e Geronimo (2009), com modificações. Cerca de 1g de farinha (peso seco), foram adicionados em tubos falcon 9 mL de solução de metanol-HCl (1%, v/v), seguido de incubação em banho-maria (30 min – 40° C), em câmara escura e centrifugação (3000 rpm, 10 min).

Para determinação dos valores de conteúdos de fenólicos totais, o sobrenadante das amostras centrifugadas (200 μL) foi adicionado de 1,4 mL de água destilada e 100 μL do reativo de *Folin – Ciocalteu*, seguido de agitação em vórtex. Em seguida, foram adicionados 300 μL de carbonato de cálcio (20% de Na_2CO_3), a solução foi homogeneizada em vórtex e incubada (r 2 h, no escuro). A leitura da absorbância foi feita em leitor de ELISA (TP Reader NM, Thermoplate), a 750 nm. A quantificação dos fenólicos totais utilizou curva-padrão externa de ácido gálico (Sigma-Aldrich, MO – EUA, 10 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ – $y = 0,0070x, r^2 = 0,99$).

Os valores, média de três repetições, foram expressos em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de equivalentes de ácido gálico/grama de farinha (peso seco).

3.3 Flavonoides totais

A determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu a metodologia de Zacarias et al. (2007), com modificações. Amostras (2g

- peso seco) foram homogeneizadas em 20 mL de etanol e incubadas (1,5 h, em câmara escura). O extrato alcoólico foi filtrado em suporte de celulose, sob vácuo, coletando-se uma alíquota (0,5 mL) para a determinação do conteúdo de flavonoides totais, na presença de 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio (2%, m/v, em metanol) e 2,0 mL de etanol. A absorbância da solução em análise foi determinada a 420 nm, em espectrofotômetro UV-visível (Hiatachi U-1800). A quantificação dos flavonoides totais utilizou curva-padrão de quercetina (Sigma-Aldrich, MO – EUA, 10 a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ – $y = 0,010x$, $r^2 = 0,97$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μg de equivalentes de quercetina/ grama de farinha (peso seco).

3.4 Análise estatística

A estatística descritiva foi apresentada na forma de média e desvio padrão, ou mediana (interquartis: mínimo 25% - 75% máximo) quando apropriado. Uma função logarítmica foi aplicada ao conjunto de dados amostrais, quando requerido. Aos dados com distribuição gaussiana aplicou-se a análise de variância de uma via (ANOVA) e o teste complementar de Tukey ($P < 0,05$). Aos dados com distribuição não-gaussiana aplicaram-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste complementar de Dunn's. As análises estatísticas foram realizadas com o suporte dos programas *SigmaStat* (v. 3.5), *Excel* (Microsoft Office, 2007) e *GraphPad Prism* (v. 5.01).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Carotenoides totais

O conteúdo médio de carotenoides totais das farinhas dos GM e da farinha comercial (MIX), determinados por espectrofotometria UV-visível e pela fórmula de Lambert-Beer, está apresentado na **Figura 1**.

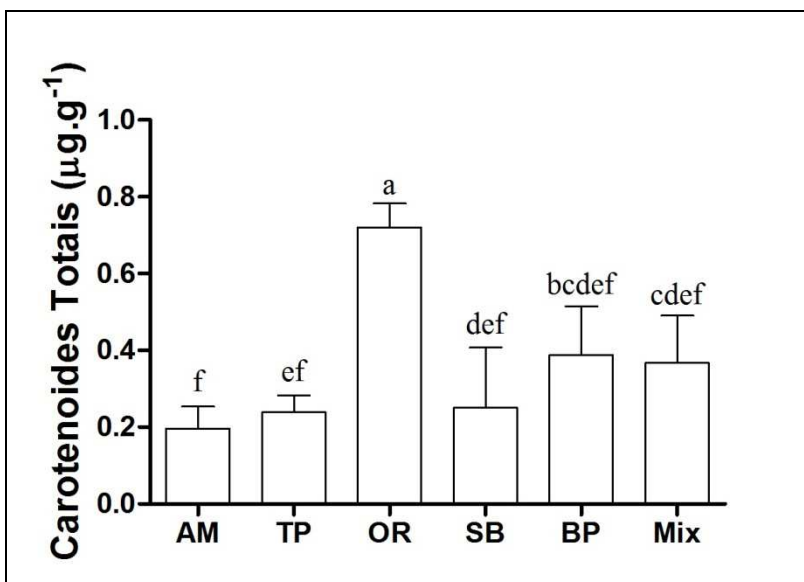


FIGURA 1 – Conteúdo médio de carotenoides totais ($\mu\text{g. g}^{-1}$, peso seco) de farinhas dos GM e do MIX comercial, determinado por espectrofotometria UV-visível - 450 nm. **AM** = Amarelinha; **TP** = Torta da Penha; **OR** = Oriental; **SB** = Samambaia; **BP** = Branca da Penha; **MIX** = Mix das farinhas comerciais. Colunas e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$), enquanto letras distintas denotam diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos (ANOVA, seguido do teste *post hoc* Tukey - $P < 0,05$).

Nassar et al. (2007), ao analisar amostras de raízes de clones de variedades crioulas de mandioca, cultivadas por indígenas na Amazônia e mantidas em bancos de germoplasma *ex situ* na Universidade de Brasília, detectaram conteúdos apreciáveis de β -caroteno, isto é, $27,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ de trans- β -caroteno na variedade UnB 400. Os autores realçam que a coloração dessa raiz é creme, assumindo coloração amarela após o cozimento. Portanto, em comparação aos dados daqueles autores, o conteúdo médio de carotenoides totais para os GM em estudo foi muito baixo ($< 0,8 \mu\text{g.g}^{-1}$), com destaque apenas para o genótipo OR, cuja coloração da raiz é branca. Em geral, as raízes de mandioca possuem pequenas quantidades de carotenoides, em especial o β -caroteno, precursor da vitamina A, o qual pode ser transformado a retinal, posteriormente reduzido a retinol e esterificado com ácidos graxos para armazenamento no fígado (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009). Em regiões aonde a mandioca é um alimento básico e a principal fonte energética, a biofortificação das raízes de *M. esculenta* com β -caroteno é um meio para reduzir as taxas de déficits em vitamina A (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009), uma patofisiologia que pode gerar cegueira, xerofthalmia e morte prematura em crianças. Além da manutenção dos tecidos epiteliais, aquela vitamina possui uma ação importante na resposta imunitária (SCOTT; RODRIQUEZ-AMAYA, 2000), contribuindo à redução de infecções de natureza bacteriana e fúngica.

Além das formas isômericas *cis* e *trans* do β -caroteno, a literatura também relata a existência de outros carotenoides de interesse em mandioca, como as xantofilas luteína e zeaxantina e o caroteno licopeno (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009).

Segundo Montagnac, Davis e Tanumihardjo (2009), raízes de mandioca com coloração amarela e alaranjada são fontes importantes de carotenoides pró-vitamina A. Em concordância, Bayoumi et al. (2010) relacionam a cor amarela daquela biomassa ao seu maior conteúdo de β -caroteno. Tal contexto pode ser constatado nos GM em estudo, os quais apresentam raízes de coloração branca, o que pode justificar os baixos teores de carotenoides totais observados. Além disso, o processamento de alimentos através de altas temperaturas afeta o conteúdo e a biodisponibilidade dos carotenos (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009). Ceballos et al. (2012), investigando o conteúdo de carotenoides totais em amostras de raízes frescas e cozidas detectaram valores médios de $32,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $27,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco respectivamente, comprovando que o aquecimento realmente causa perdas no conteúdo daqueles metabólitos secundários.

De fato, no presente trabalho observou-se que a ação do calor afetou quantitativamente o conteúdo médio de carotenoides totais a partir da preparação das farinhas dos GM em pirão d'água, um tipo de preparo das farinhas muito comum em regiões litorâneas do Brasil. Os resultados revelaram concentração zero daqueles compostos, ou seja, o calor degradou a pequena quantidade existente nas farinhas e especula-se que tal fato também ocorra durante o processamento da farinha que necessita de calor para alcançar a granulometria desejável.

4.2 Compostos fenólicos e flavonoídicos totais

A literatura sobre metabólitos secundários em farinhas ou raízes de mandioca é escassa e grande parte dos trabalhos refere-se à classe dos compostos carotenoides. Com relação a flavonoides e fenólicos totais, os estudos tem focado maiormente a síntese desses

metabólitos durante o processo de deterioração das raízes quando armazenadas em condições inadequadas. Buschmann et al. (2000) por exemplo, relatam a presença de três flavonóides, a saber: galocatequina, catequina e catequina galato nos primeiros dias (1-2) após a colheita, alcançando os maiores teores após 4 a 6 dias. Os autores sugerem que esses flavonóis não estão associados diretamente a respostas de defesa a agentes bióticos e abióticos, à semelhança das hidroxycumarinas que já são encontradas em raízes nas primeiras 24 horas do início da deterioração.

Os metabólitos secundários possuem distintas funções no metabolismo e fisiologia das plantas e muitos são produzidos de acordo com respostas a estímulos ambientais e, por conseguinte, influenciam na composição química e qualidade dos alimentos (LUKASZEWICZ et al., 2004).

O conteúdo médio de flavonoides totais das farinhas dos GM e da farinha comercial está apresentado na **Figura 2-A**. Assim como constatado para o conteúdo de carotenoides totais, os flavonoides também apresentaram valores considerados bastante baixos, isto é, $< 2 \mu\text{g.g}^{-1}$, com destaque para o genótipo BP e a farinha comercial (MIX) em função de suas maiores concentrações. De fato, em uma análise comparativa a biomassas de outras espécies botânicas de importância alimentar, os genótipos em estudo caracterizam-se por um reduzido, senão insignificante, potencial como fonte daqueles metabólitos antioxidantes. A título de exemplo, Hung et al. (2009), investigando farinhas de trigo integral e branca, detectaram em farinha com grãos inteiros teores de 226,5 a 341,8 μg de equivalentes de rutina/grama de farinha, respectivamente para as formas livres (agliconas) e conjugadas

dos flavonoides sendo tais valores significativamente superiores aos de farinhas brancas.

Segundo Zuanazzi e Montanha (2007), o aquecimento pode interferir na análise quantitativa de flavonoides, por causar a hidrólise dos *O*-heterosídeos, interferindo negativamente na estabilidade desses compostos. Tal cenário é esperado ocorrer no processamento das biomassas de raízes de mandiocas, as quais são expostas a altas temperaturas à produção de farinhas.

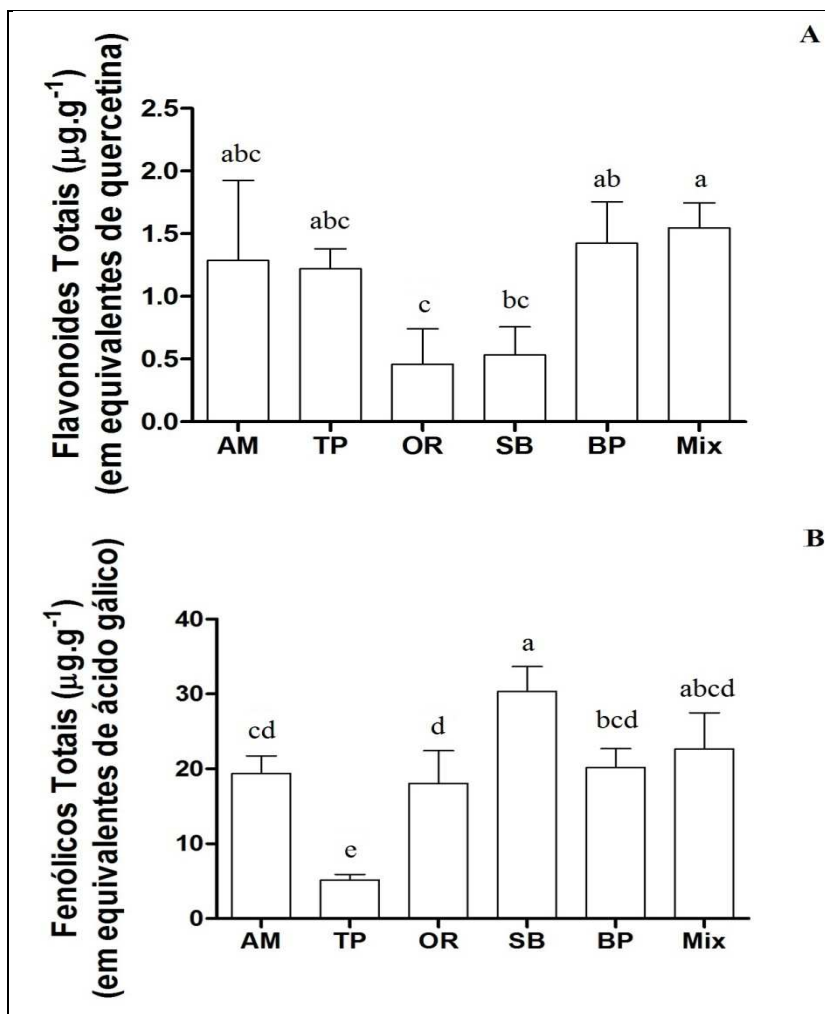


FIGURA 2 - Conteúdo médio de flavonoides (**A**) e fenólicos (**B**) totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$, peso seco) dos GM e da farinha comercial (MIX), determinado por espectrofotometria UV-visível - 420 nm (flavonoides) e 750 nm (fenólicos). **AM** = Amarelinha; **TP** = Torta da Penha; **OR** = Oriental; **SB** = Samambaia; **BP** = Branca da Penha; **MIX** = Mix das farinhas comerciais. Colunas e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$), enquanto letras distintas denotam diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos (ANOVA, seguido do teste *post hoc* Tukey - $P < 0,05$).

Estudar a presença de compostos fenólicos em alimentos é um fator importante economicamente, haja vista sua aplicação na indústria como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas, além da reconhecida atividade antioxidante de alguns derivados de ácidos fenólicos como os ácidos clorogênico, caféico e seus ésteres com esteróis e triterpenos, por exemplo, que podem auxiliar no retardado de doenças causadas por reações oxidativas em sistemas biológicos (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007) e na conservação dos alimentos. Os conteúdos médios de fenólicos totais das farinhas dos GM e da farinha comercial estão apresentados na **figura 2-B**. Diferentemente dos demais metabólitos secundários já discutidos neste capítulo, o conteúdo de compostos fenólicos totais mostrou-se mais elevado, porém foi considerado pouco expressivo, comparativamente a outras fontes de fenólicos na literatura. O genótipo SB destacou-se por seu maior conteúdo, $> 30 \mu\text{g.g}^{-1}$, seguido da farinha comercial (MIX) e do genótipo BP.

Em termos comparativos, Rumbaoa, Cornago e Geronimo (2009) investigaram o conteúdo de fenólicos totais das variedades Bengueta, Ganza, Igorota e 125411.22 de batatas (*Solanum tuberosum*) e encontraram valores médios de 34, 4 a 50 mg de equivalente de ácido gálico/100g da amostra (peso seco). Outro fator importante no trabalho de Rumbaoa, Cornago e Geronimo (2009) é a coloração dessas batatas, que assim como na maioria dos trabalhos que relacionam genótipos de mandioca a seus conteúdos de carotenoides, referem-se à coloração da polpa amarela. Esta abordagem indica que as colorações das raízes estão ligadas a maior concentração de alguns metabólitos secundários, o que contrasta com os genótipos do presente estudo que apresentam

coloração branca. Portanto, essa pode ser uma possível explicação para o baixo conteúdo de fenólicos totais nos GM em estudo.

Hung et al. (2009) detectaram teores entre 1,01 e 2,40 mg em equivalentes de ácido ferúlico/ grama de farinha de compostos fenólicos livres e conjugados, respectivamente, em grãos inteiros de trigo. No entanto, para amostras de farinha branca, houve uma redução para 0,28 e 0,34 mg em equivalente de ácido ferúlico/grama de farinha de compostos fenólicos livre e conjugados, respectivamente.

Rumbaoa, Cornago e Geronimo (2009) encontraram resultados significativos nos ensaios de DPPH, que mede a atividade sequestradora de radicais livres, em amostras de batata. Segundo aqueles autores, ao conteúdo de fenólicos totais dos extratos vegetais estudados relacionou-se diretamente com sua atividade anti-radicaís livres. De fato, esses resultados corroboram os dados do presente trabalho, haja vista que o ensaio de DPPH realizado com os extratos fenólicos das farinhas dos GM em estudo revelou atividade antioxidante bastante reduzida, (dados não exibidos), devido à pequena quantidade de compostos fenólicos totais.

Além disso, os compostos fenólicos são bastante instáveis e são facilmente oxidados através de enzimas vegetais específicas, ou por influência da luz, calor ou em meio alcalino, o que gera um consequente escurecimento das soluções (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007). Nesse contexto, é importante destacar mais uma vez que a exposição às altas temperaturas dos fornos aonde as farinhas dos GM são produzidas e explica em partes o baixo conteúdo de compostos fenólicos observado.

5. CONCLUSÕES

Diante da discussão no presente trabalho é possível observar que a maioria das fontes botânicas, sejam elas de mandioca ou de batata, por exemplo, ricas em alguns metabólitos secundários como carotenoides e compostos fenólicos foram encontradas em raízes coloridas, principalmente amarelas, o que demonstra a relação entre cor e a presença destes metabólitos. Além disso, a instabilidade desses compostos diante de temperaturas elevadas, como em processos de cozimento, muito natural no preparo da maioria dos alimentos, também é um dos fatores responsáveis pela degradação e perdas destes.

Todos esses fatores juntos contribuem de maneira significativa para o menor conteúdo de metabólitos secundários encontrados nos GM estudados. As raízes dos GM apresentam coloração branca e suas farinhas de branca a creme, e, além disso, o processamento em farinha submete a matéria-prima a altas temperaturas que são necessárias para adquirir a granulometria fina que confere maior valor de mercado ao produto.

Não obstante, a coloração branca dessas raízes não é por acaso. Essa escolha feita pelos agricultores provavelmente advém da exigência e do tradicional costume de consumo de farinhas de mandioca branca por algumas populações. De forma similar, há consumidores que preferem farinha com granulometria grossa, ou ainda, dependendo da região, o consumo de farinha d'água à farinha seca. Ou seja, os hábitos de consumo dos tipos de farinhas de mandioca constituem uma questão regionalista e cultural.

Nesse contexto, diante dos benefícios que os metabólitos secundários estudados podem trazer a saúde humana, é interessante a

produção de farinhas a partir de genótipos de raízes coloridas, via programas de melhoramento genético assistido visando a biofortificação. No entanto, como discutido previamente, o consumo de farinha de mandioca apresenta contornos culturais marcantes e, como tal, poderá ser de difícil alteração sob a ótica da mudança do hábito em favor das farinhas de coloração amarela ou creme. Para tal, obviamente requer-se a iniciativa do setor produtivo afim quanto aos esclarecimentos pertinentes e convincentes das vantagens à saúde humana de tal mudança de hábito à população consumidora. Adicionalmente, é mister considerar que assim como é difícil para população mudar seus hábitos de consumo, para o agricultor, a mudança de genótipos requer usualmente um processo que envolve o despertar de seu interesse, a comprovação das alegadas vantagens do genótipo, a disponibilidade de material ao cultivo e práticas de manejo percebidas como ordinárias, por exemplo. Este contexto encontra alguma dificuldade, haja vista a cultura local de cultivar e/ou produzir farinhas sempre de um mesmo genótipo, um hábito ensinado de geração a geração.

Apesar das farinhas dos GM estudados não serem fontes ricas em compostos carotenóidicos e fenólicos, os resultados obtidos são importantes à caracterização do seu potencial químico, em conexão com programas de melhoramento genético da espécie assistidos bioquimicamente, por exemplo. De fato, tais informações são relevantes e inéditas ao processo de tipificação do potencial nutricional dos genótipos de *M. esculenta* do BAG da EPAGRI/EEUR. Além disto, em seu conjunto, os resultados auxiliarão no entendimento de processos

fisiológicos em pós-colheita, notadamente a suscetibilidade à degeneração dos tecidos radiculares de GM.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAN, R.; CARLE, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; SCHIEBER, A. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, p. 99-105, 2005.

BAYOUMI, S. A. L.; ROWAN, M.; BEECHING, J. R.; BLAGBROUGH, I. S. Constituents and secondary metabolite natural products in fresh and deteriorated cassava roots. **Phytochemistry**, v. 71, p. 598-604, 2010.

BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H (Orgs.). **Carotenoids**, Birkhäuser Verlag, Basel: Switzerland, v. 1B, p. 13-62, 1982.

BUSCHMANN, H.; RODRIGUEZ, M. X.; TOHME, J.; BEECHING, J. R. Accumulation of hydroxycoumarins during post-harvest deterioration of tuberous roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Annals of Botany**, v. 86, p.1153-1160, 2000.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS e Florianópolis: UFSC, p. 519–535, 2007.

CEBALLOS, H.; LUNA, J.; ESCOBAR, A. F.; ORTIZ, D.; PÉREZ, J. C.; SÁNCHEZ, T.; PACHÓN, H.; DUFOUR, D. Spatial distribution of dry matter in yellowfleshed cassava roots and its influence on carotenoid retention upon boiling. **Food Research International**, v. 45, p. 52-59, 2012.

DAVIES, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W. (Org.). **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. 2. ed. London: Academic Press, p. 38-165, 1976.

FRANO, M. R. la; WOODHOUSE, L. R.; BURNETT, D. J.; BURRI, B. J. Biofortified cassava increases b-carotene and vitamin a concentrations in the tag-rich plasma layer of american women. **British Journal of Nutrition** (2012), doi:10.1017/S0007114512005004.

HUNG, P. V.; MAEDA, T.; MIYATAKE, K.; MORITA, N. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. **Food Research International**, v. 42, p. 185-190, 2009.

LUKASZEWICZ, M.; MATYSIAK-KATA, I.; SKALA, J.; FECKA, I.; CISOWSKI, W.; SZOPA, J. Antioxidant capacity manipulation in transgenic potato tuber by changes in phenolic compounds content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1526-1533, 2004.

MONTAGNAC, J. A.; DAVIS, C. R.; TANUMIHARDJO, S. A. Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances

for improvement. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 181-194, 2009.

NASSAR, N.; VIZZOTTO, C. S.; SCHWARTZ, C. A.; PIRES JÚNIOR, O. R. Cassava diversity in Brazil: the case of carotenoid-rich landraces. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 1, p. 116-121, 2007.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5-16, set. 2012.

RICCIONI, G. Carotenoids and cardiovascular disease. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 11, p. 434-439, 2009.

RUMBAOA, R. G. O.; CORNAGO, D. F.; GERONIMO, I. M. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 546-550, 2009.

SAYRE, R.; BEECHING, J. R.; CAHOON, E. B.; EGESI, C.; FAUQUET, C.; FELLMAN, J.; FREGENE, M.; GRUISSEM, W.; MALLOWA, S.; MANARY, M.; MAZIYA-DIXON, B.; MBANASO, A.; SCHACHTMAN, D. P.; SIRITUNGA, D.; TAYLOR, N.; VANDERSCHUREN, H.; ZHANG, P. The biocassava plus program: biofortification of cassava or sub-saharan Africa. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, p. 251-272, 2011.

SCOTT, K. J., RODRIQUEZ-AMAYA, D. Pro-vitamin A carotenoid conversion factors: retinol equivalents - fact or fiction? **Food Chemistry**, v. 69, p. 125-127, 2000.

SOTO-VACA, A.; GUTIERREZ, A.; LOSSO, J. N.; XU, Z.; FINLEY, J. W. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 6658-6677, 2012.

TANUMIHARDJO, S. A. Vitamin A: biomarkers of nutrition for development. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p. 658S-665S, 2011.

VAISHNAV, P.; DEMIAN, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223-229, 2010.

ZACARIAS, A. A.; MORESCO, H. H.; HORST, H.; BRIGHENTE, I.M.C.; MARQUES, M. C. A.; PIZZOLLATI, M. G. Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. In: 30ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2007, Águas de Lindoia, São Paulo: **Sociedade Brasileira de Química**, 2007, p. 1-2.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS e Florianópolis: UFSC, p. 577–614, 2007.

Capítulo 3

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INGESTÃO DE FARINHA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) NO PERFIL LIPÍDICO E GLICÊMICO DE RATOS

1. RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a propriedade da farinha de mandioca, do genótipo Torta da Penha incorporado à ração, em reduzir a concentração plasmática de lipídios, da glicose e da quantidade de gordura corpórea de ratos Wistar. Foram utilizados 40 ratos machos, com idade de 30 dias, distribuídos em quatro grupos, a saber: Controle (C) sem a adição ou substituição de ingredientes à ração, Hiperlipídico (H) semelhante ao C, porém com adição de ingredientes hiperlipídicos, Farinha (Fr) semelhante ao C, porém com substituição parcial de amido e alteração do teor total de fibras e Farinha-hiperlipídico (FrH), semelhante à Fr porém com adição de ingredientes hiperlipídicos. As dietas não influenciaram significativamente o consumo de ração, e o peso médio e da gordura periepididimal dos animais. No entanto, o tratamento Fr apresentou resultados positivos ao C quanto à concentração plasmática de TG, glicose e do tecido adiposo retroperitoneal. O grupo Fr também apresentou o menor volume de fezes úmidas, acompanhado do tratamento FrH que causou a redução de valores médios do volume de fezes secas. Os grupos tratados com farinha, isto é, Fr e FrH, também apresentaram resultados positivos na redução da concentração sérica pós-prandial de glicose. E o tratamento FrH também induziu a diminuição dos níveis plasmáticos de TG, CT e das lipoproteínas potencialmente aterogênicas (não-HDL-C), bem como da concentração hepática de TG quando comparado ao grupo H. Esses resultados são altamente relevantes, pois demonstram o potencial hipocolesterolêmico e hipotrigliceridêmico da farinha de mandioca revelando sua eficiência no controle das dislipidemias. Nesse contexto, conclui-se que a ingestão de farinha de mandioca demonstrou efeitos

benéficos sobre as variáveis bioquímicas associadas, principalmente, ao perfil lipídico em ratos Wistar e que esta biomassa pode ser promissora como alimento com potenciais propriedades funcionais de interesse à saúde humana, uma abordagem de interesse à valorização mercadológica desse produto.

2. INTRODUÇÃO

Em sistemas de produção de agricultura familiar, onde predomina o cultivo de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), a farinha é a principal fonte de renda. Este produto apresenta alta especificidade regional de acordo com o modo de fabricação e é largamente fabricada em todo o país, sendo a principal forma de processamento da mandioca (EMBRAPA, 2003; EMBRAPA, 2006).

Nesse contexto, assume-se que o tradicional hábito brasileiro de consumo de farinha de *M. esculenta* pode ser considerado uma fonte alternativa de fibras à intervenção nutricional profilática e terapêutica das dislipidemias. De fato, a farinha de mandioca caracteriza-se por um conteúdo de fibras brutas entre 1,5 a 3,5% (m/m) (CHARLES; SRIROTH; HUANG, 2005) e a demonstração do efeito regulador do metabolismo lipídico daquela fração constitui uma estratégia adequada a sua caracterização como alimento portador de potenciais propriedades funcionais de interesse à saúde humana. Adicionalmente, esta abordagem é vista pelo setor produtivo afim como uma estratégia relevante de adição de valor de mercado ao produto.

A busca de mercados distintos com agregação de valor e atributos diferenciados de qualidade gera oportunidades de acesso aos agricultores de pequeno e médio porte a novos nichos de mercado nacional ou internacional, como já se verifica em produtos artesanais e naqueles com denominação de origem (MALUF, 2004).

As fibras presentes nos alimentos de origem vegetal apresentam funções biológicas benéficas no trato gastrointestinal e na redução do risco do desenvolvimento de determinadas doenças (SPILLER, 1994; MARLETT; SLAVIN, 1997; AMERICAN DIETETIC

ASSOCIATION, 2008). As fibras solúveis, como as pectinas, ligam-se a lipídeos e ácidos biliares e aumentam a sua excreção, diminuindo, assim, o colesterol e lipídeos sanguíneos. Por sua vez, as fibras insolúveis como a celulose, hemicelulose e lignina, apesar de não atuarem na hipocolesterolemia, são importantes na redução da ingestão calórica, pois aumentam a sensação de saciedade, auxiliando na redução do peso corpóreo (SBC, 2007; SLAVIN, 2008).

Atualmente, o excesso de gordura corporal é considerado um importante fator de risco à saúde e, mais especificamente, às doenças crônico-degenerativas, incluindo as cardiovasculares. Além disso, o sobrepeso e a obesidade vêm assumindo proporções epidêmicas em alguns países desenvolvidos e crescimento rápido e progressivo em países emergentes (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 1998). Segundo o ministério da Saúde, no Brasil as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no país, respondendo por 31,3% dos óbitos em 2009 (BRASIL, 2011).

As dislipidemias estão associadas ao desenvolvimento de desordens do sistema cardiovascular, tais como a aterosclerose que provoca o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral (AVC). A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e de origem multifatorial. A elevação de lipoproteínas aterogênicas como LDL, IDL, VLDL e remanescentes de quilomícrons, a hipertensão arterial e o tabagismo são alguns dos fatores de risco que contribuem para a formação da placa aterosclerótica (SBC, 2007).

O tratamento inicial recomendado para as dislipidemias caracteriza-se pela mudança de estilo de vida, como por exemplo, prática de atividades físicas, abandono do tabagismo e alimentação

saudável (SBC, 2007). Neste contexto, para reduzir a concentração plasmática de LDL-C há inúmeros alimentos funcionais e suplementos dietéticos disponíveis no mercado (NIJJAR et al., 2010), sendo que diversos estudos demonstraram a eficiência de constituintes alimentares e fitoquímicos no controle das dislipidemias, tais como as fibras, os carotenoides e os flavonoides (RIBEIRO; SHINTAKU, 2004).

Assume-se que estudos que revelem características nutricionais e eventuais benefícios à saúde humana dos genótipos de mandioca (GM) podem lhes agregar valor, amenizando o quadro de baixo retorno econômico associado ao seu cultivo e aumentando a competitividade e estimulando o setor produtivo. Além disso, criam-se oportunidades para que pesquisas contribuam ao desenvolvimento biotecnológico, via estudos de caracterização e aplicação (processos e/ou produtos) dessas biomassas em escala industrial.

Nesse contexto, ensaios nutricionais e bioquímicos foram realizados, consoante às normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), resoluções nº 18 e 19 (30 de abril de 1999) (ANVISA, 1999), com o intuito de avaliar os efeitos da ingestão de farinha de mandioca sobre o perfil lipídico e glicídico, em modelo experimental de ratos Wistar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental

3.1.1 Seleção do material vegetal

Foi utilizada a farinha de mandioca do genótipo Torta da Penha, pertencente ao BAG da EPAGRI, e que apresentou o maior teor de fibras, via análise centesimal, quando comparada às demais farinhas dos GM em estudo.

3.1.2 Ensaio biológico

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob protocolo PP00785. Os ensaios biológicos foram desenvolvidos no biotério setorial do Laboratório de Nutrição Experimental (Departamento de Nutrição/CCS-UFSC), sob supervisão da professora Dra. Vera Lucia Cardoso Garcia Tramonte. As variáveis bioquímicas de interesse foram mensuradas por métodos de rotina, junto ao Laboratório de Pesquisa em Lipídios, Antioxidantes e Aterosclerose, sob coordenação do professor Dr. Edson Luiz da Silva (Departamento de Análises Clínicas/CCS-UFSC).

O experimento foi constituído por 40 animais (4 grupos, n=10/grupo) e utilizou ratos machos, com 30 dias de idade, da espécie Wistar (*Rattus norvegicus* – 74,4 – 83,07 g), alojados em gaiolas metabólicas de aço inoxidável, em ambiente climatizado ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclos de luminosidade (claro/escuro) – 12h/12h. Os ratos foram alimentados conforme procedimento padrão, com acesso a água *ad libitum*.

3.1.3 Rações experimentais

As rações foram formuladas de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN), conforme AIN93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental (Departamento de Nutrição/CCS-UFSC) e fornecidas aos animais em forma de pó. O estudo foi composto por quatro tratamentos, a saber:

1. **Controle (C)** - Os animais receberam ração preparada com amido de milho e fibras de celulose conforme recomendação padronizada AIN93G de Reeves, Nielsen e Fahey (1993), sem a adição ou substituição de ingredientes;
2. **Hiperlipídico (H)** - Os animais receberam ração semelhante ao grupo C, porém adicionada (m/m) de 10% de gordura de coco, 1% de colesterol e 0,25% de ácido cólico;
3. **Farinha (Fr)** - Os animais receberam ração preparada de forma similar ao tratamento C, porém, com substituição parcial, isto é, de amido de milho e total de fibras de celulose por 12,5% (m/m) de farinha de mandioca;
4. **Farinha-Hiperlipídico (FrH)** - Os animais receberam ração preparada de forma similar ao tratamento Fr, porém adicionada (m/m) de 10% de gordura de coco, 1% de colesterol e 0,25% de ácido cólico.

A composição das dietas constituintes dos tratamentos é descrita na **Tabela 1**.

TABELA 1 - Composição (g/Kg) das rações experimentais utilizadas nos ensaios nutricionais e bioquímicos com ratos machos Wistar.

	C	H	Fr	FrH
Amido*	397.486	354.986	322.486	279.986
Farinha de mandioca	0	0	125	125
Caseína	200	200	200	200
Amido dextrinizado	132	132	132	132
Sacarose	100	100	100	100
Fibra**	50	50	0	0
Mistura mineral (AIN-93G-MX)	35	35	35	35
Mistura vitamínica (AIN-93-VX)	10	10	10	10
L-cistina	3	3	3	3
Bitartarato de colina	2.5	2.5	2.5	2.5
Óleo***	70	0	70	0
Gordura de coco	0	100	0	100
Colesterol	0	10	0	10
Ácido cólico	0	2.5	0	2.5
TBH****	0.014	0.014	0.014	0.014

* Amido de milho (~ 28% de amilose e 72% de amilopectina)

** Celulose microfina

*** Óleo de soja

**** *terc*-butil-hidroquinona

125 g de farinha de mandioca contêm: 2,69 g de fibra bruta (0,88 g de fibras solúveis e 9,63 g de fibras insolúveis) e 5,8 g de amido resistente (/kg da dieta)

Tratamentos: **C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha, **FrH** = Farinha-hiperlipídico

Os valores em destaque (sombreados e em negrito) informam as substituições ou modificações dos ingredientes.

Os animais pertencentes aos grupos H e FrH receberam teores elevados de gordura saturada e a adição de colesterol e ácido cólico, este último para auxiliar na absorção de colesterol, com o intuito de induzir

os animais à hipercolesterolemia e então avaliar os efeitos proporcionados devido à ingestão de farinha de mandioca em tal situação (grupo FrH) e compará-la ao grupo, também hipercolesterolêmico (H), que não a ingeriu, além de investigar o seu efeito, em animais normocolesterolêmicos (Fr).

3.1.4 Condução do experimento

O período de adaptação dos animais à dieta foi de 5 dias e considerou a administração de ração comercial Nuvilab®, fornecida pelo biotério central da UFSC. Em seguida, o período experimental de 30 dias foi iniciado, no qual os animais foram alimentados com as rações descritas acima. A coleta de fezes e o peso corporal dos animais foram aferidos semanalmente, enquanto o consumo de ração foi mensurado três vezes por semana.

Uma semana antes da realização da eutanásia dos animais foi avaliado o efeito do consumo da farinha de mandioca na glicemia pós-prandial. Para tanto, a concentração sérica de glicose foi monitorada por leitura em glicosímetro (Accu-Chek® Advantage), utilizando sangue obtido da veia da cauda dos animais. A concentração sérica de glicose foi quantificada em amostras de sangue coletadas após jejum de 12 h, antes e após 15, 30, 45, 60, 90 e 150 minutos da ingestão de 2 g de ração de acordo com cada tratamento. Este conteúdo foi fornecido aos 10 animais de cada grupo e consumido num prazo máximo de 20 minutos.

Ao final do experimento e após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com Quetamina (cloridrato de quetamina 10%) e Xilazina (cloridrato de xilazina 2%) na dose de 2,7 mg/kg de peso corpóreo, seguido de punção cardíaca e de laparotomia das cavidades abdominal e torácica para a coleta de sangue e retirada dos órgãos. O

sangue foi adicionado a tubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminoacético) e centrifugado (2000 rpm, 10 min), para a obtenção do plasma e posterior determinação da concentração de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), fração HDL-C e glicose. O fígado e as gorduras periepididimal e retroperitoneal foram retirados e pesados. Assim o plasma e os órgãos coletados foram armazenados (-80 °C) até posterior análise.

A **Figura 1** mostra o fluxograma de atividades e as principais etapas do ensaio biológico do presente estudo.

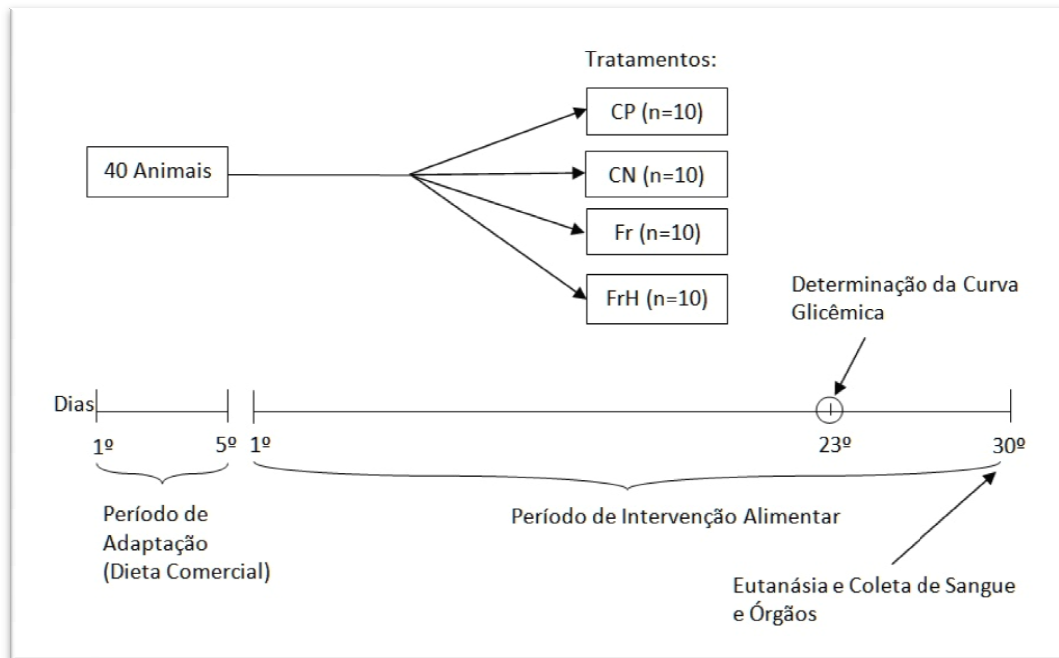


FIGURA 1 – Esquema das etapas do ensaio e do fluxo de atividades do estudo utilizando ratos Wistar como modelo biológico.

3.2 Análises laboratoriais

3.2.1 Análises plasmáticas

3.2.1.1 Determinação do colesterol total

A determinação do colesterol total no plasma dos ratos utilizou um kit de reagentes comerciais (LABTEST DIAGNÓSTICA®, Lagoa Santa, MG). O princípio do método baseia-se na hidrólise dos ésteres de colesterol pela colesterol-esterase, produzindo colesterol livre que, juntamente com o colesterol livre pré-existente, é oxidado pela colesterol oxidase, formando a colest-4-en-ona e o peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina serão oxidados e complexados formando a antipiril-quinonimina que tem absorvidade máxima em 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração de colesterol total na amostra.

3.2.1.2 Determinação do conteúdo da fração HDL

A determinação do conteúdo da fração HDL no soro dos ratos utilizou um kit de reagentes comerciais (LABTEST DIAGNÓSTICA®, Lagoa Santa, MG). As lipoproteínas contendo apo B-100 (VLDL e LDL) foram seletiva e quantitativamente precipitadas através do ácido fosfotúngstico (0,4 mmol/L) e cloreto de magnésio (20 mmol/L). Após centrifugação (15 min, 1200xg), o colesterol na HDL foi determinado no sobrenadante por um sistema enzimático idêntico ao descrito anteriormente para o colesterol total (item 3.2.1.1).

3.2.1.3 Determinação da concentração de triglicerídeos

A determinação dos níveis de triglicerídeos no soro dos ratos empregou um kit de reagentes comerciais (LABTEST DIAGNÓSTICA®, Lagoa Santa, MG). O princípio do método baseia-se na ação da lipase que hidrolisa os triglicerídeos, formando glicerol e ácidos graxos. O glicerol reage com o trifosfato de adenosina por ação da glicerolquinase, formando o glicerol-3-fosfato que, por ação da enzima glicerol-3-fosfato oxidase, forma dihidroxi-acetona e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio irá reagir com a 4-aminoantipirina e o clorofenol, numa reação catalisada pela peroxidase, produzindo a quinoneimina, com absorbância máxima em 540 nm. A intensidade da cor vermelha é diretamente proporcional à concentração de triglicerídeos na amostra.

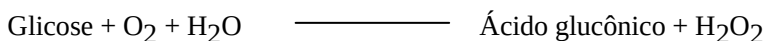
3.2.1.4 Estimativa do conteúdo de não-HDL-colesterol:

O não-HDL-colesterol representa o somatório das lipoproteínas potencialmente aterogênicas, como por exemplo, VLDL, IDL e LDL, e foi obtido indiretamente através da diferença entre os valores de colesterol total e fração HDL, pela equação: Não-HDL-colesterol = Colesterol Total – HDL-colesterol.

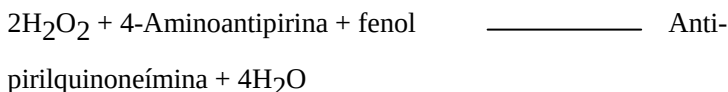
3.2.1.5 Determinação da Concentração de Glicose

A determinação do teor de glicose em amostras de plasma foi realizada de acordo com o método de Trinder (TRINDER, 1969) e utilizou um kit de reagentes comerciais (LABTEST DIAGNÓSTICA®, Lagoa Santa, MG). A glicose oxidase (glicose-oxigênio-1-

oxidorreductase) catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reagiu com 4-aminoantipirina (ou 4-aminofenazona) e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (hidrogênio-peróxido oxidorreductase), por meio de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma anti-pirilquinoneímina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra. A absorbância foi lida em 510 nm.



3.2.2 Análises hepáticas

3.2.2.1 Preparação do homogenato hepático

Alíquotas de tecido de cada lobo do fígado foram coletadas e lavadas em solução gelada (4°C) de cloreto de sódio 0,9%. As amostras foram secas sobre papel filtro, pesadas (400 mg), adicionadas de 2,0 mL de tampão salino fosfato (PBS - Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM; KCl 2,6 mM; NaCl 136 mM), pH 7,4 contendo EDTA 1 mM e 20 µL de BHT 10 mM (em metanol) e homogeneizadas em graal e pistilo de teflon (Tecnal – Campinas, SP). Após centrifugação (1500xg, 5 min) o sobrenadante foi recuperado e utilizado à quantificação de proteínas totais, de colesterol e triglicerídeos tecidual.

3.2.2.2 Extração e determinação do teor de colesterol tecidual

O colesterol tecidual foi extraído conforme método descrito por Bligh e Dyer (1959), com modificações. Para tal, alíquotas em duplicatas do homogenato hepático (100 μ L) foram adicionadas de 5,0 mL de solução de clorofórmio: metanol (2: 1, v/v) contendo 50 μ L de BHT 10mM (em metanol) e homogeneizadas em agitador tipo “vortex” por 1 min. A mistura foi filtrada e os solventes evaporados completamente em evaporador rotativo. O resíduo foi ressuspensionado em 100 μ L de solução fisiológica (0,9%) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (m/v) e 300 μ L desta solução salina.

O conteúdo de colesterol foi determinado utilizando um kit de reagentes comerciais (LABTEST DIAGNÓSTICA®, Lagoa Santa, MG), via método enzimático colorimétrico. Foram preparados microtubos contendo 50 μ L do resíduo ressuspensionado e outros dois microtubos contendo 10 μ L do padrão comercial de colesterol e 40 μ L de solução fisiológica (0,9%). Subsequentemente acrescentaram-se 500 μ L do reagente de trabalho de colesterol a cada um dos microtubos, seguido de agitação (vórtex), incubação (37 °C, 10 min) e leitura da absorbância (510 nm). Os resultados, média de duas repetições, foram expressos em miligramas de colesterol por miligrama de proteínas do homogenato hepático.

3.2.2.3 Extração e determinação do conteúdo de triglicerídeos tecidual

Os triglicerídeos teciduais foram extraídos conforme descrito no item 3.2.2.2 e dosados utilizando um kit comercial para triglicerídeos (LABTEST DIAGNÓSTICA®, Lagoa Santa, MG). Os resultados, média de duas repetições, foram expressos em miligramas de triglicerídeos por miligrama de proteínas do homogenato hepático.

3.2.2.4 Determinação de proteínas teciduais

As proteínas totais do homogenato hepático foram determinadas segundo o método de Bradford (1976) utilizando a albumina de soro bovino como padrão. O homogenato foi diluído em PBS (1: 50 - Na_2HPO_4 8 mM; KH_2PO_4 1,4 mM; KCl 2,6 mM; NaCl 136 mM) pH 7,4 e alíquotas de 25 μl foram adicionadas de 1,0 ml do reagente de Coomassie Brilliant Blue G e incubadas (escuro, 5 min). A leitura da absorbância foi realizada em 595 nm. A quantificação das proteínas teciduais foi feita a partir da curva padrão de albumina sérica bovina (0,2 a 1,0 mg.mL^{-1} – $y = 0,5351x$, $r^2 = 0,99$). Os resultados, média de duas repetições, foram expressos em miligramas de proteínas por mililitros de homogenato hepático.

3.2.3 Análise estatística

A estatística descritiva foi apresentada na forma de média e desvio padrão, ou mediana (interquartis: mínimo 25% - 75% máximo) quando apropriado. Uma função logarítmica foi aplicada ao conjunto de dados amostrais, quando requerido. Aos dados com distribuição gaussiana aplicou-se a análise de variância de uma via (ANOVA) e o teste complementar de Tukey ($P < 0,05$). Aos dados com distribuição

não-gaussiana aplicaram-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste complementar de Dunn's. As análises estatísticas foram realizadas com o suporte dos programas *SigmaStat* (v. 3.5), *Excel* (Microsoft Office, 2007) e *GraphPad Prism* (v. 5.01).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Consumo alimentar e ganho de peso corpóreo

As dietas de cada tratamento não influenciaram significativamente no consumo de ração e ganho de peso corpóreo dos animais. O consumo médio de ração/tratamento no período de intervenção alimentar foi de: H = 18,88 g (17,29 - 19,71g); C = 18,54 g (17,46 - 19,66g); Fr = 17,11 g (15,66 - 17,26g); FrH = 19,05 g (17,79 - 20,29g) - valores expressos em mediana e valor mínimo-máximo. Com relação ao peso corporal dos animais ao final do experimento, o tratamento Fr apresentou o menor valor, isto é, 272,95 g, seguido dos tratamentos C = 286,12 g, H = 286,22 g e FrH = 294,92 g. Na **Figura 2** é possível observar o ganho de peso corporal médio de cada tratamento durante as 5 semanas de estudo (período de adaptação e de intervenção alimentar), e a sutil e não significativa diminuição para o tratamento Fr.

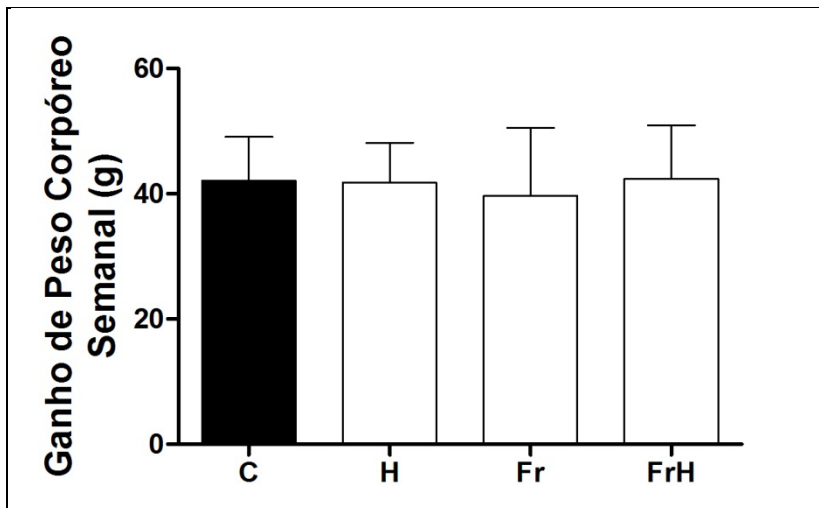


FIGURA 2 - Efeito dos tratamentos (**C** = Controle, **H** = Hiperlipídico; **Fr** = Farinha; **FrH** = Farinha-hiperlipídico) no ganho médio de peso corpóreo (g) de ratos machos Wistar durante as 5 semanas de experimento (período de adaptação + período de intervenção alimentar). Colunas e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ desvio padrão ($n = 6$).

Esses resultados estão de acordo com Vanhoof e Schrijver (1998) que não encontraram diferenças significativas no ganho de peso corporal e na taxa de crescimento de ratos machos Wistar quando do consumo de dietas contendo amido resistente (6%, m/v). A taxa de consumo das dietas formuladas por Vanhoof e Schrijver (1998) também foi semelhante ao presente experimento, isto é, 20,0 g/ dia. Da mesma forma, McIntyre, Gibson e Young (1993) ao investigarem o efeito da adição de fibras (10%, m/v) de goma de guar, farelo de aveia ou farelo de trigo na dieta de ratos machos Sprague-Dawley observaram taxas de aumento semelhantes e não significativas ($P < 0,05$) no peso corporal dos animais, durante o período experimental de 30 dias. No entanto,

Deckere, Kloots e Van Amelsvoort (1995) detectaram taxas distintas de ingestão em dietas formuladas com quantidades de amido resistente variando de 1 a 14,3% (m/v), cru (amilose de amido de milho, amido de batata, ou amido com alto teor de amilose modificada) e amidos retrogradados. Os autores também notaram que o consumo da ração correlacionou-se positivamente à quantidade de amido resistente na dieta, bem como identificaram uma relação inversa entre esta variável e a absorção de energia.

Ratos tratados com polissacarídeos indigeríveis (8%, m/v), como por exemplo, celulose, pectina, goma de guar ou amido resistente, apresentaram um aumento progressivo do peso corporal durante 8 semanas de experimento. As dietas contendo celulose e pectina induziram uma pequena, porém significativa, redução do peso corporal em relação ao controle (amido digerível) e o tratamento com amido resistente. No entanto, a taxa de aumento do peso corporal e de ingestão da ração não foi estatisticamente significativa (BRUNSGAARD; KNUDSEN; EGGUM, 1995).

Os estudos acima demonstram a existência de grande variação de fontes, de quantidades de amido resistente e fibras (solúveis e insolúveis) na ração e de seus efeitos sobre o ganho de peso corpóreo em ensaios biológicos utilizando modelos biológicos semelhantes aquele descrito neste trabalho. Além disto, destaca-se as discrepâncias entre os valores de amido resistente (0,58%) e de fibras brutas (0,27%) utilizados no presente estudo, os quais diferem bastante em relação à magnitude dos valores acima descritos, isto é, 1-14,3% amido resistente e 8-10% fibras brutas. Portanto, sugere-se que o consumo de ração e o peso corporal de ratos dependam da quantidade e tipo da fonte dietética de

polissacarídeos indigeríveis, sendo que análises comparativas entre experimentos biológicos deverão considerar a similaridade dos tratamentos e modelos biológicos no que concerne à sua pertinência.

4.2 Curva glicêmica

Na **Figura 3** é demonstrada a resposta glicêmica dos animais no período de jejum e pós-prandial. As dietas em estudo influenciaram nas respostas glicêmicas, principalmente no intervalo de tempo de 0 a 45 minutos.

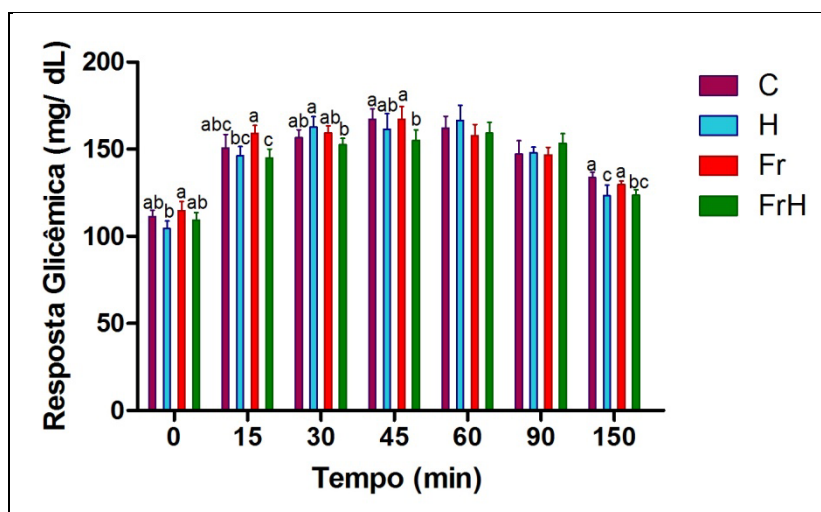


FIGURA 3 – Perfil glicêmico de ratos machos Wistar no período de jejum e pós-prandial (15 a 150 minutos), de acordo com os tratamentos em estudo, isto é, **C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-hiperlipídico. Os resultados são expressos em mg de glicose sanguínea/ dL. Colunas e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ desvio padrão ($n = 6$ a 7) e letras distintas denotam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (ANOVA, seguido do teste *post hoc* Tukey - $P < 0,05$).

Foram observadas diferenças significativas nas respostas glicêmicas dos animais entre os tempos 0 a 45 minutos e no tempo final de 150 minutos, sendo que o tratamento FrH apresentou a menor concentração sérica pós-prandial. Esses resultados podem ser explicados de acordo com as quantidades de carboidratos em cada dieta, pois apesar da tentativa de mantê-las isonutritivas, dentre as fontes de carboidratos de cada dieta apenas o teor de amido foi sutilmente distinto para formular a ração de acordo com o desenho experimental. Dessa forma, a **Tabela 2** evidencia as diferenças do conteúdo de amido total para cada tratamento, o que pode explicar os resultados encontrados na **Figura 3**. Embora, H seja a dieta com menor conteúdo de amido total, o tratamento FrH causou uma resposta glicêmica melhor.

TABELA 2 - Teores de amido de milho e mandioca diferentes em cada tratamento

Amido/kg da Dieta	Tratamentos			
	C	H	Fr	FrH
Amido de Milho (g)	397,486	354,986	322,486	279,986
% Amido de Milho	100	89,31	81,13	70,44
Amido de Mandioca (g)	0	0	98,76	98,76
% Amido de Mandioca	0	0	24,85	24,85
Total em gramas	397,486	354,986	421,246	378,746
total em %	100	89,31	105,98	95,29

Uma maneira distinta de interpretar a curva considera os valores médios de aumento da resposta glicêmica em cada tempo e para cada tratamento, descontando os valores basais em cada ponto, conforme pode ser observado na **Figura 4**.

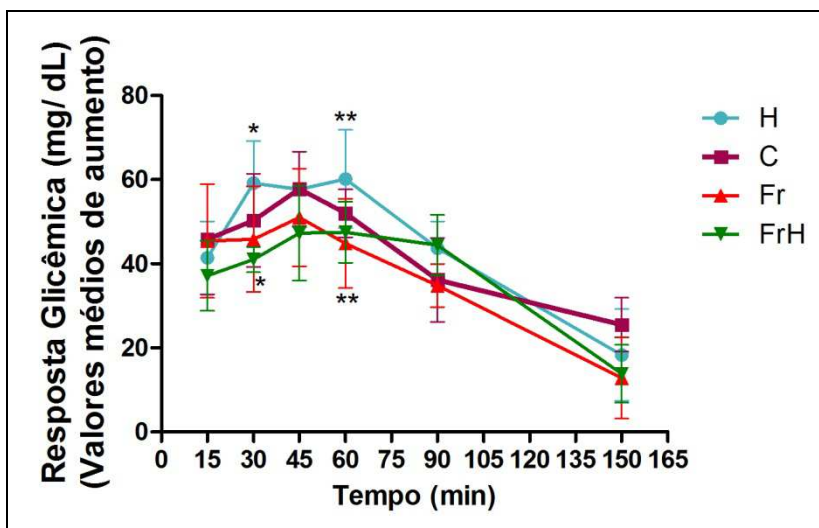


FIGURA 4 – Valores médios de glicose pós-prandial (15 a 150 minutos) subtraídos dos valores basais (jejum) em cada ponto, de acordo com os tratamentos **C** (Controle), **H** (Hiperlipídico), **Fr** (Farinha) e **FrH** (Farinha-hiperlipídico). Os valores são expressos em mg de glicose sanguínea/ dL. Formas geográficas e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ desvio padrão ($n= 6$ a 7) e os asteriscos denotam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (ANOVA, seguido do teste *post hoc* Tukey - $P<0,05$). * FrH comparado a H e ** Fr comparado a H.

Como os valores em jejum (t_{zero}) foram bastante distintos entre os tratamentos (variação biológica), cada ponto da curva foi subtraído do valor basal para que houvesse uma comparação mais coerente entre os grupos, isto é, normalização. Dessa forma, observou-se que além de FrH, o tratamento Fr também causou uma menor resposta sérica pós-prandial. Esse resultado é interessante, haja vista que Fr possui o maior teor de amido total (**Tabela 2**), sendo esperado que este

também apresentasse a maior resposta glicêmica. Dessa forma, sugere-se que como as únicas fontes de carboidratos alteradas em cada tratamento foram os teores de amido e fibras, tais componentes sejam responsáveis por essa resposta positiva.

Essa influência na glicemia observada nos grupos Fr e FrH são resultados interessantes, principalmente para indivíduos diabéticos, que necessitam manter os níveis reduzidos e regulares da resposta glicêmica ao alimentos ingeridos (DENARDIN, 2008).

Denardin (2008) testaram o efeito de rações formuladas a partir de biomassas de variedades de arroz com concentrações de amilose/amilopectina discrepantes e observaram que os tratamentos com alto teor de amilose apresentaram menores respostas glicêmicas, pois a amilose possui uma digestibilidade mais lenta comparativamente à amilopectina. Diferente do presente trabalho, o teor de amilose nos grupos FrH e Fr é de (16,57 e 16,98 – método pelo kit e lugol, respectivamente) enquanto, segundo fabricante, o amido de milho fornecido no preparo das rações C e H é de aproximadamente 28% de amilose, dessa forma se o conteúdo de amilose é mais lentamente digerível, então C e H deveriam apresentar menores respostas glicêmicas, o que não foi observado. Por outro lado, Lehmann e Robin (2007) alegam que um elevado teor de amilopectina como encontrado em amidos cerosos favorece uma digestão mais lenta, justificando a menor resposta sérica pós-prandial de FrH e Fr.

Diversos fatores concorrem para um amido apresentar digestibilidade lenta. Por exemplo, a estrutura específica, o arranjo entre materiais amorfos e semicristalinos, o tamanho do grânulo e a interação com proteínas e lipídios que envolvem o amido podem inibir

ou facilitar a sua digestão (LEHMANN; ROBIN, 2007). Ainda segundo Lehmann e Robin (2007), alimentos que contêm amido e sofrem tratamentos hidrotérmicos podem apresentar incrementos na quantidade de amido lentamente digerido, consoante à fonte botânica daquele polissacarídeo. Esta assertiva pode estar ligada ao tipo de amido contido na farinha de mandioca, haja vista o tratamento térmico que estas sofrem para alcançar uma menor granulometria e serem classificadas como “farinhas finas”, com maior valor de mercado. As altas temperaturas no processamento da farinha podem ter elevado os teores de amido resistente do tipo 3, isto é, o amido que após o processo de gelatinização resfria e retrograda, recristalizando-se novamente e tornando-se resistente às enzimas hidrolíticas (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010; HARALAMPU, 2000). De fato, as raízes são lavadas, raladas, prensadas e a massa úmida obtida nesse processo é aquecida em fornos de altas temperaturas que podem ter gelatinizado de forma branda algumas frações amídicas da farinha.

Um dos atuais desafios das indústrias alimentícias que utilizam amido como matéria-prima para outros alimentos ou o próprio alimento amiláceo é produzir alimentos que promovam a saúde humana. Neste contexto, amidos com perfis adequados de digestibilidade segundo o público consumidor, como por exemplo, idosos e bebês, e com boa estabilidade são continuamente buscados (LEHMANN; ROBIN, 2007). A determinação das características acima referidas é relevante à definição do potencial de uso de amidos de *M. esculenta* na alimentação humana, especialmente considerando o contexto de alimento funcional supostamente atribuído àquela biomassa.

4.3 Análises de plasma sanguíneo

As dietas influenciaram significativamente as variáveis em estudo do plasma sanguíneo. Os animais que consumiram dietas suplementadas com ácido cólico, colesterol e gordura de coco (H e FrH) apresentaram concentrações significativamente mais elevadas de colesterol total (H = 154,67 mg/dL, FrH = 134,33 mg/dL, Fr = 102,14 mg/dL e C = 90,33 mg/dL) e não-HDL-colesterol (H = 114,67 mg/dL, FrH = 90,17 mg/dL, Fr = 67,86 mg/dL e C = 59,5 mg/dL) comparativamente aos tratamentos Fr e C. No entanto, apenas o H apresentou uma elevação significativa de HDL colesterol em relação ao C (**Figuras 5-A e 6-A e B**).

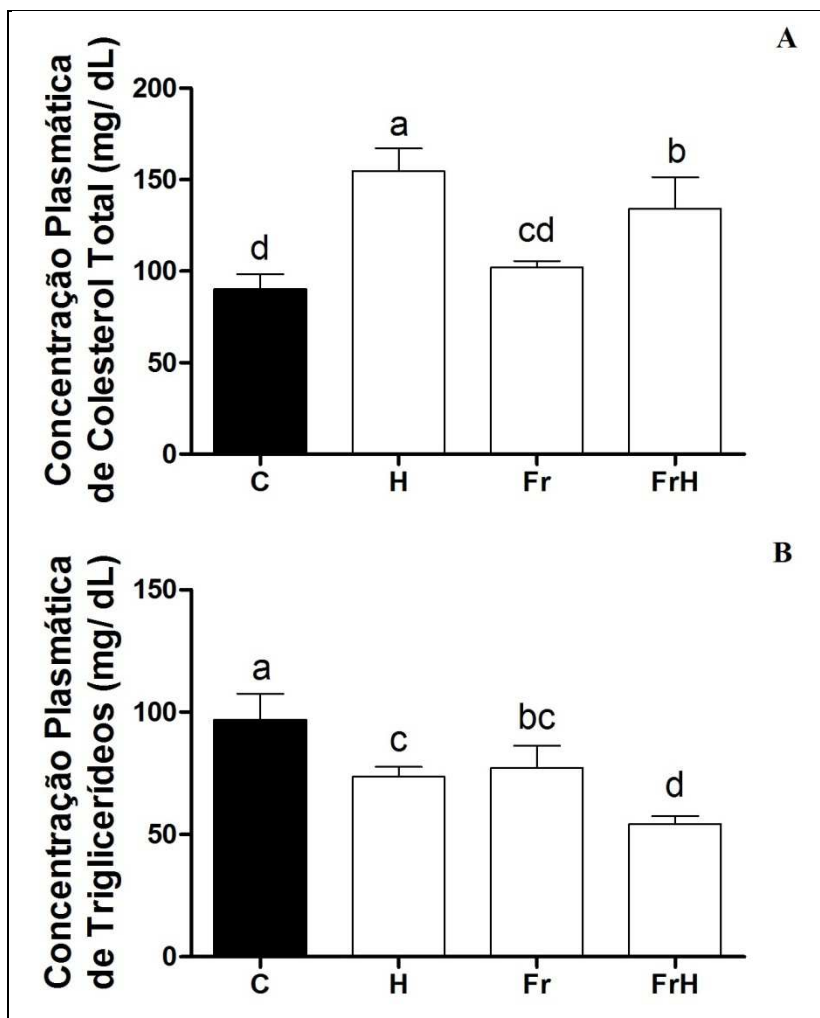


FIGURA 5 – Concentrações plasmáticas de colesterol total (A) e triglicerídeos (B) (mg/dL) em plasma sanguíneo de ratos machos Wistar, conforme o tratamento (C = Controle, H = Hiperlipídico, Fr = Farinha e FrH= Farinha-Hiperlipídico). Colunas e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ desvio padrão (n = 6 a 7) e letras distintas denotam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (ANOVA, seguido do teste *post hoc* Tukey - $P < 0,05$). O teste estatístico para a variável colesterol foi realizado sobre dados logaritmicamente transformados.

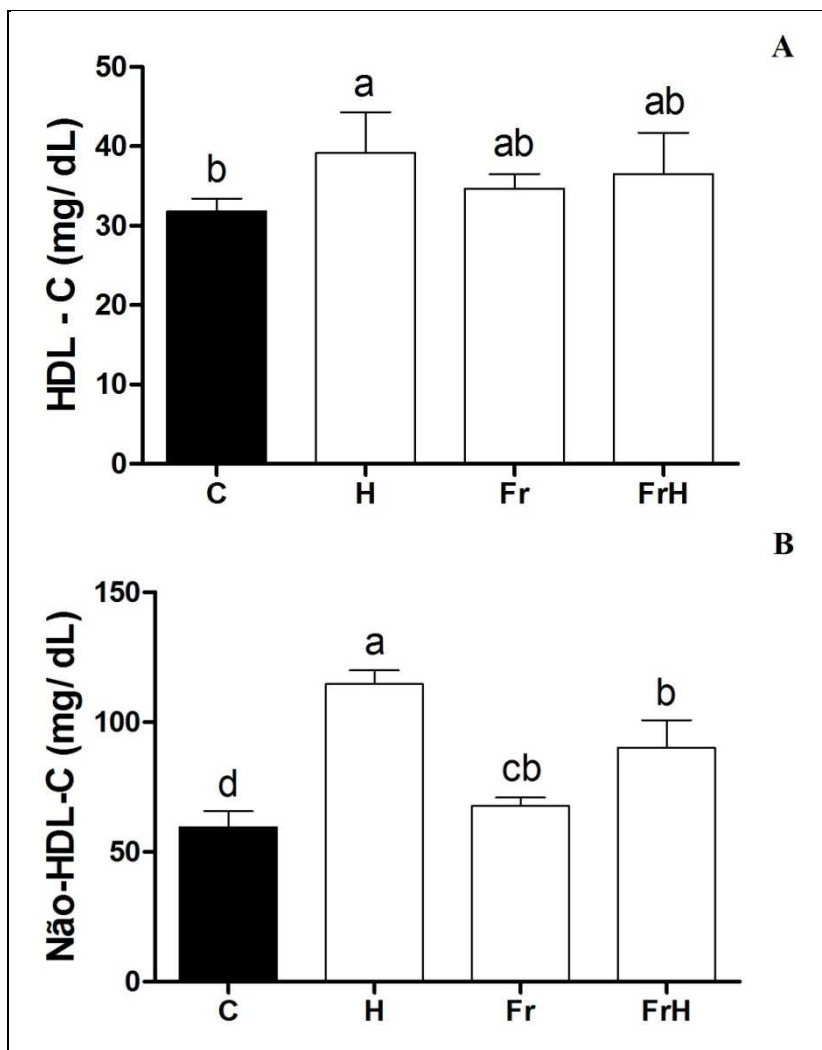


FIGURA 6 - Concentrações plasmáticas de HDL-C (**A**) e não-HDL-C (**B**) (mg/dL) em plasma sanguíneo de ratos machos Wistar, consoante ao tratamento (**C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-Hiperlipídico). Colunas e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ desvio padrão ($n = 6$ a 7) e letras distintas denotam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (ANOVA, seguido do teste *post hoc* Tukey - $P < 0,05$).

Esses resultados são, em partes, semelhantes aos encontrados por Vanhoof e Schrijver (1998), aonde animais normocolesterolêmicos que consumiram a dieta controle e as dietas testes, sem e com amido resistente, respectivamente, não apresentaram diferenças estatísticas entre e as concentrações plasmáticas de colesterol livre, total e esterificado e a razão HDL: LDL colesterol. No entanto, a adição de ácido cólico e colesterol a estas mesmas dietas causou a elevação do colesterol livre, total e esterificado e uma diminuição na proporção de HDL: LDL colesterol, comparativamente aos animais normocolesterolêmicos. Aqueles autores não detectaram interação significativa entre o consumo de amido resistente suplementado com colesterol e a concentração plasmática de colesterol, mas relataram alterações nos valores das variáveis bioquímicas proporcionais à quantidade de ingestão de amido resistente em animais normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos.

De acordo com Carter et al. (1998), o consumo de fibras insolúveis por ratos machos Sprague-Dawley, como celulose e lignina, não alterou a concentração sérica de colesterol, enquanto fontes de fibras solúveis como pectina e goma de guar causaram reduções significativas sobre esta variável. Os autores observaram acréscimos significativos nos valores de lipoproteínas LDL-C e HDL-C, Carter et al. (1998) quando da ingestão de fibras insolúveis (10% lignina e celulose, m/m) em relação às solúveis, isto é, pectinas e goma de guar (10%, m/m).

No presente estudo, a elevação dos teores de CT plasmático demonstrou que a indução à hipercolesterolemia nos tratamentos H e FrH logrou êxito, validando o modelo para hipercolesterolemia em ratos

Wistar. Esse resultado é muito importante, pois, conforme Russell e Proctor (2006), ratos tem aptidão em resistir a hipercolesterolemia mesmo a partir de absorção de elevadas níveis de colesterol.

Além da elevação de CT plasmático dos animais pertencentes aos tratamentos H e FR, eles também apresentaram valores elevados na somatória das lipoproteínas potencialmente aterogênicas, VLDL, IDL e LDL. Contudo, esperava-se que o tratamento FrH apresentasse alguma ação benéfica, reduzindo os teores destas variáveis, conforme foi verificado. Os animais hipercolesterolêmicos que ingeriram farinha de mandioca (FrH) reduziram, de maneira significativa, cerca de 20,34 mg/ dL de CT quando comparados aos ratos hipercolesterolêmicos que não receberam a farinha (tratamento H). Da mesma forma, o grupo FrH também foi eficiente na redução dos níveis de lipoproteínas potencialmente aterogênicas (não-HDL-C) quando comparado ao grupo H, apresentando uma diminuição estatisticamente significativa de 24,5 mg/ dL. Esses resultados são altamente relevantes, pois demonstram o potencial hipocolesterolêmico da farinha de mandioca e revelam sua eficiência no controle das dislipidemias.

Esses parâmetros analisados em animais hipercolesterolêmicos são interessantes, haja vista, que já está bem estabelecido na literatura que a ingestão elevada de gordura dietética também determina o aumento da lipemia pós-prandial, alterando o padrão de lipoproteínas geral, as quais são um fator de risco de doenças cardiovasculares (LAIRON; PLAY; JOURDHEUIL-RAHMANI, 2007).

De outra maneira, os resultados da análise da concentração plasmática de triglicerídeos (TG) foram opostos aos descritos acima. O tratamento FrH apresentou uma redução significativa (FrH = 54,33 mg/dL) comparativamente aos demais, como por exemplo, C = 96,83 mg/dL, Fr = 77,17 mg/dL e H = 73,57 mg/dL - **Figura 5-B**. Estes resultados estão de acordo com o observado por Deckere, Kloots e Van Amelsvoort (1995) que ao tratar ratos machos Wistar com dietas formuladas com quantidades distintas de amido resistente, na forma de amido cru ou amido retrogradado, encontram redução na concentração sérica de triglicerídeos. Os autores também detectaram uma relação significativa entre a quantidade de amido resistente dietético e a concentração de triglicerídeos no soro plasmático, porém essa relação não foi encontrada para a variável CT, como relatado no presente estudo.

Carter et al. (1998), em estudo do efeito de fibras solúveis e insolúveis em ratos machos Sprague-Dawley, durante 24 semanas, não encontraram alterações significativas na concentração sérica de TG. Denardin (2008) detectou elevação de conteúdos de CT e TG em ratos alimentados com grãos de variedades de arroz com alto e médio teor de amilopectina, comparativamente a dietas com alto teor de amilose. Adicionalmente, foi observado que os teores de HDL-C não foram afetados pelas dietas. Hunninghake et al. (1994) avaliaram o efeito da ingestão de suplementação de fibras em homens e mulheres (18 e 70 anos), hipercolesterolêmicos moderados, durante 15 semanas, e encontraram redução de valores de CT e LDL-C, ainda que a suplementação da dieta com fibras não alterou significativamente os conteúdos de TG.

Nesse contexto, sugere-se que o amido resistente das dietas Fr e FrH possivelmente influenciou significativamente na redução da concentração dos triglicerídeos plasmáticos, ainda que o tratamento H tenha apresentado um valor médio menor que Fr, porém não significativo.

Os resultados da concentração plasmática de glicose são mostrados na **Figura 7**. O tratamento H apresentou um resultado esperado, pois conforme demonstrado na **Tabela 2**, apresenta o menor teor de amido total nas dietas (89,31%). Estatisticamente, apenas o tratamento C (180,83 mg/dL) diferiu estatisticamente em relação a Fr (155,67 mg/dL) e H (150,0 mg/dL).

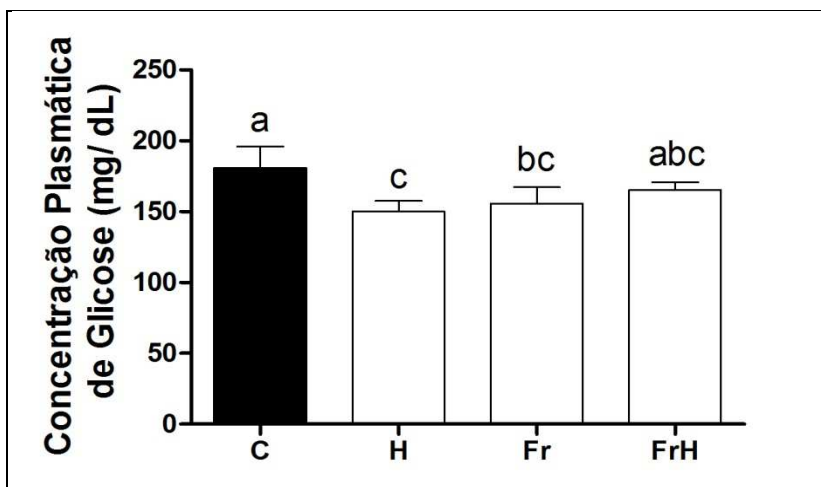


FIGURA 7 – Concentração plasmática de glicose (mg/ dL) conforme o tratamento (**C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-Hiperlipídico) administrado a ratos machos Wistar. Colunas e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ desvio padrão ($n = 6$ a 7), enquanto letras distintas denotam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (ANOVA, seguido do teste *post hoc* Tukey - $P < 0,05$).

Conforme a **Tabela 2**, Fr e C são os tratamentos com maiores teores de amido, 105,98% e 100% (m/m), respectivamente. No entanto, Fr apresentou uma menor concentração plasmática que FrH (165,0 mg/dL) que contém 95,29% do valor total de amido (m/m). Estes resultados demonstram que apesar da composição amídica reduzida e um maior teor de fibras (5%) de C em relação a FrH, o incremento de fibras deste tratamento não se mostrou suficiente para manter níveis plasmáticos menores, o que contrasta com o tratamento Fr (superior teor de amido e inferior conteúdo de fibras e amido resistente). Tal fato demonstra que as dietas com farinha de mandioca com menores teores de fibras apresentaram efeito semelhante ou ainda superior em relação às aquelas com altos teores. Adicionalmente, ressalta-se que o tipo e a fonte de fibras e amido resistente utilizados nas formulações podem causar efeito relevante na redução plasmática de glicose.

No entanto, segundo a revisão de Nugent (2005), o amido resistente pode conferir benefícios consideráveis à saúde do cólon humano, mas parece ter um impacto menor sobre marcadores do metabolismo lipídico e glicêmico. Porém, o autor aponta a necessidade de mais estudos para elucidar o efeito e os mecanismos de ação do amido resistente sobre o metabolismo lipídico e glicêmico, principalmente em seres humanos.

De acordo com Carter et al. (1998), o consumo de fibras não fermentáveis, como celulose (5% e 10%, m/m) e lignina (5 e 10%, m/m) por machos Sprague-Dawley, não afetou a concentração sérica de glicose, enquanto altos níveis de fibras solúveis, como pectina e goma de guar (5 e 10%, m/m) reduziram a concentração plasmática de glicose e o consumo de energia. Esses resultados vão de encontro ao sugerido

por Nugent (2005), haja vista que o amido resistente é considerado um tipo de fibra solúvel. Portanto, a influência deste componente no presente estudo é uma hipótese relevante.

Outra hipótese para explicar os resultados do presente trabalho baseia-se na relação de conteúdos de amilose/amilpectina, em concordância com o descrito por Dernadin (2008), aonde a concentração plasmática de glicose em jejum dos animais foi inferior nos tratamentos com menor teor de amilose.

4.4 Tecidos adiposos periepididimal e retroperitoneal

As diferentes dietas não influenciaram significativamente o volume de tecido adiposo periepididimal, contudo o tratamento Fr foi eficiente na redução da gordura retroperitoneal (**Figura 8**). Apesar dessa redução observada no tratamento Fr (3,60 g) confirmar a hipótese de propriedades funcionais da farinha de mandioca sobre a redução do volume de tecido adiposo (**Figura 8**), o tratamento FrH apresentou resultados não esperados (7,68 g), com valores médios de gordura retroperitoneal superiores aos tratamentos H (6,44 g) e C (5,82 g).

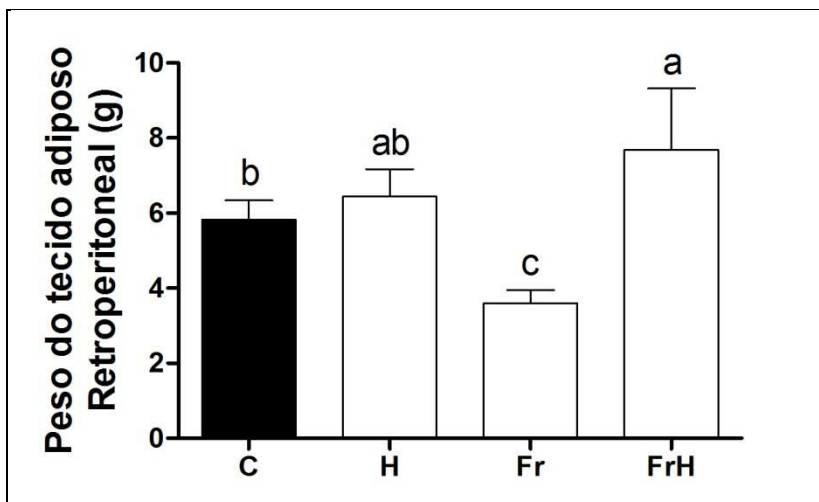


FIGURA 8 – Peso do tecido adiposo retroperitoneal (g) de ratos machos Wistar, consoante às dietas em estudo (**C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-Hiperlipídico). Os resultados foram expressos em gramas do tecido adiposo retroperitoneal. Colunas e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ desvio padrão ($n=6$), e letras distintas denotam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (ANOVA, seguido do teste *post hoc* Tukey - $P<0,05$). O teste estatístico foi realizado sobre dados logaritmicamente transformados.

Deckere, Kloots e Van Amelsvoort (1995) ao investigarem a intervenção de dietas compostas por amido resistente observaram uma redução na absorção de energia que afetou o volume do tecido adiposo epididimal e encontraram uma correlação positiva significativa entre a concentração de colesterol sérico e o aumento da gordura epididimal. Segundo estes autores, essa correlação baseia-se no fato de que o volume adiposo afeta a concentração plasmática de ácidos graxos livres. Alguns desses ácidos graxos são incorporados aos TG das lipoproteínas de VLDL. Portanto, dietas com altos teores de amido resistente podem

contribuir à redução do volume de tecido adiposo, da concentração de ácidos graxos livres e, como resultante, da síntese de TG hepática e de VLDL. Essa diminuição na síntese de triglicerídeos também acarreta uma menor concentração sérica de triglicerídeos, demonstrando que a redução do volume de tecido adiposo pelo amido resistente pode contribuir tanto na redução sérica de colesterol como de triglicerídeos.

De fato, outros estudos confirmam esses resultados alegando que a ingestão de amido resistente, como um componente funcional do alimento, estimula a produção de hormônios intestinais eficazes na redução da ingestão de energia, sendo esta uma intervenção natural e eficaz no tratamento da obesidade (KEENAN et al., 2006). Tal assertiva auxilia na explicação da redução da gordura retroperitoneal observada com o tratamento Fr.

A **Figura 9** demonstra o depósito de gordura retroperitoneal dos animais em estudo, revelando claramente o efeito do tratamento Fr sobre a redução do volume da gordura.

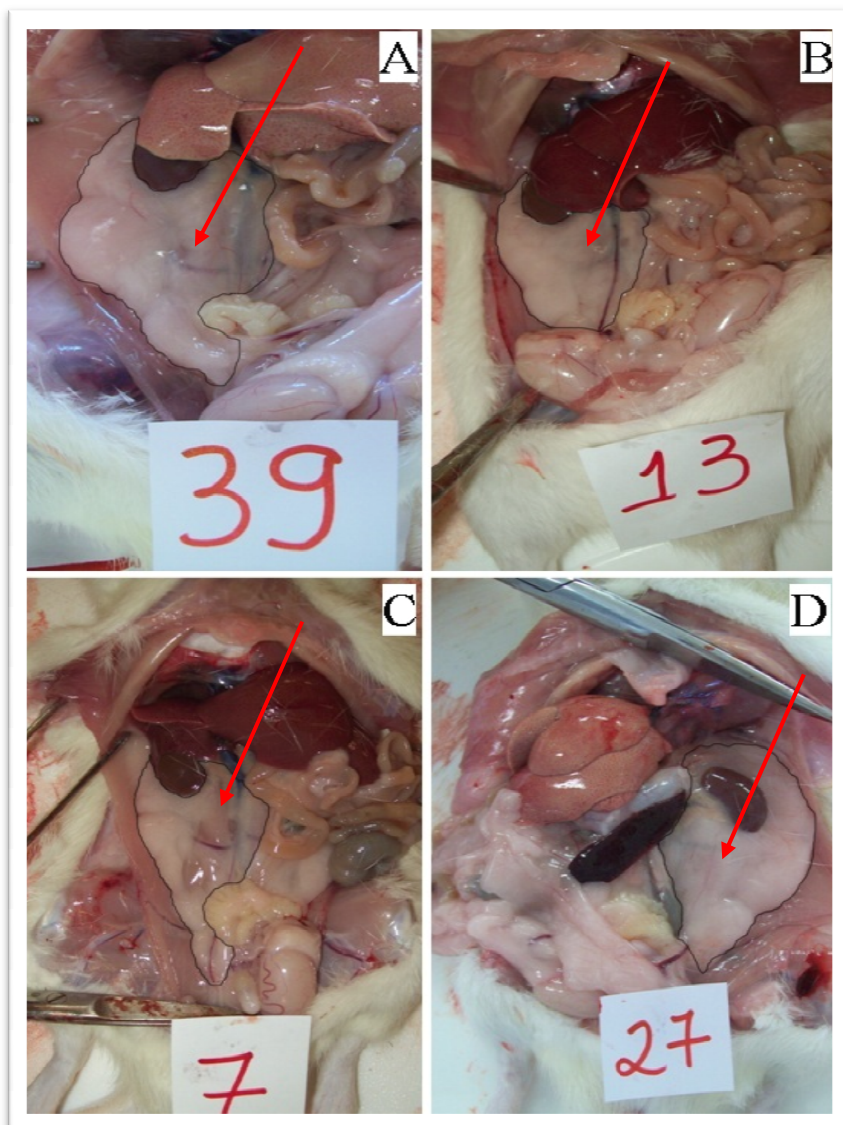


FIGURA 9 – Detalhe do depósito de gordura retroperitoneal (indicado pelas setas) de ratos machos Wistar, conforme o tratamento administrado. **A** – Hiperlipídico (H), **B** – Controle (C), **C** – Farinha (Fr), **D** – Farinha-Hiperlipídico (FrH).

4.5 Parâmetros hepáticos

4.5.1 Colesterol e triglicerídeos

Ao contrário do esperado, o tratamento Fr não apresentou uma redução significativa de conteúdo de colesterol hepático (8.77 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteínas) quando comparado ao tratamento C (8.55 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteínas). De forma similar, a elevação do conteúdo de colesterol do tratamento FrH (27.67 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteínas) não diferiu do observado para o H (25.13 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteínas – **Figura. 10-A**).

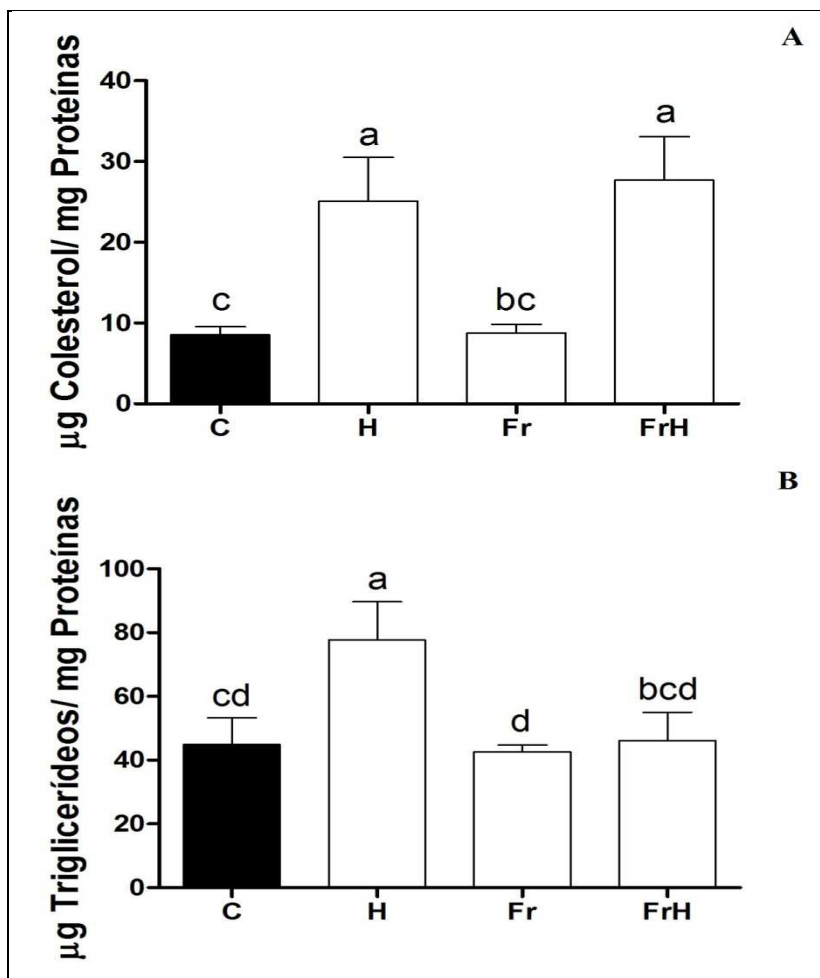


FIGURA 10 – Conteúdos (µg/mg proteínas homogenato hepático) de colesterol total (**A**) e triglicerídeos (**B**) hepáticos de ratos machos Wistar, segundo as dietas em estudo (**C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-Hiperlipídico). Colunas e barras verticais representam, respectivamente, a média ± desvio padrão (n = 6 a 8) e letras distintas denotam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (ANOVA, seguido do teste *post hoc* Tukey - $P < 0,05$). O teste estatístico para a variável colesterol foi realizado sobre dados logaritmicamente transformados.

Esses resultados corroboram o observado por Vanhoof e Schrijver (1998) ao observarem que dietas com 6% de amido resistente de milho (com alto teor de amilose ou alto teor de amilose retrogradada) reduziram a concentração hepática de colesterol esterificado e total em 24 e 22%, respectivamente. No entanto, quando estas dietas foram adicionadas de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol houve uma elevação significativa do conteúdo de colesterol total hepático.

Na formulação das rações dos tratamentos Fr e FrH houve a substituição total da composição em fibras (celulose) e parcial da fração amídica (milho), de acordo com a dieta padrão recomendada pelo *American Institute of Nutrition* (AIN-93G), por farinha de mandioca, de modo que os resultados observados podem advir do efeito de alteração do teor de fibras, de amido resistente ou da relação amilose/amilopectina do genótipo escolhido. Adicionalmente, não é descartado o efeito interativo daquelas variáveis sobre os fenótipos bioquímicos encontrados.

Com relação ao amido resistente, este geralmente pode ter seu efeito sobre as variáveis bioquímicas em estudo mascarado pelas fibras, que são em geral adicionadas em níveis mais elevados que o primeiro (VANHOOF; SCHRIJVER, 1998). Ainda, segundo aqueles autores, em seres humanos o consumo de amido resistente aliado a uma dieta pobre em fibras pode levar a uma sobreposição importante de efeitos, de modo que a ingestão de amido resistente pode influenciar positivamente o metabolismo do colesterol, apesar do baixo consumo de fibras dietéticas. Por sua vez, Haralampu (1999) alega que o amido resistente influencia nos resultados de ensaios de fibra dietética total, justificando que ensaios nutricionais demonstram que o amido resistente se comporta

fisiologicamente como as fibras. De fato, o amido resistente foi reconhecido em 2005 como fonte de fibras, sendo classificado como um componente da fração de fibras pela *American Association of Cereal Chemists* e pelo *Food Nutrition Board of the Institute of Medicine of the National Academies* (NUGENT, 2005). O amido resistente sofre fermentação parcial ou completa no cólon e possui efeitos biológicos a saúde humana similares às fibras tradicionais (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010). Devido às similaridades dos efeitos biológicos entre amido resistente e fibras, e considerando o desenho experimental das dietas Fr e FrH adotado no presente estudo, os resultados encontrados não podem ser atribuídos em separado, a uma ou outra.

As dietas fornecidas aos animais também influenciaram o conteúdo de TG hepáticos, conforme demonstrado **Figura 10-B**. Semelhante aos resultados observados para o CT hepático, os tratamentos C (44,84 µg/mg proteínas) e Fr (42,54 µg/ mg proteínas) apresentaram níveis reduzidos de TG hepáticos. No entanto, FrH (46,14 µg/ mg proteínas), distintamente do observado para a concentração de CT, também induziu a redução de TG hepáticos. Estes grupos de tratamentos distinguiram-se estatisticamente do H (77,70 µg/mg proteínas). Em seu conjunto, estes resultados demonstram que a farinha de mandioca, mesmo nos animais hipercolesterolêmicos, conseguiu reduzir os níveis de TG hepáticos, o que pode ser considerado um resultado relevante, diante do quadro de doenças crônicas derivadas da hipertrigliceridemia.

Esses resultados são contrários aos obtidos por Kritchevsky e Tepper (2005) aonde ratos machos Sprague-Dawley alimentados com dietas com 10% de um complexo de fibras dietéticas patenteada (farelo

de aveia, pectina cítrica, goma de guar, celulose, polpas de maçã, de arroz e de ameixa, goma de alfarroba, fibra de palma e fruto-oligossacarídeos) apresentaram redução de CT hepático e aumento não significativo dos TG hepáticos, comparativamente à dieta contendo 10% de celulose. Ao investigar o efeito de dietas a base de amido resistente (20%, m/m) e goma de guar (8%, m/m), Levrat et al. (1996) concluíram que aqueles polissacarídeos fermentáveis são eficazes na redução de colesterol esterificado e TG hepáticos em ratos. A goma de guar evidenciou efeito superior ao amido resistente, reduzindo também o colesterol livre. Estes resultados demonstram que diversas fontes de fibras e seus teores nas dietas podem influenciar de maneiras distintas o metabolismo lipídico hepático.

Anderson e Chen (1979) propõem alguns mecanismos para explicar as alterações hepáticas causadas pelas fibras. Os autores sugerem que as fibras induzem alterações nas taxas de fornecimento de ácidos graxos à veia porta hepática e que podem alterar o tamanho ou a composição de VLDL que é formado e liberado a partir do fígado.

4.5.2 Peso do fígado

O peso do fígado foi afetado pelas diferentes dietas, conforme pode ser observado na **Figura 11** que demonstra diferenças significativas entre o tratamento FrH e H quando comparados ao tratamento Fr, e quando comparado ao C apenas o tratamento FrH foi significativo.

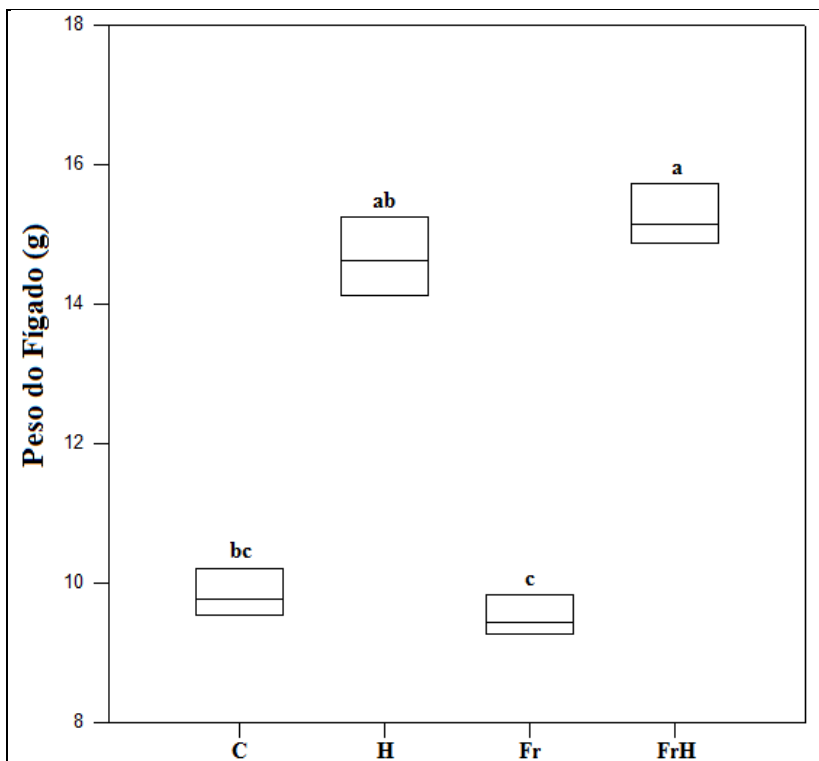


FIGURA 11 – Peso do fígado (g) de ratos machos Wistar segundo a dieta tratamento em estudo, por exemplo, **C** = Controle, **H** = Hiperlipídico, **Fr** = Farinha e **FrH** = Farinha-Hiperlipídico. As linhas horizontais em cada caixa indicam os valores de mediana dos dados (interquartis: mínimo 25% – 75% máximo – n= 6) e letras distintas denotam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (ANOVA *on ranks*, seguido do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e do teste complementar de Dunn's - $P < 0,05$).

Esses resultados são semelhantes ao observado por Drzikova, Dongowski e Gebhardt (2005) ao investigarem o efeito de dietas ricas em fibras derivadas de farinha de aveia (50%) e com 13% de amido de trigo (substituição parcial de amido) em relação à farinha de aveia

extrusada contendo amido resistente comercial (80: 20, m/m) ou farelo de aveia em ratos jovens e machos Wistar.

Adicionalmente, foi possível notar que as dietas hiperlipídicas, isto é, contendo 10% de gordura de coco e 1% de colesterol (H = 14,63 g e FrH = 15,15 g), apresentaram valores de peso hepático superiores aos tratamentos Fr (9,43 g) e C (9,78 g), os quais continham o percentual de gordura de 7%, recomendado pelo *American Institute of Nutrition* (AIN) - AIN 93G. Por fim, além do aumento do tamanho do órgão, a coloração do fígado dos animais tratados com dietas hiperlipídicas mostrou-se esbranquiçada e pálida (**Figura 12**), evidenciando um sintoma semelhante à síndrome metabólica esteatose hepática.

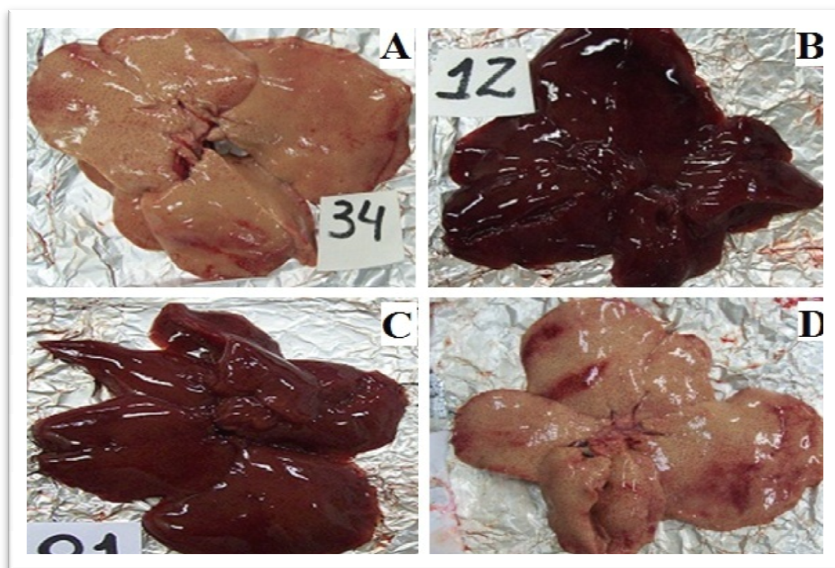


FIGURA 12 – Detalhes do tamanho e da coloração amarelada dos fígados gordurosos, possivelmente esteatóticos (**A** – Hiperlipídico (H) e **D** – Farinha-hiperlipídico (FrH), e de fígados com tamanho e aspectos normais (**B** – Controle (C) e **C** – Farinha (Fr).

No presente trabalho, nos tratamentos FrH e H foram utilizadas concentrações altas de gordura para induzir a hipercolesterolemia nos animais. Contudo, segundo Dabai et al. (1996), a adição de 1% de colesterol e 0,1% de ácido cólico (m/m) à dieta de ratos pode, por si só, causar patologias hepáticas.

A esteatose hepática é uma doença gordurosa não-alcoólica do fígado (DGNA) (ZIVKOVIC; GERMAN; SANYAL, 2007) e representa o acúmulo excessivo de lipídios, principalmente TG, no citoplasma dos hepatócitos (MATHERLY; PURI, 2012). Segundo aqueles autores, estudos recentes apontam que não apenas o acúmulo de TG contribui ao fenótipo da doença, mas também vários outros lipídios biologicamente ativos. O fígado não é o órgão de armazenamento de gordura nos mamíferos, no entanto, um desequilíbrio entre a energia absorvida e a quantidade utilizada pode culminar na deposição de TG neste órgão, por exemplo.

O metabolismo de um organismo é afetado diretamente pela dieta e sua regulação, através de fatores de transcrição e hormônios, por exemplo, desempenha um papel chave no desencadeamento e progressão da DGNA (ZIVKOVIC; GERMAN; SANYAL, 2007). O fígado é um órgão metabolicamente bastante ativo e que mantém a sua homeostase metabólica na maior parte das circunstâncias. No entanto, algumas perturbações metabólicas derivadas de uma dieta rica em gordura e da obesidade, por exemplo, podem conduzir à esteatose hepática (NAGY, 2010).

Há uma forte correlação positiva entre DGNA e a obesidade, resistência à insulina e diabetes do tipo II, como pode ser observada no esquema ilustrativo da **Figura 13**. Entre as diversas vias metabólicas

que conduzem ao desenvolvimento da esteatose hepática, estão a liberação de ácidos graxos não-esterificados do tecido adiposo (lipólise) que aumenta a síntese *de novo* de ácido graxos (lipogênese) e reduz a β -oxidação destes (POSTIC; GIRARD, 2008). Segundo Nagy (2010), a resistência à insulina contribui para a regulação inadequada da lipólise, resultando no aumento da formação de adipócitos, o que colabora à elevação de ácidos graxos livres na circulação. Além disso, o aumento de citocinas inflamatórias, produção de quimiocinas e de macrófagos caracteriza a inflamação do tecido adiposo que afeta a atividade metabólica do fígado. Por fim, há uma redução de adiponectina que contribui à resistência da insulina hepática.

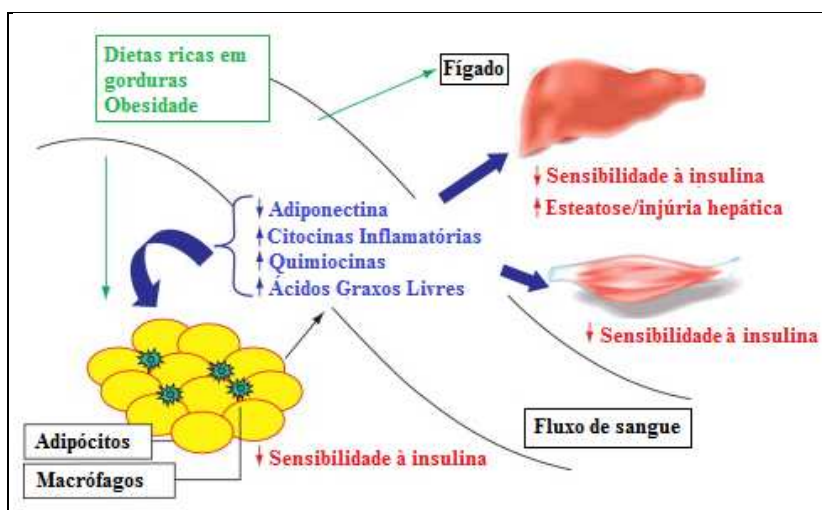


FIGURA 13 – Esquema ilustrativo da interação entre o consumo de dietas hiperlipídicas que resultam no aumento do tecido adiposo e consequentemente distúrbios metabólicos que conduzem à esteatose hepática (adaptado de NAGY, 2010).

4.6 Análises de fezes úmidas e secas

As dietas fornecidas aos animais afetaram o peso da excreção de fezes úmidas e secas como pode ser observado na **Figura 14**. O tratamento Fr induziu uma redução estatisticamente significativa e bastante pronunciada ($Fr = 1,41/1,30$ g) no peso das fezes úmidas e secas, respectivamente, quando comparado aos demais tratamentos ($C = 4,45/4,25$ g, $FrH = 4,82/3,23$ g, $H = 7,27/ 6,28$ g).

Como se pode observar na **Figura 14**, comparativamente ao C, o tratamento FrH diferiu estatisticamente nos valores de peso de fezes úmidas e secas. O menor peso fecal no tratamento Fr era esperado, levando-se em conta apenas o conteúdo de fibras, isto é, Fr - 0,27%, em relação aos H e C (5% de fibra de celulose microfina). Esses resultados são contrastantes com os encontrados por Denardin (2008) que não detectou diferenças significativas no peso de fezes úmidas e secas de ratos, ao investigar o efeito de dietas formuladas com grãos de arroz com proporções de amilose/amilopectina distintas.

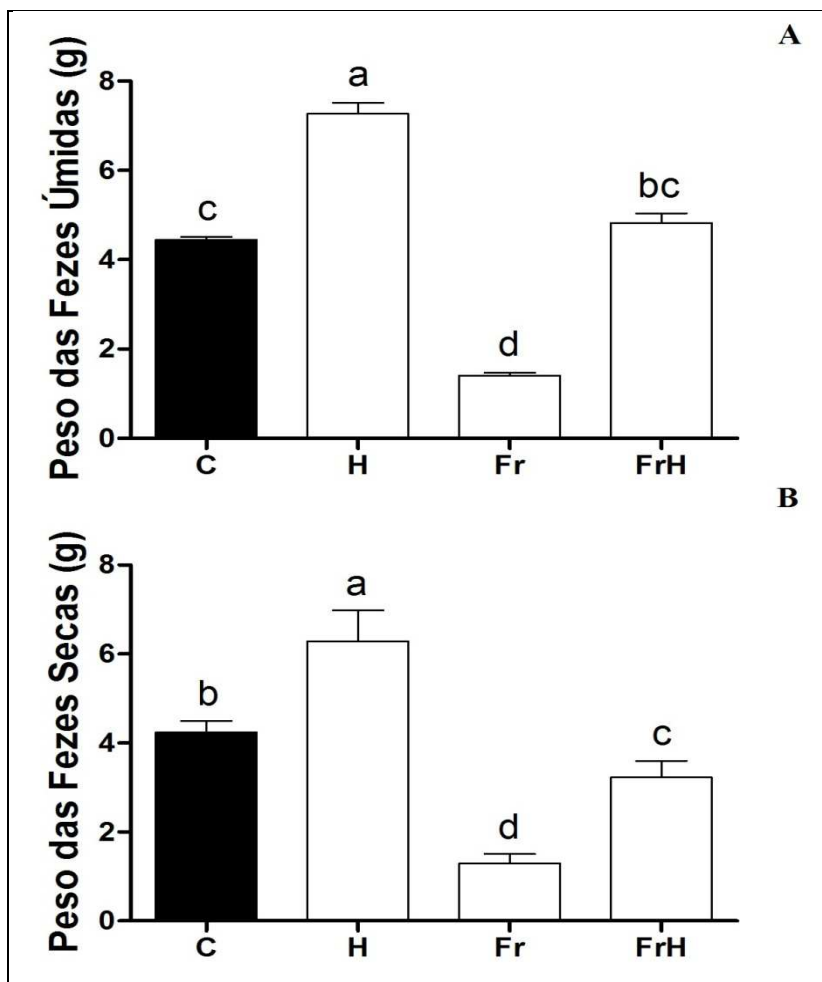


FIGURA 14 – Peso de fezes (g) úmidas (**A**) e secas (**B**) de ratos machos Wistar, consoante ao tratamento (**C** = controle, **H** = hiperlipídico, **Fr** = farinha e **FrH** = farinha-hiperlipídico) na quantificação do peso de fezes úmidas e secas dos animais. Colunas e barras verticais representam, respectivamente, a média $\pm$ desvio padrão ($n = 6$ a 10) e letras distintas denotam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (ANOVA, seguido do teste *post hoc* Tukey - $P < 0,05$). O teste estatístico para a variável peso das fezes úmidas foi realizado sobre dados logaritmicamente transformados.

Sabe-se que as propriedades físico-químicas e biológicas das fibras na alimentação exercem importantes funções metabólicas à saúde, implicando em ações fisiológicas no intestino delgado e grosso, como propriedades de adsorção e ligação a compostos, fermentação e viscosidade, entre outros. Essas propriedades são relevantes, pois retardam a digestão e a absorção de carboidratos e lipídios. Como as fibras não são digeríveis no intestino delgado ocorre a formação de uma massa de carboidratos que alcança o intestino grosso aonde são digeridos pela microbiota, resultando em aumentos na massa microbiana e produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCHNEEMAN, 1999), composta por cerca de 80% de água que pode compor uma porcentagem expressiva no volume fecal (DENARDIN, 2008), devido à adsorção daquele nutriente pelas fibras (HARRIS; FERGUSON, 1993), justificando o maior peso fecal no C comparativamente à Fr.

Em geral, a ingestão de fibras dietéticas aumenta o volume fecal, o que era esperado para o tratamento C. Embora H e FrH também tenham apresentado elevados volumes fecais, a explicação desses resultados é distinta. Os tratamentos H e FrH, possivelmente elevaram o teor de seus pesos fecais devido ao excesso de gordura saturada em suas formulações. Durante o experimento, praticamente todos os animais, em maior ou menor grau, apresentaram eventos de fezes diarreicas e, portanto, a água representava uma porcentagem significativa do volume fecal. Os volumes de peso fecal úmido, por exemplo, em FrH e H na primeira semana, foram de 5,42 g e 7,80 g respectivamente, reduzindo a 3,74 g e 6,09 g na última semana. Ao longo deste período, a redução de diarreia e uma maior adaptação dos animais à dieta administrada foi

observada, principalmente nas últimas duas semanas. Tal fato explica a elevação do peso de fezes úmidas nos tratamentos hiperlipídicos.

Winocour et al. (1987) também observou diarreia frequente em animais que consumiram dietas contendo colesterol e ácido cólico, porém, diferentemente dos resultados aqui mostrados, estes não apresentaram ganho de peso na mesma proporção que os demais ratos tratados com alimentos dietéticos. Segundo a literatura, o excesso de lipídios na dieta pode causar diarreia (MOCHIZUKI, et al., 1984) e, conforme Brinson e Pitts (1989), há vários mecanismos que explicam a indução de diarreias através de dietas hiperlipídicas como, por exemplo, a esteatorreia. Os ácidos graxos hidroxilados são tóxicos à mucosa intestinal e podem causar hipersecreção e diarreia hidro-eletrolítica. Dessa forma a ação de alguns ácidos graxos, como o linoleico e o araquidônico, estimula a síntese de prostaglandinas, e estas, por sua vez, modificam a secreção e a mobilidade hidro-eletrolítica do trato intestinal.

Outro aspecto notado durante o experimento e que pode ser visualizado na **Figura 15** é a coloração distinta nas fezes, isto é, mais escura para os tratamentos Fr e FrH. Este fato pode ser atribuído, possivelmente, a características distintas de composição da farinha de mandioca em relação à outra fonte de fibras (celulose microfina) e amido (milho) utilizada nos C e H.



FIGURA 15 – Detalhe da coloração das fezes de ratos machos Wistar dos grupos experimentais em estudo. **A** – Hiperlipídico (H), **B** – Controle (C), **C** – Fr (Farinha) e **D** – FrH (Farinha-Hiperlipídico).

As respostas fisiológicas desencadeadas pelo consumo do amido resistente são influenciadas pelo tipo e dose deste, bem como se este polissacarídeo foi utilizado como um alimento individual ou incluído em refeição completa, além das condições de cozimento usadas (NUGENT, 2005).

A maioria dos estudos descritos na literatura relata uma redução significativa de lipídios séricos, colesterol, triglicerídeos hepáticos e tecidos adiposos, quando do consumo elevado de fibras e/ou amido resistente. No presente trabalho houve a preocupação em formular as rações mantendo as substituições isonutritivas, de acordo

com os padrões de recomendação do *American Institute of Nutrition* (AIN 93G), porque é sabido que teores excessivos de fibras podem acarretar a perda de minerais (Mod et al., 1985).

5. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que a farinha de mandioca do genótipo Torta da Penha possui potenciais efeitos benéficos à saúde humana. Os efeitos da ingestão da farinha pelos ratos são relevantes por estarem diretamente ligados a dislipidemias e a uma série de doenças crônicas, como a aterosclerose e doenças cardiovasculares.

Além disso, o presente estudo buscou adequar realisticamente à dieta humana as quantidades de farinha de mandioca testadas, quando da formulação das dietas aos animais. Isto porque, em geral, as pesquisas em modelos animais utilizam teores de fibras e de amido resistentes nas rações muito superiores ao recomendado a uma possível extrapolação dos resultados para seres humanos. Outro resultado de interesse refere-se à constatação de que uma dieta contendo 12,5% (m/m) de farinha de mandioca, com pequenas quantidades de fibras e amido resistente em relação a uma série de outros estudos e ao controle negativo, apresentou resultados semelhantes ou superiores de redução da gordura retroperitoneal, resposta glicêmica pós-prandial e de TG e CT hepáticos e plasmáticos, sugerindo o potencial como alimento funcional daquela biomassa diante de fontes de fibras dietéticas importantes à saúde humana e consolidadas na literatura.

Nesse contexto, diante do hábito comum de consumo de farinha de mandioca da população brasileira esse produto aparece como uma fonte alternativa de fibras à intervenção nutricional profilática e terapêutica nas dislipidemias. Embora esta seja uma espécie nativa, ainda pouco se sabe e poucos resultados na literatura são encontrados

com relação aos efeitos desta biomassa sobre a lipemia e glicemia, por exemplo, tanto em modelos animais como em seres humanos.

Haja vista a escassez de informações relacionada à espécie como fonte de produtos naturais de interesse à saúde humana, as informações presentes são consideradas relevantes e preenchem uma lacuna que poderá servir de base inclusive para investigar os efeitos da farinha de mandioca em seres humanos.

Além do contexto profilático e terapêutico à saúde humana que a farinha estudada pode proporcionar, menciona-se o componente sócio-econômico do sistema produtivo de *M. esculenta*, maiormente representado por agricultores familiares que a cultivam, processam e dela dependem para seu sustento e da pequena propriedade agrícola, típica de Santa Catarina. Neste contexto, assume-se que este trabalho gera subsídios à eventual agregação de valor aos produtos de *M. esculenta*, um aspecto importante como contribuição à reversão do quadro de baixo retorno econômico associado ao cultivo daquela espécie, e ao estímulo ao setor produtivo afim.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA-. Resolução - nº 18 de 30 de abril de 1999 – **Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para a análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**; Diário Oficial da União, 03 de maio de 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA-. Resolução - nº 19 de 30 de abril de 1999 – **Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde em sua rotulagem**; Diário Oficial da União, 03 de maio de 1999.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION – ADA. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, p. 1716-1731, 2008.

ANDERSON, J. W.; CHEN, W-J. L. Plant fiber. Carbohydrate and lipid metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, p. 346-363, feb. 1979.

BALLARD, F. J. Supply and utilization of acetate in mammals. **The America Journal of Clinical Nutrition**, v. 25, p. 773-779, aug. 1972.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911 – 917, 1959.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde recebe sugestões para plano nacional contra doenças crônicas não transmissíveis**. Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=ds pDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=13203>. Acesso em: 10 novembro 2011.

BRINSON, R. R.; PITTS, W. M. Diarrhea and the burn patient: is lipid in enteral formulas really deleterious? **Journal of Parental and Enteral Nutrition**, v. 13, n. 2, p. 221-222, 1989.

BRUNSGAARD, G.; KNUDSEN, K. E. B.; EGGUM B. O. The influence of the period of adaptation on the digestibility of diets containing different types of indigestible polysaccharides in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 74, p. 833-848, 1995.

CARTER, J. W.; HARDMAN, W. E.; HEITMAN, D. W.; CAMERON, I. L. Type and amount of individual dietary fibers on: serum lipid profiles, serum glucose concentration and energy intake in rats. **Nutrition Research**, v. 18, n. 10, p. 1743-1756, 1998.

CHARLES, A. L.; SRIROTH, K.; HUANG T. Proximate composition, mineral contents, hydrogen cyanide and phytic acid of 5 cassava genotypes. **Food Chemistry**, v. 92, p. 615-620, 2005.

DABAI, F. D.; WALKER, A. F.; SAMBROOK, I. E.; WELCH, V. A.; OWEN, R. W.; ABEYASEKERA, S. Comparative effects on blood lipids and faecal steroids of five legume species incorporated into a semi-purified, hypercholesterolaemic rat diet. **British Journal of Nutrition**, v. 75, p. 557–571, 1996

DECKERE, E. A. M. de; KLOOTS, W. J.; VAN AMELSVOORT, J. M. M. Both raw and retrograded starch decrease serum triacylglycerol concentration and fat accretion in the rat. **British Journal of Nutrition**, v. 73, p. 287-298, 1995.

DENARDIN, C. C. **Influência do teor de amilose e beneficiamento do arroz na resposta biológica de ratos**. 2008. 162 f.. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008.

DRZIKOVA, B.; DONGOWSKI, G.; GEBHARDT, E. Dietary fibre-rich oat-based products affect serum lipids, microbiota, formation of short-chain fatty acids and steroids in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p. 1012–1025, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. EMBRAPA mandioca e fruticultura. **Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: Processamento da mandioca**. Brasília (Série Agronegócios), 2003. 115 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. EMBRAPA mandioca e fruticultura. **Aspectos**

socioeconômicos e agronômicos da mandioca. Cruz das Almas, 2006. 817 p.

FUENTES-ZARAGOZA, E.; RIQUELME-NAVARRETE, M. J.; SÁNCHEZ-ZAPATA, E.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Resistant starch as functional ingredient: A review. **Food Research International**, v. 43, p. 931–942, 2010.

GREEN, C. J. Fibre in enteral nutrition. **Clinical Nutrition**, v. 20 (Supplement 1), p. 23-39, 2001.

HARALAMPU, S. G. Resistant starch—a review of the physical properties and biological impact of RS₃. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 285–292, 2000.

HARRIS, P. J.; FERGUSON, L. R. Dietary fibre: its composition and role in protection against colorectal cancer. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 290, p. 97-110, nov. 1993.

HUNNINGHAKE, D. B.; MILLER, V. T.; LAROSA, J. C.; KINOSIAN, B.; BROWN, V.; HOWARD, WM. J.; DISERIO, F. J.; O’CONNOR, R. R. Hypocholesterolemic effects of a dietary fiber supplement. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 1050-1054, 1994.

KEENAN, M. J.; ZHOU, J.; MCCUTCHEON, K. L.; RAGGIO, A. M.; BATEMAN, H. G.; TODD, E.; JONES, C. K.; TULLEY, R. T.; MELTON, S.; MARTIN, R. J.; HEGSTED, M. Effects of resistant

starch, a non-digestible fermentable fiber, on reducing body fat. **Obesity**, v. 14, n. 9, p. 1523- 1534, Sep. 2006.

KRITCHEVSKYT, D.; TEPPER, S. A. Influence of a fiber mixture on serum and liver lipids and on fecal fat excretion in rats. **Nutrition Research**, n. 25, p. 485–489, 2005.

LEHMANN, U.; ROBIN, F. Slowly digestible starch - its structure and health implications: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 346-355, 2007.

LEVRAT, M-A.; MOUNDRAS, C.; YOUNES, H.; MORAND, C.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Effectiveness of resistant starch, compared to guar gum, in depressing plasma cholesterol and enhancing fecal steroid excretion. **Lipids**, n. 31, p. 1069-1075, 1996.

MALUF, R. S. Mercados agroalimentares e a agricultura familiar no Brasil: agregação de valor, cadeias integradas e circuitos regionais. **Ensaio FEE**, v. 25, p. 299-322, 2004.

MARLETT, J. A.; SLAVIN, J. L. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 97, n. 10, p. 1157(3), oct 1997.

MATHERLY, S. C.; PURI, P. Mechanisms of simple hepatic steatosis: not so simple after all. **Clinics in Liver Disease**, v. 16, n. 3, p. 505–524, Aug. 2012.

MCINTYRE, A.; GIBSON, P. R.; YOUNG, G. P. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. **Gut**, v. 34, p. 386-391, 1993.

MOCHIZUKI, H.; TROCKI, O.; DOMINIONI, L.; RAY, M. B.; ALEXANDER, J. W. Optimal lipid content for enteral diets following thermal injury. **Journal of Parental and Enteral Nutrition**, v. 8, n. 6, p. 638-646, nov./dec. 1984.

MOD, R. R.; ORY, R. L.; MORRIS, N. M.; NORMAND, F. L.; SAUNDERS, R. M.; GUMBMANN, M. R. Effect of Rice hemicellulose and microcrystalline α -cellulose on selected minerals in the blood and feces of rats. **Journal of Cereal Science**, v. 3, p. 87-93, 1985.

MORAIS, M. B.; FESTE, A.; MILLER, R. G.; LIFSCHITZ, C. H. Effect of resistant and digestible starch on intestinal absorption of calcium, iron, and zinc in infant pigs. **Pediatric Research**, v. 39, p. 872-876, 1996.

NAGY, L.E. Mechanisms of hepatic steatosis. **Comprehensive Toxicology**, v. 9: Hepatic Toxicology, p. 251-261, 2010.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE. **Clinical guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults**. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, 1998.

NIJJAR, P. S.; BURKE, F. M.; BLOESCH, A.; RADER, D. J. Role of dietary supplements in lowering low-density lipoprotein cholesterol: A review. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 4, p. 248–258, 2010.

NUGENT, A. P. Health properties of resistant starch. **British Nutrition Foundation**, Nutrition Bulletin, London -UK, v. 30, P. 27–54, 2005.

POSTIC, C.; GIRARD, J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. **Diabetes & Metabolism**, v. 34, p. 643-648, 2008.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN – 93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN – 76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 22, p. 1.939 – 1.951, 1993.

RIBEIRO, K. C.; SHINTAKU, R. C. O. Influência dos lipídios da dieta sobre a aterosclerose. **Conscientiae Saúde**, v. 3, p. 73-83, 2004.

RUSSELL, J. C.; PROCTOR, S. D. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. **Cardiovascular Pathology**, v. 15, p. 318-330, 2006.

SCHNEEMAN, B. O. Fiber, Inulin and oligofructose: similarities and differences. **The Journal of Nutrition**, v, 129, p. 1424S-1427S, 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA - SBC. IV Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e prevenção de aterosclerose.

Departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia.

Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 88, p. 3-19, 2007.

SPILLER, R. C. Pharmacology of dietary fibre. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, p. 407-427, 1994.

TAPER, L. J., MILAM, R. S.; MCCALLISTER, M. S.; BOWEN, P. E.; THYE, F. W. Mineral retention in young men consuming soy-fiber-augmented liquid-formula diets. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 48, p. 305-311, 1988.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Annals of Clinical Biochemistry, v. 6, p. 24-27, 1969.

VANHOOFF, K.; SCHRIJVER, R. de. The influence of enzyme-resistant starch on cholesterol metabolism in rats fed on a conventional diet. **British Journal of Nutrition** v. 80, p. 193-198, 1998.

WANG, Y.; FUNK M. A.; GARLEB, K. A.; CHEVREAU, N. The effect of fiber source in enteral products on fecal weight, mineral balance, and growth rate in rats. **Journal of Parenteral & Enteral Nutrition**, v. 18, n. 4, p. 340-345, 1994.

WINOCOUR, P. D.; KINLOUGH-RATHBONE, R. L.; MORAZAIN, R.; MUSTARD, J. F. The effect of dietary saturated fat and cholesterol on platelet function, platelet survival and response to continuous aortic injury in rats. **Atherosclerosis**, v. 65, p. 37-50, 1987.

ZAKIM, D.; HERMAN, R. H. Regulation of fatty acid synthesis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 200-213, 1969.

ZIVKOVIC, A. M.; GERMAN, J B.; SANYAL, A. J. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease¹⁻³. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, p. 285-300, 2007.