

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**AMIDO RESISTENTE: METODOLOGIAS DE
QUANTIFICAÇÃO E RESPOSTA BIOLÓGICA
EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Melissa Walter

Santa Maria, RS, Brasil

2005

AMIDO RESISTENTE: METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO E RESPOSTA BIOLÓGICA EM RATOS

por

Melissa Walter

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa em Qualidade de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

Santa Maria, RS, Brasil

2005

W233a Walter, Melissa, 1980-
Amido resistente : metodologias de quantificação e resposta biológica em ratos / por Melissa Walter ; orientador Leila Picolli da Silva. – Santa Maria, 2005.
vi, 96 f . ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

1. Tecnologia de alimentos 2. Amido 3. Método da AOAC 996.11 4. Protease 5. Efeitos biológicos I. Silva, Leila Picolli da, orient. II. Título

CDU: 664.2

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**AMIDO RESISTENTE: METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO E
RESPOSTA BIOLÓGICA EM RATOS**

elaborada por
Melissa Walter

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Leila Picolli da Silva, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Leris Salete Bonfanti Haeffner, Dra. (UFSM)

Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 25 de fevereiro de 2005

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a meus pais, Nelsi e Osmar, que sempre me incentivaram e apoiaram, não só neste mestrado, mas durante toda minha vida. São pessoas a quem muito admiro, pois sempre lutaram pela família, e para que seus filhos alcançassem seus objetivos. André, meu “irmão mais velho preferido”, farmacêutico e advogado. Por sua influência, conheci o curso de Farmácia, me apaixonei pela área de alimentos, e acabei ingressando neste mestrado. Fábio, meu “irmão mais novo preferido”, que me emprestou o computador e me ajudou a resolver os problemas de informática. A eles meu muito obrigado.

Em segundo, a minha orientadora, Leila, que me adotou durante este período de mestrado. Grande amiga, ótima orientadora, grande exemplo a seguir. Sua paixão pela pesquisa contagia a todos que com ela trabalham. Ao seu lado, aprendi muitas coisas. Muito obrigado por tudo.

Não poderia deixar de agradecer ao pessoal do NIDAL. Daiana (minha “IC preferida”), Cristiane, Larissa e Marceli, que me auxiliaram em muitas análises. Aos Tropeiros do NIDAL, grandes amigos e companheiros de laboratório. E a todos os outros que, de alguma forma, me auxiliaram nesta jornada.

Minhas colegas de mestrado, Cátia, Fabiana (juntas formamos as Meninas Superpoderosas) e Fernanda. Durante esta jornada, passamos por muitas coisas e aprendemos juntas.

Ao curso e aos professores, em especial a Tatiana e o Laerte, que muito colaboraram para esclarecer dúvidas e resolver problemas que surgiram durante este período.

Aos funcionários, Beti e Lia.

A todos meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

AMIDO RESISTENTE: METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO E RESPOSTA BIOLÓGICA EM RATOS

AUTORA: MELISSA WALTER

ORIENTADORA: LEILA PICOLLI DA SILVA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de fevereiro de 2005.

Grandes modificações ocorreram nas últimas décadas no conhecimento do papel dos carboidratos na nutrição e saúde humana, principalmente em relação aos seus efeitos biológicos diferenciados, atribuídos em especial ao amido resistente. Esta fração foi descoberta recentemente, e tem sido definida como a soma do amido e produtos de sua degradação não absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis. Devido a sua importância, várias pesquisas foram desenvolvidas nos últimos anos buscando quantificar o amido resistente nos diversos alimentos, para assim melhor relacionar os níveis destes com seus efeitos benéficos. Entretanto, os dados existentes até o momento são bastante heterogêneos. Sendo assim, a presente pesquisa foi conduzida com os objetivos de otimizar a determinação do amido resistente *in vitro*, por modificação de protocolo em metodologia já existente, bem como relacionar teores crescentes desta fração na dieta com seus diferentes efeitos biológicos em ratos. A partir da metodologia 996.11 preconizada pela AOAC para determinação de amido disponível e resistente, foram avaliados a inclusão de protease no processo de hidrólise, o aumento na quantidade de amostra e a substituição do tampão MOPS por tampão fosfato, utilizando como amostras amido de milho, arroz branco, banana verde e flocos de milho. Para a avaliação dos efeitos biológicos de níveis crescentes de amido resistente na dieta, foram utilizados ratos machos Wistar, alimentados com rações experimentais suplementadas com 0%, 3%, 9% e 18% de amido resistente. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 5 dias e, durante o período experimental (15 dias), foram obtidos dados e amostras para a determinação do consumo, ganho de peso, digestibilidade aparente da matéria seca e do amido, produção de fezes úmidas e secas, umidade e pH das fezes, e excreção fecal de nitrogênio. Os resultados obtidos mostraram diferença significativa na quantificação do amido disponível e resistente em um mesmo alimento, influenciadas pela presença ou ausência de hidrólise proteolítica no método preconizado. A utilização de maior quantidade de amostra diminuiu a variação entre as replicatas, e a substituição do tampão MOPS por tampão fosfato, ao mesmo tempo que não alterou os resultados, proporcionou menor custo para a análise. Sendo assim, a recomendação resultante desta pesquisa é que seja utilizado, juntamente com o aumento na quantidade de amostra e utilização do tampão fosfato, a inclusão da protease no processo de digestão enzimática. A adição de níveis crescentes de amido resistente à dieta de ratos não afetou o consumo, mas provocou redução no ganho de peso corporal. Da mesma forma, foi verificada diminuição da digestibilidade aparente da matéria seca e do amido, e do pH fecal, aliados ao aumento na produção e umidade das fezes, e na excreção fecal de nitrogênio. Assim, pode-se inferir que o consumo de amido resistente é capaz de exercer efeitos biológicos, em especial relacionados à redução do peso, os quais tendem a ser potencializados à medida que o consumo desta fração aumenta, até o nível testado de 18%.

Palavras-chave: amido, método da AOAC 996.11, protease, efeitos biológicos

ABSTRACT

Masters Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

RESISTANT STARCH: QUANTIFICATION METHODOLOGIES AND BIOLOGICAL RESPONSE IN RATS

AUTHOR: MELISSA WALTER

ADVISER: LEILA PICOLLI DA SILVA

Date and Local of Defense: Santa Maria, 25 de fevereiro de 2005.

The understanding of the role played by carbohydrates in human nutrition and health has made great strides in the last two decades, essentially regarding their differentiated physiological effects, ascribed especially to resistant starch. This fraction was recently discovered, and has been defined as the sum of starch and products of starch degradation not absorbed in the small intestine of healthy individuals. Due to its importance, several researches have been developed in order to quantify resistant starch in different foods, to better relate its levels with the beneficial effects. However, the existing data are very heterogeneous. Therefore, the present research was conducted aiming the optimization of *in vitro* resistant starch determination, through the modification of the protocol of an existing methodology, as well as relating increasing levels of this fraction in the diet with biological effects on rats. From the AOAC method 996.11 for the quantification of digestible and resistant starch, we evaluated the inclusion of protease in the hydrolysis process, the increase in sample amount and the use of phosphate buffer pH 6.8 instead of MOPS buffer pH 7.0, using as samples cornstarch, white rice, green banana and corn flakes. To evaluate the biological effects of increasing levels of resistant starch in the diet, male Wistar rats were fed diets supplemented with 0%, 3%, 9% and 18% of resistant starch. The animals were submitted to an adaptation period of 5 days. During the experimental period (15 days), data and samples were obtained to determine feed intake, body weight gain, apparent dry matter digestibility, apparent starch digestibility, wet and dry fecal production, fecal water content and pH, and fecal nitrogen excretion. The results obtained showed significant difference in the quantification of digestible and resistant starch in the same food, influenced by the presence or absence of proteolytic hydrolysis in the method. The utilization of increased amount of sample reduced the variation between replicates, and the use of phosphate buffer instead of MOPS buffer did not alter the obtained results, but reduced the cost of the analysis. So the recommendation resulting from this research is to use, associated with the increased amount of sample and phosphate buffer, the inclusion of protease in the digestion process. The addition of increasing levels of resistant starch in the diet of rats did not affect feed intake, but caused a reduction in body weight gain. Likewise, it was observed a reduction in apparent dry matter digestibility, apparent starch digestibility and fecal pH, allied to increased fecal production and water content, and fecal nitrogen excretion. Thus, we can conclude that resistant starch is capable of exerting biological effects, specially related to body weight reduction, which tend to be enhanced with increasing levels of this fraction, up to the tested 18%.

Key words: starch, AOAC method 996.11, protease, biological effects

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. ARTIGO 1	4
AMIDO RESISTENTE: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO.....	4
3. TRABALHOS DESENVOLVIDOS.....	20
3.1. ARTIGO 2	21
AMIDO DISPONÍVEL E RESISTENTE EM ALIMENTOS: MUDANÇAS DE PROTOCOLO DO MÉTODO DA AOAC 996.11	21
3.2. ARTIGO 3 – VERSÃO ORIGINAL.....	33
EFFECT OF RESISTANT STARCH ON BIOLOGICAL RESPONSES IN RATS	33
3.3. ARTIGO 3 – VERSÃO EM PORTUGUÊS.....	47
EFEITO DO AMIDO RESISTENTE SOBRE A RESPOSTA BIOLÓGICA EM RATOS	47
4. DISCUSSÃO	62
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
7. APÊNDICE	71
8. ANEXOS	73

1. INTRODUÇÃO

Os carboidratos, em especial o amido, são normalmente explorados como fonte energética na alimentação humana. Eles podem contribuir com 40 a 80% do total de energia ingerida, dependendo do local, características culturais e condições econômicas da população.

Porém, devido a sua heterogeneidade estrutural, uma parte dos componentes que formam este grupo contribui pouco para o conteúdo energético das dietas, mas pode auxiliar na prevenção de várias doenças relacionadas à alimentação.

Nas últimas décadas, ocorreram grandes modificações no conhecimento da função dos carboidratos na nutrição e saúde humana, principalmente em relação aos seus efeitos fisiológicos diferenciados (auxílio na prevenção de doenças do sistema digestivo, redução do colesterol e controle glicêmico, entre outros), atribuídos em especial ao amido resistente.

Esta fração foi descoberta recentemente e tem sido definida como a soma do amido e produtos de sua degradação não absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis. Devido a sua importância, várias foram as pesquisas desenvolvidas nos últimos anos buscando quantificar o amido resistente nos diversos alimentos, para assim, usufruir da melhor forma possível de seus efeitos. Todavia, esta quantificação tem sido problemática, visto que esta fração é composta por um conjunto de estados físicos que alteram a taxa de digestão do amido convencional.

Inúmeros métodos foram desenvolvidos para a determinação do amido resistente, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Os *in vivo* são raramente utilizados devido à inconveniência do uso de pessoas e/ou animais para monitorar os níveis desta fração. Assim, os procedimentos *in vitro* são os mais difundidos atualmente, mesmo não havendo consenso quanto às metodologias, já que as existentes apresentam diferenças importantes de protocolo, dificultando a comparação dos resultados obtidos. Portanto, a falta de um método *in vitro* adequado para a determinação de amido resistente é a maior limitação nas pesquisas envolvendo efeitos biológicos desta fração e sua utilização na alimentação.

Uma vez que os teores de amido resistente sejam quantificados adequadamente, seus níveis dietéticos poderão ser manipulados de acordo com os efeitos biológicos pretendidos. Porém, a literatura mostra que esta relação deve ser melhor estudada, visto que não há consenso entre os níveis de amido resistente fornecidos nas dietas e seus efeitos biológicos específicos, ou seja, os resultados obtidos até o momento são bastante heterogêneos e não conclusivos.

Considerando a problemática da determinação do amido resistente, aliada à importância desta fração na saúde, a presente pesquisa foi conduzida com os objetivos de otimizar a determinação do amido resistente *in vitro*, por modificação de protocolo em metodologia já existente, bem como, relacionar teores crescentes desta fração com seus diferentes efeitos biológicos em ratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ARTIGO 1

Ciência Rural

(Configuração conforme normas da revista – Anexo 1)

(Artigo no prelo, a ser publicado em 2005 – Anexo 2)

AMIDO RESISTENTE: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO

Resistant starch: physico-chemical characteristics, physiological properties and quantification methodologies

Melissa Walter¹, Leila Picolli da Silva², Tatiana Emanuelli³

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

RESUMO

Encontrado em diversos alimentos, o amido é a mais importante fonte de carboidratos da dieta. Potencialmente digestível pelas enzimas no trato gastrintestinal, é absorvido na forma de glicose no intestino delgado. Apesar disso, uma quantidade significativa de amido pode escapar a esta digestão, alcançando o cólon, onde é fermentado pela flora bacteriana. Esta fração, conhecida como amido resistente, tem sido intensamente estudada nos últimos anos devido aos potenciais benefícios à saúde humana. Vários métodos são utilizados para a

1. Aluna do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS. CEP 97105-900. E-mail: melmelissaw@hotmail.com. Autor para correspondência.

2. Engenheira Agrônoma, Doutora, Bolsista ProDoc, Beneficiária de auxílio financeiro da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). NIDAL, DCTA, CCR, UFSM.

3. Farmacêutica, Doutora, Professora Adjunto do DTCA, CCR, UFSM.

determinação do amido resistente. Porém, nenhum é de aceitação unânime, uma vez que apresentam diferenças importantes nos protocolos e nos resultados obtidos. Neste contexto, o presente trabalho visa fornecer subsídios para um melhor entendimento sobre as características físico-químicas do amido resistente, variações nas metodologias existentes para sua determinação, assim como seus efeitos biológicos.

Palavras chave: *carboidratos, amido, protocolos, alimentos funcionais*

ABSTRACT

Found in different foods, starch is the most important source of carbohydrates in the diet. Potentially digested by enzymes in the gastrointestinal tract, it is absorbed as glucose in the small intestine. Despite this fact, significant amount of starch may escape digestion, reaching the colon, where it is fermented by intestinal flora. This fraction, known as resistant starch, has been extensively studied for some years because of its potential beneficial effects on human health. Many methods are used to determine resistant starch. Nevertheless, none has received unanimous approval, since the existing ones have important differences in protocols and in obtained results. In this context, the present work aimed to provide subsidies to better understand the physico-chemical characteristics of resistant starch, variations in the existing methodologies for its determination as well as biological effects.

Key words: *carbohydrates, starch, protocols, functional foods*

INTRODUÇÃO

O amido apresenta grande importância nutricional e industrial. Encontra-se amplamente distribuído em diversas espécies vegetais, como carboidrato de reserva, sendo abundante em grãos de cereais, raízes e tubérculos. É a fonte mais importante de carboidratos na alimentação humana, representando 80-90% de todos os polissacarídeos da dieta, e o

principal responsável pelas propriedades tecnológicas que caracterizam grande parte dos produtos processados.

Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, originando uma cadeia linear. Já, a amilopectina é composta por unidades de glicose unidas em $\alpha(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow6)$, formando uma estrutura ramificada. Embora a amilose seja definida como linear, atualmente se admite que algumas de suas moléculas possuem ramificações, semelhantes à amilopectina. Além disso, a presença de estruturas intermediárias entre amilose e amilopectina foi proposta para alguns amidos, como o de aveia (WANG & WHITE, 1994; ELIASSON, 1996). As proporções em que estas estruturas aparecem diferem entre as diversas fontes, entre variedades de uma mesma espécie e ainda, numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (ELIASSON, 1996). Estas variações podem resultar em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e funcionais diferenciadas, o que pode afetar sua utilização em alimentos ou aplicações industriais (WANG & WHITE, 1994).

Apresentando somente ligações α -glicosídicas, o amido é potencialmente digestível pelas enzimas amilolíticas secretadas no trato digestivo humano (ENGLYST & HUDSON, 1996). Até recentemente, devido à alta produção da α -amilase pancreática, se considerava que o amido era completamente hidrolisado por essa enzima, sendo absorvido no intestino delgado na forma de glicose. Entretanto, certos fatores tais como relação amilose:amilopectina, forma física do alimento e inibidores enzimáticos, entre outros, podem influenciar a sua taxa de hidrólise e absorção. Assim, quantidade significativa pode escapar à digestão no intestino delgado e alcançar o cólon, onde é fermentado (WOLF et al., 1999).

Para propósitos nutricionais, o amido pode ser classificado como *glicêmico* ou *resistente*. O amido glicêmico é degradado à glicose por enzimas no trato digestivo, podendo

ser classificado como rapidamente (ARD) ou lentamente digestível (ALD) no intestino delgado. Em testes *in vitro*, o ARD é hidrolisado em glicose dentro de 20 minutos, enquanto que o ALD é convertido em glicose entre 20 e 110 minutos (ENGLYST et al., 1992; YUE & WARING, 1998). Já, o amido resistente é aquele que resiste à digestão no intestino delgado, porém é fermentado no intestino grosso pela microflora bacteriana (YUE & WARING, 1998).

AMIDO RESISTENTE

O termo amido resistente foi sugerido inicialmente por ENGLYST et al. (1982). Estes pesquisadores constataram que muitos alimentos processados continham maior teor aparente de polissacarídeos não amiláceos do que os produtos crus correspondentes. Análises detalhadas revelaram que este aumento era devido a um composto formado por *n*-glicoses, que podia ser disperso em hidróxido de potássio. Sendo assim, estes pesquisadores definiram amido resistente como sendo aquele que resiste à dispersão em água fervente e hidrólise pela ação da amilase pancreática e da pululanase. Esta fração era constituída principalmente de amilose retrogradada, que também parecia ser altamente resistente à digestão (CHAMP & FAISANT, 1996). A partir de 1992, a definição para amido resistente assumiu um caráter mais relacionado a seus efeitos biológicos, representando “a soma do amido e produtos de sua degradação que não são absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis” (FAISANT et al., 1993; CHAMP & FAISANT, 1996; GOÑI et al., 1996). Pode-se dizer, então, que o amido resistente é a fração que não fornecerá glicose ao organismo, mas que será fermentada no intestino grosso para produzir, principalmente, gases e ácidos graxos de cadeia curta. Devido a esta característica considera-se que os efeitos do amido resistente sejam, em alguns casos, comparáveis aos da fibra alimentar sendo, por este motivo, normalmente aceito como um componente desta (CHAMP & FAISANT, 1996).

O amido resistente pode ser classificado em fisicamente inacessível (AR₁), grânulos

resistentes (AR_2) e retrogradado (AR_3), dependendo de sua resistência à digestão, sendo considerados:

Amido resistente tipo 1 (AR_1) - A forma física do alimento pode impedir o acesso da amilase pancreática e diminuir a digestão do amido, fato que o caracteriza como AR_1 (fisicamente inacessível). Isto pode ocorrer se o amido estiver contido em uma estrutura inteira ou parcialmente rompida da planta, como nos grãos; caso as paredes celulares rígidas inibirem o seu intumescimento e dispersão, como nos legumes; ou por sua estrutura densamente empacotada, como no macarrão tipo espaguete (ENGLYST et al., 1992; MUIR & O'DEA, 1992; GOÑI et al., 1996).

Amido resistente tipo 2 (AR_2) - Na planta, o amido é armazenado como corpos intracelulares parcialmente cristalinos denominados grânulos. Por meio de difração de raios-x, pode-se distinguir três tipos de grânulos que, dependendo de sua forma e estrutura cristalina, denominam-se A, B e C. As cadeias externas relativamente curtas das moléculas de amilopectina de cereais (menos de 20 unidades de glicose) favorecem a formação de polimorfos cristalinos tipo A. Já, as cadeias externas maiores das moléculas de amilopectina de tubérculos (mais de 22 unidades de glicose) favorecem a formação de polimorfos tipo B, encontrados também na banana, em amidos retrogradados e naqueles ricos em amilose. Embora com estrutura helicoidal essencialmente idêntica, o polimorfo tipo A apresenta empacotamento mais compacto do que o tipo B, o qual possui estrutura mais aberta e centro hidratado. Por sua vez, o polimorfo tipo C é considerado um intermediário entre os tipos A e B, sendo característico de legumes e sementes (THARANATHAN, 2002; TESTER et al., 2004). Essa variação na forma do grânulo influencia a digestão, caracterizando o AR_2 . Embora o grau de resistência dependa da fonte, geralmente grânulos dos tipos B e C tendem a ser mais resistentes à digestão enzimática (ENGLYST et al., 1992; MUIR & O'DEA, 1992).

Amido resistente tipo 3 (AR_3) - A maioria do amido ingerido pelo homem é submetido

a tratamentos com calor e umidade, resultando no rompimento e gelatinização da estrutura do grânulo nativo, o que o torna digestível (BOTHAM et al., 1995). Quando o gel esfria e envelhece, o amido gelatinizado forma novamente uma estrutura parcialmente cristalina, insolúvel e resistente à digestão enzimática, contudo diferente da conformação inicial (ENGLYST et al., 1992; MUIR & O'DEA, 1992). Este processo é conhecido como retrogradação, caracterizando o AR₃. A retrogradação da amilose à temperatura ambiente é um processo rápido (poucas horas), originando uma forma de amido altamente resistente à redispersão em água fervente e à hidrólise pela amilase pancreática (MUIR & O'DEA, 1992; BOTHAM et al., 1995). Já, a retrogradação da amilopectina é um processo mais lento (dias a semanas) e dependente da concentração da amostra, sendo que, em excesso de água, ela pode ser revertida por aquecimento a 70°C (BOTHAM et al., 1995). Vários estudos têm demonstrado relação direta entre o conteúdo de amilose e a formação de amido resistente, o que não ocorre com a amilopectina (BERRY, 1986; EGGUM et al., 1993; SAMBUCETTI & ZULETA, 1996).

A digestibilidade do amido também pode ser afetada por fatores intrínsecos, como a presença de complexos amido-lipídio e amido-proteína, de inibidores da α -amilase e de polissacarídeos não amiláceos (GOÑI et al. 1996; THARANATHAN, 2002); e por fatores extrínsecos, como tempo de mastigação (determina a acessibilidade física do amido contido em estruturas rígidas), tempo de trânsito do alimento da boca até o íleo terminal, concentração de amilase no intestino, quantidade de amido presente no alimento e a presença de outros componentes que podem retardar a hidrólise enzimática (ENGLYST et al., 1992; THARANATHAN, 2002).

Observa-se assim, que alimentos crus e processados contêm apreciáveis quantidades de amido resistente, dependendo da fonte botânica e do tipo de processamento, como moagem, cozimento e resfriamento (MUIR & O'DEA, 1993; GOÑI et al., 1996). Embora os

três tipos ocorram naturalmente na dieta humana (MUIR & O'DEA, 1992), podendo coexistir em um mesmo alimento (CHAMP & FAISANT, 1996), o AR₃ é o mais comum e, do ponto de vista tecnológico o mais importante, visto que sua formação é resultante do processamento do alimento (GARCÍA-ALONSO et al., 1998). O conteúdo de amilose, temperatura, forma física, grau de gelatinização, resfriamento e armazenagem, afetam o conteúdo de AR₃ (BERRY, 1986; EGGUM et al., 1993; GOÑI et al. 1996). Estes indicativos servem como base para explicar porque, ao contrário da fibra alimentar, as quantidades de amido resistente nos alimentos podem ser manipuladas de forma relativamente simples pelas técnicas de processamento (MUIR & O'DEA, 1992), influenciando a taxa e extensão esperada da digestão do amido no intestino delgado humano. Esta forma de manipulação poderia ser utilizada de maneira benéfica tanto para o consumidor, na manutenção da boa saúde, como para a indústria alimentícia, que teria uma fonte de “fibra” a qual não causaria alterações organolépticas tão pronunciadas quanto as fontes tradicionalmente usadas nos produtos, como os farelos (ENGLYST & HUDSON, 1996; YUE & WARING, 1998).

QUANTIFICAÇÃO DO AMIDO RESISTENTE

Normalmente, o amido dos alimentos é quantificado pelo teor de glicose liberada após sua completa hidrólise enzimática, pelo uso combinado de enzimas amilolíticas (ASP, 1996). A α -amilase promove a fragmentação da molécula de amido por hidrólise das ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, produzindo açúcares redutores de baixo peso molecular (maltose, maltotriose e maltotetrose). Todavia, esta enzima não hidrolisa as ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ presentes na amilopectina e, por isso, deve-se utilizar a amiloglicosidase para completa hidrólise do amido em glicose. No entanto, técnicas baseadas neste princípio não são eficientes para a determinação do amido resistente. Diante deste problema, a partir da década de 80, os esforços se concentraram no desenvolvimento de técnicas que

contemplassem a determinação, conjunta ou separadamente, destas duas frações. Entretanto, a quantificação do amido resistente é problemática, uma vez que esta não possui uma estrutura química diferenciada, sendo composta por um conjunto de estados físicos que alteram a taxa de digestão do amido convencional (HARALAMPU, 2000).

A determinação do amido resistente pode ser realizada por métodos *in vivo* ou *in vitro*. Nos métodos *in vivo* são realizadas coletas de amostra diretamente do íleo ou estimativa da quantidade de amido fermentado no cólon (CHAMP & FAISANT, 1996). Porém, estas técnicas são onerosas e inconvenientes, tanto em estudos com humanos quanto com animais. Por este motivo, foram desenvolvidos métodos *in vitro*, os quais podem ser diretos ou indiretos. Nos diretos, o amido resistente é quantificado após remoção da fração digestível por tratamento enzimático, simulando a hidrólise que ocorre na parte superior do trato digestivo (boca, estômago e intestino delgado) (BERRY, 1986; CHAMP & FAISANT, 1996). Após esta etapa, o amido remanescente é solubilizado com hidróxido de potássio ou dimetilsulfóxido, e novamente hidrolisado por enzimas amilolíticas. Os métodos indiretos são baseados na determinação do amido total e do disponível, de onde se obtém, por diferença, a quantidade de amido resistente (CHAMP & FAISANT, 1996). Entretanto, estes métodos acumulam erros de duas determinações experimentais (GOÑI et al., 1996). Os métodos *in vitro* variam em relação ao modo como a amostra é preparada, tipos e quantidades de enzimas, condições de tempo e de temperatura de incubação, e substâncias utilizadas para a solubilização da fração resistente. Estas variações dificultam a comparação dos resultados de amido resistente obtidos pelas distintas técnicas propostas.

Alguns destes métodos propõem que a preparação da amostra para análise *in vitro* seja realizada a partir do processo de mastigação, porque para medir a taxa e extensão da digestão do amido é necessário que a amostra seja analisada como ela é ingerida, sem moagem excessiva ou qualquer tratamento preparativo (ENGLYST et al., 1992; MUIR & O'DEA,

1992). No entanto, a mastigação é um método altamente individual e variável, sendo que a técnica escolhida deve ser reprodutível e refletir a divisão média do alimento alcançada pela mastigação. Desta forma, o mais indicado é que as amostras sejam trituradas por moagem, a qual, alterando a forma física do alimento aumenta o acesso das enzimas amilolíticas (MUIR & O'DEA, 1992).

Apesar dos métodos existentes utilizarem enzimas amilolíticas na determinação do amido resistente, somente alguns recorrem à protease. O uso desta enzima é recomendado para melhor simulação das condições fisiológicas (enzimas digestivas proteolíticas). Além disso, a remoção de proteínas aumenta a acessibilidade da amilase, evitando associações amido-proteína e a encapsulação do amido por matriz protéica, a qual pode formar uma estrutura rígida e impedir a gelatinização e hidrólise do grânulo de amido (GOÑI et al, 1996; ESCARPA et al., 1997). Estudos com farinha crua e cozida mostraram que grande parte do amido está encapsulada por uma matriz protéica, o que restringe a atividade da α -amilase (CHAMP, 1992). Várias pesquisas observaram decréscimo nos níveis de amido resistente em farinhas de legumes após incubação com proteases, antes ou após o cozimento, o que pode ser atribuído a alterações da parede celular e/ou à liberação das associações proteína-amido (EERLINGEN & DELCOUR, 1995).

Na quantificação do amido resistente também são utilizadas diferentes combinações de temperatura, de acordo com a metodologia proposta. Por exemplo, o método 996.11 da AOAC (1998) utiliza temperaturas mais altas (50 e 100°C), enquanto outros métodos indicam temperaturas mais baixas, próximas à fisiológica. A importância deste fator está relacionada à gelatinização do amido, ou seja, quando se aplica α -amilase termorresistente a 100°C o amido gelatiniza, não sendo possível a quantificação da fração resistente, presente nos alimentos crus. Ainda, a amilopectina retrogradada é facilmente hidrolisada, uma vez que exibe temperatura de fusão entre 55-70°C (EERLINGEN & DELCOUR, 1995). Deste modo, em

alguns casos, o uso de altas temperaturas pode subestimar o conteúdo de frações de amido resistente (AR₁ e AR₂), além de afetar o tempo de incubação. Entretanto, TOVAR et al. (1992) e GRANFELDT et al. (1993), em estudos comparando a quantificação do amido resistente a 100°C e a temperaturas fisiológicas, observaram resultados mais condizentes com os obtidos *in vivo* quando utilizando incubação a 100°C, havendo superestimação dos valores obtidos a temperaturas fisiológicas.

A solubilização do amido resistente para posterior determinação só é possível com o uso de hidróxido de potássio ou dimetilsulfóxido. A dispersão do amido resistente nestes reagentes permite sua digestão pelas enzimas amilolíticas e posterior determinação. Embora as diferentes técnicas optem pelo uso de um ou outro destes reagentes, não são encontrados dados na literatura explicando o porquê desta escolha. BERRY (1986) apenas comenta que, por ser o dimetilsulfóxido um poderoso solvente para muitos materiais insolúveis em água, incluindo amidos nativos, há poucas dúvidas de que o amido resistente represente um componente o qual resiste a amilólise por razões físicas, mais do que químicas.

A fração de amido resistente, mesmo com características químicas, organolépticas e efeitos fisiológicos distintos, muitas vezes é quantificada junto à fibra alimentar. Isto se deve ao fato de que os métodos utilizados não realizam a solubilização com hidróxido de potássio ou dimetilsulfóxido e, conseqüentemente, incluem o amido resistente no resultado final (JENKINS et al., 1998; YUE & WARING, 1998). Todavia, deve-se observar que somente o amido resistente tipo AR₃ (retrogradado) é incluído nesta fração, uma vez que os passos de moagem e gelatinização solubilizam, respectivamente, AR₁ e AR₂ (ASP, 1996; WOLF et al., 1999).

EFEITOS DO AMIDO RESISTENTE NA SAÚDE

O principal interesse em relação ao amido resistente é o seu papel fisiológico. Por não

ser digerido no intestino delgado, este tipo de amido se torna disponível como substrato para fermentação pelas bactérias anaeróbicas do cólon (JENKINS et al., 1998). Dessa forma, essa fração compartilha muitas das características e benefícios atribuídos à fibra alimentar no trato gastrintestinal (BERRY, 1986; MUIR & O'DEA, 1992). Por exemplo, o consumo de amido resistente contribui para o aumento do volume fecal, apresentando efeitos importantes na prevenção da constipação, diverticulose e hemorróidas, além de diluir compostos tóxicos, potenciais formadores de células cancerosas (YUE & WARING, 1998).

Em indivíduos diabéticos, o consumo de carboidratos digestíveis não pode exacerbar a hiperglicemia pós-prandial e deve prevenir eventos hipoglicêmicos. No entanto, as diferenças nas respostas glicêmica e insulinêmica ao amido da dieta estão diretamente relacionadas à taxa de digestão do amido (O'DEA et al., 1981). Sendo assim, alimentos lentamente digeridos ou com baixo índice glicêmico têm sido associados ao melhor controle do diabetes e, a longo prazo, podem até mesmo diminuir o risco de desenvolver a doença (JENKINS et al., 1998). Em estudo realizado por KABIR et al. (1998), com ratos normais e diabéticos, a substituição do amido com alto índice glicêmico pelo de baixo índice glicêmico numa dieta mista aumentou a oxidação da glicose, estimulada pela insulina, e diminuiu a incorporação da glicose nos lipídios totais.

O amido resistente também tem sido associado a reduções nos níveis de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) e de triglicerídios na hiperlipidemia (JENKINS et al., 1988). SACQUET et al. (1983) e MORAND et al. (1992), observaram que a inclusão de amido resistente a dietas de ratos reduziu os níveis de colesterol e triglicerídios plasmáticos.

Não sendo digerido no intestino delgado, o amido resistente também pode servir de substrato para o crescimento de microrganismos probióticos, atuando como potencial agente prebiótico (HARALAMPU, 2000). A metabolização desse tipo de carboidrato pelos microrganismos, via fermentação, resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta, como

acetato, propionato e butirato; gases carbônico e hidrogênio e, em alguns indivíduos, metano; e diminuição do pH do cólon (ENGLYST et al., 1987; CHAMP & FAISANT, 1996; YUE & WARING, 1998). A maioria destes compostos age na prevenção de doenças inflamatórias do intestino, além de auxiliar na manutenção da integridade do epitélio intestinal (JENKINS et al., 1998).

Em pesquisas utilizando populações mistas de bactérias obtidas de fezes humanas, ENGLYST et al. (1987) observaram que 59% do amido fermentado foi recuperado como ácidos graxos de cadeia curta, na proporção molar de 50:22:29 para acetato, propionato e butirato, respectivamente. O decréscimo do pH resultante dessa fermentação pode, em parte, ser responsável pela pequena taxa de transformação de ácidos biliares primários em metabólitos secundários mutagênicos e pela redução de outras biotransformações bacterianas específicas no intestino grosso (CHAMP & FAISANT, 1996). Dados obtidos por JENKINS et al. (1998) em estudos com humanos, mostraram que a suplementação de amido resistente nas dietas resultou em maior concentração de butirato, em comparação ao tratamento controle, constituído de baixo teor de fibra. Considerando que o butirato é importante fonte de energia para as células epiteliais do cólon, sua maior produção pode prevenir doenças colônicas, incluindo colite ulcerativa, as quais são provocadas por deficiência de energia. Em adição, é atribuído ao butirato a supressão do desenvolvimento de células cancerígenas e o aumento na proliferação de células da mucosa intestinal, o que pode diminuir o risco de câncer de cólon, visto que pacientes com este tipo de doença apresentaram taxas reduzidas de butirato durante a investigação inicial (ENGLYST et al., 1987; ASP, 1996; JENKINS et al., 1998; YUE & WARING, 1998). Quanto ao propionato e acetato, podem influenciar a gliconeogênese e a lipogênese hepáticas, respectivamente (ENGLYST et al., 1987; ASP, 1996).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento dos efeitos biológicos do amido resistente permite sua melhor utilização na alimentação, inclusive em dietas diferenciadas, podendo complementar e/ou substituir a fração fibra de determinados alimentos, sem alteração significativa das características organolépticas destes. Desta forma, são necessárias técnicas adequadas à quantificação do amido resistente nos alimentos, cujos resultados correlacionem com a resposta biológica. Neste contexto, várias metodologias enzimáticas vêm sendo estudadas, mostrando-se promissoras as que tentam mimetizar os eventos enzimático-digestivos do trato gastrintestinal, as quais utilizam protease. Embora evidentes, os avanços nas técnicas atuais para a análise de amido resistente ainda não permitiram obter correlações seguras entre os valores determinados *in vitro* com aqueles observados *in vivo*, o que indica a necessidade de continuar as pesquisas sobre este assunto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**, 16. ed. Washington, 1998. 1018p.
- ASP, N. G. Dietary carbohydrates: classification by chemistry and physiology. **Food Chem**, v.57, n.1, p.9-14, 1996.
- BERRY, C. S. Resistant starch: formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. **J Cereal Sci**, v.4, p.301-314, 1986.
- BOTHAM, R. L. et al. A physicochemical characterization of chick pea starch resistant to digestion in the human small intestine. **Carbohydr Polym**, v.26, p.83-90, 1995.
- CHAMP, M. Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. **Eur J Clin Nutr**, v.46, n.2, p.S51-S62, 1992.

- CHAMP, M.; FAISANT, N. Resistant starch: analytical and physiological aspects. **Bol SBCTA**, v.30, n.1, p.37-43, 1996.
- EERLINGEN, R. C.; DELCOUR, J. A. Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. **J Cereal Sci**, v.22, p.129-138, 1995.
- EGGUM, B. O. et al. The resistant starch, undigestible energy and undigestible protein contents of raw and cooked milled rice. **J Cereal Sci**, v.18, p.159-170, 1993.
- ELIASSON, A. C. **Carbohydrates in food**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. 561p.
- ENGLYST, H. N. et al. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, v.107, p.307-318, 1982.
- ENGLYST, H. N. et al. Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. **FEMS Microbiol Ecol**, v.95, p.163-171, 1987.
- ENGLYST, H. N.; HUDSON, G. J. The classification and measurement of dietary carbohydrates. **Food Chem**, v.57, n.1, p.15-21, 1996.
- ENGLYST, H. N. et al. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **Eur J Clin Nutr**, v.46, p.S33-S50, 1992.
- ESCARPA, A. et al. An approach to the influence of nutrients and other food constituents on resistant starch formation. **Food Chem**, v.60, n.4, p.527-532, 1997.
- FAISANT, N. et al. Structural discrepancies in resistant starch obtained *in vivo* in humans and *in vitro*. **Carbohydr Polym**, v.21, p.205-209, 1993.
- GARCÍA-ALONSO, A. et al. Influence of botanical source and processing on formation of resistant starch type III. **Cereal Chem**, v.75, n.6, p.802-804, 1998.
- GOÑI, I. et al. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. **Food Chem**, v.56, p.445-449, 1996.
- GRANFELDT, Y.E. et al. Starch bioavailability in arepas made from ordinary or high

- amylose corn: concentration and gastrointestinal fate of resistant starch in rats. **J Nutr**, v.123, p.1676-1684, 1993.
- HARALAMPU, S. G. Resistant starch – a review of the physical properties and biological impact of RS₃. **Carbohydr Polym**, v.41, p.285-292, 2000.
- JENKINS, D. J. et al. Starchy foods and glycemic index. **Diabetes Care**, v.11, n.2, p.149-159, 1988.
- JENKINS, D. J. A. et al. Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. **J Am Coll Nutr**, v.17, n.6, p.609-616, 1998.
- KABIR, M. et al. Dietary amylose-amylopectin starch content affects glucose and lipid metabolism in adipocytes of normal and diabetic rats. **J Nutr**, v.128, n.1, p.35-43, 1998.
- MORAND, C. et al. Replacement of digestible wheat starch by resistant cornstarch alters splanchnic metabolism in rats. **J Nutr**, v.122, p.345-354, 1992.
- MUIR, J. G.; O'DEA, K. Measurement of resistant starch: factors affecting the amount of starch escaping digestion *in vitro*. **Am J Clin Nutr**, v.56, p.123-127, 1992.
- MUIR, J. G.; O'DEA, K. Validation of an *in vitro* assay for predicting the amount of starch that escapes digestion in the small intestine of humans. **Am J Clin Nutr**, v.57, p.540-546, 1993.
- O'DEA, K. et al. Rate of starch hydrolysis *in vitro* as a predictor of metabolic responses to complex carbohydrate *in vivo*. **Am J Clin Nutr**, v.34, p.1991-1993, 1981.
- SAMBUCETTI, M. E.; ZULETA, A. Resistant starch in dietary fiber values measured by the AOAC method in different cereals. **Cereal Chem**, v.73, n.6, p.759-761, 1996.
- SAQUET, E. et al. Effect of amylo maize starch on cholesterol and bile acid metabolisms in germfree (axenic) and conventional (holoxenic) rats. **Reprod Nutr Dev**, n.23, p.783-792, 1983.
- TESTER, R. F. et al. Starch – composition, fine structure and architecture. **J Cereal Sci**, v.39,

p.151-165, 2004.

THARANATHAN, R. N. Food-derived carbohydrates – Structural complexity and functional diversity. **Crit Rev Biotechnol**, v.22, p.65-84, 2002.

TOVAR, J. et al. Incomplete digestion of legume starches in rats: a study of precooked flours containing retrograded and physically inaccessible starch fractions. **J Nutr**, v.122, n.7, p.1500-1507, 1992.

WANG, L. Z.; WHITE, P. J. Structure and properties of amylose, amylopectin, and intermediate materials of oat starches. **Cereal Chem**, v.71, n.3, p.263-268, 1994.

WOLF, B. W. et al. Effects of chemical modification on *in vitro* rate and extent of food starch digestion: an attempt to discover a slowly digested starch. **J Agr Food Chem**, v.47, p.4178-4183, 1999.

YUE, P.; WARING, S. Resistant starch in food applications. **Cereal Food World**, v.43, n.9, p.690-695, 1998.

3. TRABALHOS DESENVOLVIDOS

3.1. ARTIGO 2

Submetido a Alimentos e Nutrição
(Configuração conforme normas da revista – Anexo 3)

AMIDO DISPONÍVEL E RESISTENTE EM ALIMENTOS: MUDANÇAS DE PROTOCOLO DO MÉTODO DA AOAC 996.11

Melissa WALTER¹, Leila Picolli da SILVA^{1,2}, Daiana Marim Xarão PERDOMO¹

RESUMO

Muitos métodos para a quantificação do amido disponível (AD) e resistente (AR) foram desenvolvidos nos últimos anos. Entretanto, a utilização de diferentes enzimas, assim como de diferentes quantidades de amostra, leva a variações no teor destas frações dificultando a comparação dos resultados obtidos. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da utilização de protease, do aumento da quantidade de amostra (de 100mg para 300mg) e da substituição do tampão MOPS pH 7,0 por tampão fosfato pH 6,8 na determinação de AD e AR pela técnica da AOAC 996.11. Para tanto, utilizou-se como amostra amido de milho, arroz branco polido, banana verde e flocos de milho. A utilização de protease no processo de digestão, bem como o aumento na quantidade de amostra, influenciaram significativamente o teor de AD e AR para a maioria dos materiais analisados. Já, a substituição por tampão fosfato não resultou em variação significativa para os teores de AD e AR. Portanto, o protocolo com as três modificações, por apresentar melhor simulação das condições hidrolíticas no trato gastrointestinal, menores coeficientes de variação e custo reduzido pela substituição do tampão, seria o mais adequado à quantificação destas frações do amido.

¹ Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais, Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – USFM – CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

² ProDoc, beneficiária de auxílio financeiro CAPES – Brasil

Palavras-chave: protease, quantidade de amostra, tampão

INTRODUÇÃO

O amido, um dos principais constituintes dos alimentos, pode ser dividido em duas frações: disponível (AD) e resistente (AR). O AD é aquele degradado e absorvido na forma de glicose pelo organismo. Já, o AR é definido como a soma do amido e produtos de sua degradação não absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis [5]. A este são atribuídos efeitos benéficos ao organismo humano e, por esta razão, a quantificação confiável desta fração torna-se de fundamental importância.

Desde a descoberta do AR, vários métodos *in vitro* (diretos e indiretos) foram desenvolvidos para a quantificação desta fração. Os métodos diretos determinam o AR após a remoção da fração digestível por tratamento enzimático [1, 3, 11], enquanto os indiretos quantificam o AR como a diferença entre o amido total e o disponível [4]. A utilização de diferentes enzimas, assim como de diferentes quantidades de amostra, levam a variações no teor de AD e AR, dificultando a comparação dos resultados obtidos pelos diferentes procedimentos analíticos, bem como sua relação com respostas biológicas.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da utilização de protease e do aumento da quantidade de amostra na determinação de AD e AR pela técnica da AOAC 996.11 [1], e a substituição do tampão MOPS pH 7,0 por tampão fosfato pH 6,8.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas quatro amostras: amido de milho (S4126, Sigma - St. Louis/EUA), arroz branco polido (IRGA 419 - Instituto Rio Grandense do Arroz - IRGA/Cachoeirinha/RS), banana verde (*Musa sinensis* L.) e flocos de milho (Corn flakes[®], Nestlé - Caçapava/Brasil).

A banana verde foi descascada, picada e triturada em multiprocessador e levada à estufa com circulação de ar a 55°C por 96 horas. Após a secagem, esta e as demais amostras foram moídas a fim de obter tamanho de partícula apropriado (entre 0,4 e 0,2mm) para a realização das análises. A matéria seca das amostras foi realizada de acordo com técnica descrita pela AOAC [1].

Amido disponível e resistente

As frações de AD e AR foram determinadas pela técnica original da AOAC 996.11 [1] (**Protocolo P100SP**) (Figura 1), e por suas modificações (protocolos P300SP, P100CP, P300CP e PTF). Cada protocolo compôs um tratamento, sendo realizadas as seguintes modificações:

Protocolo P300SP: aumento da quantidade de amostra de 100mg para 300mg.

Protocolo P100CP: adição da enzima protease. Após a incubação com α -amilase termoestável a 95°C por 5 minutos e equilíbrio da temperatura, adicionou-se 100 μ l de protease e incubou-se a 60°C por 30 minutos. Os demais passos da técnica não foram modificados.

Protocolo P300CP: aumento da quantidade de amostra de 100mg para 300mg, e adição da enzima protease (conforme explicado no protocolo P100CP).

Protocolo PTF: aumento da quantidade de amostra de 100mg para 300mg, adição da enzima protease (conforme explicado no protocolo P100CP), e substituição do tampão MOPS pH 7,0 (da incubação com α -amilase termoestável) por tampão fosfato pH 6,8.

Em todas as corridas de cada uma das análises supracitadas, foi conduzida uma prova em branco a fim de impedir quaisquer possíveis interferências de reagentes sobre o resultado final.

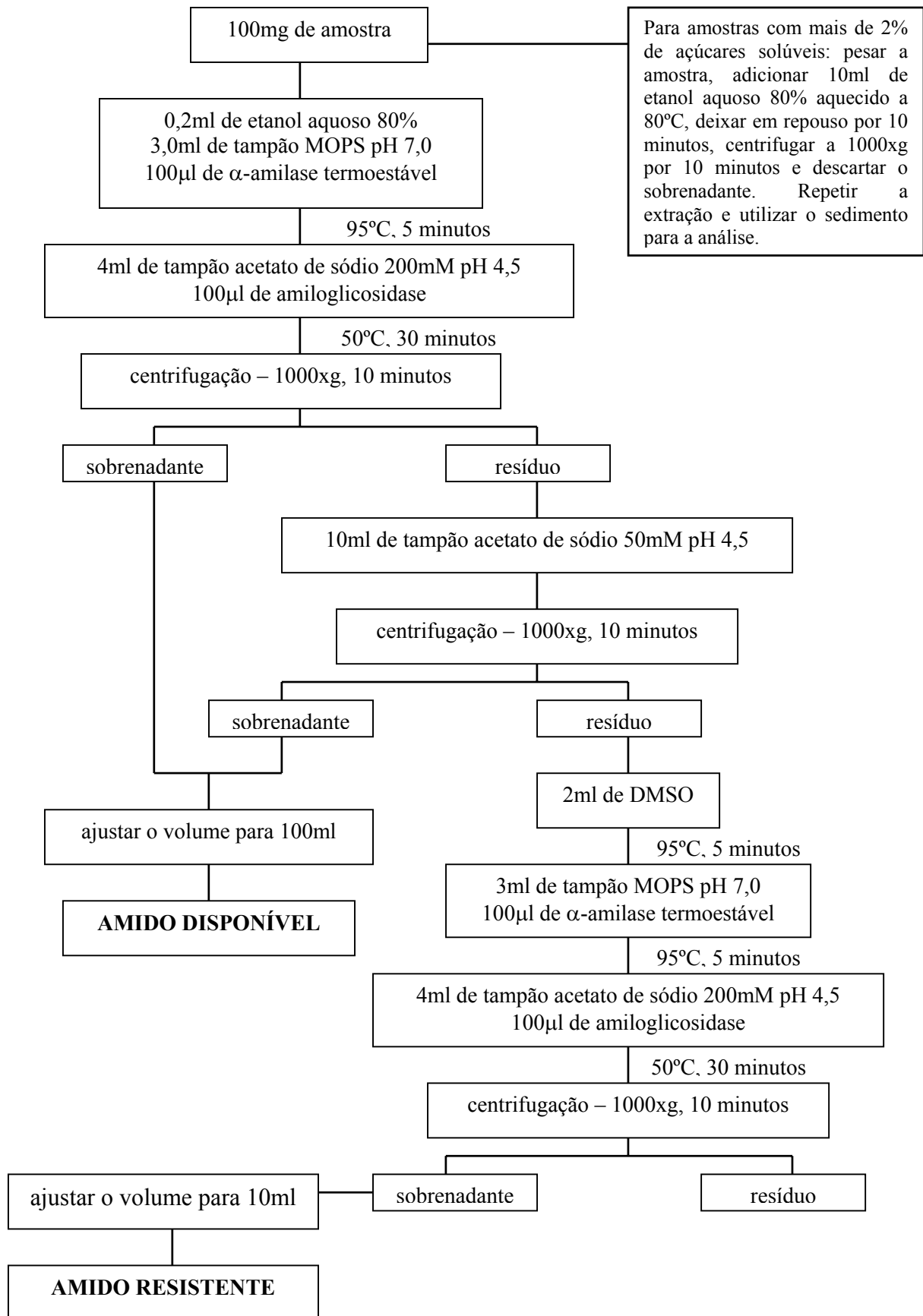


Figura 1. Técnica da AOAC 996.11 [1] (protocolo P100SP) para determinação de amido disponível e resistente *in vitro*.

As enzimas utilizadas foram α -amilase termoestável Termamyl 120L[®] (120 KNU/g) e protease Flavourzyme 500L[®] (500 LAPU/g), produzidas pela Novozymes Latin American Limited (Araucária/Brasil), e amiloglicosidase A7255 (1500 U/ml) da Sigma. A glicose foi medida colorimetricamente ($\lambda = 505\text{nm}$) com o reagente glicose oxidase-peroxidase (Glicose PAP Liquiform, da Labtest Diagnóstica – Lagoa Santa/Brasil).

O conteúdo de AD e AR foi calculado multiplicando o resultado final de glicose por 0,9 (para converter glicose livre em amido), e apresentado como porcentagem na matéria seca.

Delineamento e análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento completamente casualizado, obedecendo a um esquema fatorial, utilizando-se 10 unidades experimentais por tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados por F-teste, e as médias por Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 1 e 2 apresentam, respectivamente, os valores de AD e AR das amostras de amido de milho, arroz, banana verde e flocos de milho, determinados pelos diferentes protocolos.

A utilização de protease no processo de digestão afetou de forma diferenciada o teor de AD e AR, de acordo com o tipo de amostra (Tabela 1). Os teores de AD do amido de milho, arroz e banana verde não apresentaram diferença significativa com a utilização de protease. Todavia, nos flocos de milho o teor de AD foi significativamente menor na presença de protease, porém somente quando utilizando 300mg de amostra. Considerando o teor de AR, observou-se efeito significativo tanto para o amido de milho quanto para o arroz, mas não

para a banana verde, enquanto que, no caso dos flocos de milho este efeito só foi observado para 100mg de amostra.

Tabela 1. Teor de amido disponível (% na matéria seca) em amostras de amido de milho, arroz, banana verde e flocos de milho, utilizando diferentes protocolos

Amostra		P100SP	P300SP	P100CP	P300CP	PTF
Amido de milho	M±DP ¹	97,60±0,98 ^b	99,30±0,82 ^a	97,48±1,29 ^b	98,95±0,82 ^{a,A}	98,33±0,66 ^A
	CV ²	1,00	0,83	1,32	0,83	0,68
Arroz	M±DP ¹	86,75±2,97 ^a	85,97±1,58 ^a	88,06±1,56 ^a	87,10±1,20 ^{a,A}	86,50±1,53 ^A
	CV ²	3,43	1,84	1,77	1,37	1,77
Banana verde	M±DP ¹	70,74±2,34 ^b	73,67±2,32 ^a	71,80±1,31 ^{ab}	73,16±0,58 ^{a,A}	72,71±0,58 ^A
	CV ²	3,31	3,15	1,83	0,80	0,80
Flocos de milho	M±DP ¹	72,50±1,12 ^{ab}	73,65±1,02 ^a	72,82±1,20 ^{ab}	72,28±0,60 ^{b,A}	71,77±0,60 ^A
	CV ²	1,55	1,39	1,65	0,83	0,83

¹ Média ± Desvio padrão

² Coeficiente de variação

Médias (n=10) seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de significância

Médias (n=10) seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem significativamente pelo F teste a 5% de significância

Como estes são alimentos ricos em amido, na sua maioria digestível (Tabela 1), pequenas variações na sua quantificação não refletem em diferença estatisticamente significativa. No entanto, para uma fração de menor representatividade, como o AR, a incubação com protease pode levar a diferença significativa em seus teores, como evidenciado pelos resultados obtidos neste estudo (Tabela 2).

Para que o amido seja degradado, é necessária a adsorção das enzimas à superfície do grânulo. Entretanto, esta adsorção pode ser dificultada pela presença de uma camada protéica, levando à degradação incompleta do amido em glicose [7]. Por exemplo, sabe-se que uma

fração significativa do amido em trigo cru e cozido encontra-se encapsulado por uma matriz protéica, restringindo sua disponibilidade à α -amilase [8]. Além disso, Batey ² observou a formação de massas gluteinosas durante a análise de amido em farinha de trigo, o que dificultou a degradação completa pelas enzimas amilolíticas. Embora o teor de proteína seja baixo em amidos purificados, tais como o de milho, a mesma encontra-se intimamente ligada ao grânulo de amido [14]. De forma semelhante, o amido do arroz também se apresenta firmemente associado a proteínas [13]. Desta forma, para minimizar este problema e, ao mesmo tempo, proporcionar uma melhor simulação do processo digestivo no trato gastrintestinal, recomenda-se a inclusão de protease na determinação de amido.

Tabela 2. Teor de amido resistente (% na matéria seca) em amostras de amido de milho, arroz, banana verde e flocos de milho, utilizando diferentes protocolos

Amostra		P100SP	P300SP	P100CP	P300CP	PTF
Amido de milho	M \pm DP ¹	0,24 \pm 0,04 ^a	0,16 \pm 0,02 ^b	0,10 \pm 0,01 ^c	0,22 \pm 0,03 ^{a,A}	0,20 \pm 0,02 ^A
	CV ²	15,57	13,17	14,45	12,32	9,22
Arroz	M \pm DP ¹	0,31 \pm 0,05 ^b	0,62 \pm 0,09 ^a	0,15 \pm 0,02 ^c	0,36 \pm 0,05 ^{b,A}	0,40 \pm 0,03 ^A
	CV ²	17,01	14,70	15,49	13,26	8,19
Banana verde	M \pm DP ¹	0,68 \pm 0,11 ^a	0,72 \pm 0,11 ^a	0,68 \pm 0,10 ^a	0,72 \pm 0,10 ^{a,A}	0,74 \pm 0,10 ^A
	CV ²	16,96	15,02	14,74	14,39	13,14
Flocos de milho	M \pm DP ¹	0,22 \pm 0,03 ^b	0,23 \pm 0,02 ^b	0,28 \pm 0,02 ^a	0,23 \pm 0,02 ^{b,A}	0,25 \pm 0,02 ^A
	CV ²	12,85	9,83	9,01	8,81	7,56

¹ Média \pm Desvio padrão

² Coeficiente de variação

Médias (n=10) seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de significância

Médias (n=10) seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem significativamente pelo F teste a 5% de significância

A utilização de protease não alterou significativamente os valores de AD e AR da

banana verde. Isto pode estar relacionado às características do grânulo de amido neste alimento. Análises microscópicas revelaram grânulos de amido irregulares, densos e com superfície lisa [6]. Estas características, e não a presença de camada protéica superficial, seriam responsáveis pela resistência deste amido à digestão, explicando porque os teores de AD e AR não foram afetados pelo emprego de protease no processo de hidrólise.

Para os flocos de milho, tanto os teores de AD quanto os de AR foram influenciados pela utilização de protease. Isto pode estar relacionado a alterações deste alimento durante o processamento, visto que a extrusão de farinhas de cereais leva à formação de complexos amido-proteína [9, 10]. Estes dificultam a hidrólise do amido, levando a erros na determinação desta fração, justificando a inclusão da protease na metodologia analítica.

O aumento na quantidade de amostra afetou significativamente os resultados de AD (Tabela 1) e AR (Tabela 2) para os materiais testados. No caso do AD, resultou em teores mais elevados deste no amido de milho, ao passo que não apresentou efeito para o arroz e os flocos de milho. Para a banana verde, seu efeito só foi evidenciado na ausência de protease. Já, para o AR, a quantidade de amostra apresentou efeito significativo para amido de milho e arroz, mas não para a banana verde, enquanto que seu efeito só foi evidenciado nos flocos de milho na presença de protease.

Devido ao baixo teor de AR na maioria dos alimentos, a utilização de pequena quantidade de amostra pode levar a erro e/ou variações nos resultados obtidos, justificando o uso de maior quantidade de amostra. Neste trabalho, foi testada a quantidade de 300mg de amostra, não sendo necessários ajustes no volume das enzimas ou reagentes, os quais foram suficientes para permitir a quantificação adequada das frações de amido para a quantidade de amostra analisada.

Embora tenha apresentado efeito significativo somente para algumas amostras, pode-se observar que os coeficientes de variação nos métodos utilizando 300mg foram, em todos os

casos, inferiores àqueles usando 100mg (Tabelas 1 e 2). Isto foi observado não só para o AR, mas também para o AD, indicando menor variação intralaboratorial [12].

O método da AOAC 996.11 [1] indica a utilização de tampão MOPS pH 7,0 para a hidrólise com α -amilase termoestável. Contudo, este tampão apresenta custo elevado e é de difícil obtenção, em especial no que diz respeito a sua importação. Portanto, foi testada a substituição do tampão MOPS pH 7,0 por tampão fosfato pH 6,8, que apresenta menor custo.

Os resultados desta substituição são apresentados nas tabelas 1 e 2, protocolos P300CP e PTF. Para todas as amostras analisadas, não houve diferença significativa entre os teores de AD e AR obtidos pelos dois protocolos. Logo, esta substituição pode ser realizada no dia-a-dia do laboratório, reduzindo os custos da análise de AD e AR.

Os coeficientes de variação dos resultados de AD e AR para o protocolo PTF foram inferiores aos obtidos para o protocolo P100, em todas as amostras analisadas, sendo que em alguns casos, a redução chegou a 50%. Estes resultados demonstram menor variação nos resultados obtidos pelo protocolo contendo as modificações avaliadas.

CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a utilização de protease afeta significativamente o teor de AD e AR nos alimentos, justificando seu emprego na metodologia analítica. O aumento na quantidade de amostra também afetou de forma positiva a determinação do amido, visto que houve redução no coeficiente de variação com a utilização de 300mg. Além disso, a substituição do tampão MOPS pH 7,0 por tampão fosfato pH 6,8 não influenciou significativamente os valores de AD e AR, sendo, portanto, possível realizar esta substituição, sem alterar o resultado da análise.

Em vista disso o protocolo PTF, que engloba essas três modificações, pode ser indicado para a análise quantitativa de AD e AR, por apresentar melhor simulação das

condições de hidrólise no trato gastrointestinal pelo uso de protease, menor coeficiente de variação e custo reduzido da análise.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA).

ABSTRACT

Several methods for the quantification of digestible (DS) and resistant starch (RS) have been developed. However, the utilization of different enzymes as well as different amount of sample leads to variations in the values of these fractions, making it hard to compare the obtained results. So the present research aimed to evaluate the effect of protease utilization, increased amount of sample (from 100mg to 300mg) and the use of phosphate buffer pH 6.8 instead of MOPS buffer pH 7.0 in the determination of DS and RS using the AOAC method 996.11. To accomplish this, we used as samples corn starch, white rice, green banana and corn flakes. The utilization of protease in the digestion process as well as the increase in the amount of sample used significantly influenced DS and RS values for most of the samples analyzed. The employment of phosphate buffer instead of MOPS buffer did not result in significant variation in the values of DS and RS. Thus, the protocol containing the three modifications, presenting better simulation of the hydrolytic conditions in the gastrointestinal tract, lower coefficient of variation and reduced cost due to the substitution of MOPS buffer, would be more adequate to the quantification of these starch fractions.

Key words: protease, amount of sample, buffer

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16th ed., supplement 1998. Washington: AOAC, 1995. 1018p.
2. BATEY, I.L. Starch analysis using thermostable alpha-amylases. **Starch/Stärke**, Stuttgart, v.34, n.4, p.125-128, 1982.
3. BERRY, C. S. Resistant starch: formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. **J Cereal Sci.**, New York, v.4, p.301-314, 1986.
4. ENGLYST, H.N.; KINGMAN, S.M.; CUMMINGS, J.H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **Eur. J. Clin. Nutr.**, London, v.46, p.S33-S50, 1992.
5. FAISANT, N. *et al.* Structural discrepancies in resistant starch obtained in vivo in humans and in vitro. **Carbohydr. Polym.**, Los Angeles, v.21, p.205-209, 1993.
6. GALLANT, O. J. *et al.* Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymic degradation. **Eur. J. Clin. Nutr.**, London, v.46, p.S3-S16, 1992.
7. HOLM, J. *et al.* Starch availability in vitro and in vivo after flaking, steam-cooking and popping of wheat. **J. Cereal Sci.**, New York, v.3, p.193-206, 1985.
8. HOLM, J. *et al.* A rapid method for the analysis of starch. **Starch/Stärke**, Stuttgart, v.38, n.7, p.224-226, 1986.
9. LI, M.; LEE, T.C. Effect of cysteine on the functional properties and microstructures of wheat flour extrudates. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.44, n.7, p.1871-80, 1996.
10. MADEKA, H.; KOKINI, J.L. Effect of addition of zein and gliadin on the rheological properties of amylopectin starch with low-to-intermediate moisture. **Cereal Chem.**, St. Paul,

v.69, n.5, p.489-494, 1992.

11. MUIR, J. G.; O'DEA, K. Measurement of resistant starch: factors affecting the amount of starch escaping digestion *in vitro*. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.56, n.1, p.123-127, 1992.

12. PROSKY, L. *et al.* Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory Study. **J. Assoc. Off. Ana. Chem.**, Washington, v.71, n.5, p.1017-1023, 1988.

13. SAMBUCETTI, M. E.; ZULETA, A. Resistant starch in dietary fiber values measured by the AOAC method in different cereals. **Cereal Chem.**, St. Paul, v.73, n.6, p.759-761, 1996.

14. TESTER, R.F. *et al.* Starch – composition, fine structure and architecture. **J. Cereal Sci.**, New York, v.39, p.151-165, 2004.

3.2. ARTIGO 3 – VERSÃO ORIGINAL

Submetido ao British Journal of Nutrition
(Configuração conforme normas da revista – Anexo 4)

EFFECT OF RESISTANT STARCH ON BIOLOGICAL RESPONSES IN RATS

M. WALTER¹, L. P. DA SILVA^{1,2}, D. M. X. PERDOMO¹

¹ Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais, Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – USFM – CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

² ProDoc, beneficiária de auxílio financeiro CAPES – Brasil

Much research has been done on resistant starch (RS) due to its beneficial effects, such as dilution of dietary energy, increased fecal excretion and growth of beneficial microorganisms in the intestinal tract, among others. The present research aimed to evaluate RS influence in some parameters of biological response. Male Wistar rats (97.1 ± 5.3 g) were fed diets supplemented with 0%, 3%, 9% and 18% of RS. Animals were submitted to an adaptation period of 5 days. During the experimental period (15 days), data and samples were obtained to determine feed intake, body weight gain, apparent dry matter digestibility, apparent starch digestibility, wet and dry fecal production, fecal water content and pH, and fecal nitrogen excretion. The addition of RS to the diets did not influence feed intake, but significantly reduced the body weight of the animals. Wet and dry fecal production was significantly higher with the addition of 9% and 18% of RS. The consumption of RS also increased significantly the water content and the nitrogen excretion in the feces as well as reduced fecal pH. The effects observed in the present study may be essentially due to the reduced apparent starch digestibility and its fermentation by intestinal microflora, demonstrating its beneficial effects on health maintenance.

Performance: fecal production: nitrogen excretion

Several modern diseases result from inadequate feeding, and some may be related to insufficient fiber intake. Although this fraction exerts important biological effects on health balance, its consumption is restricted, especially due to its sensorial properties, since the addition of traditional fiber sources causes pronounced organoleptic alterations (e.g. bread enriched with wheat bran) (Yue & Waring, 1998).

In this context, there is the option of using another indigestible carbohydrate, resistant starch (RS), defined as the sum of starch and products of starch degradation not absorbed in the small intestine of healthy individuals (Faisant *et al.* 1993). It has properties similar to fiber, but with less pronounced organoleptic alterations.

RS, not being digested by the enzymes in the human gastrointestinal tract, is considered a dilutor of dietary energy, and may have significant effects on body weight (Morand *et al.* 1992). It also increases fecal mass, helps preventing constipation and hemorrhoids, and dilutes toxic compounds (Yue & Waring, 1998). This fraction has also been associated with reduced post-prandial glycemic and insulinemic responses, which may have beneficial implication for diabetes management (Kabir *et al.* 1998); and reduced levels of cholesterol and triglycerides (Jenkins *et al.* 1988; De Deckere *et al.* 1995).

Behaving as a substrate for growth of beneficial microorganisms, RS may act as a potential prebiotic agent (Haralampu, 2000). Besides, the products of starch fermentation reduce cecal and fecal pH (Bianchini *et al.* 1992; Ahmed *et al.* 2000), and help in the prevention of inflammatory intestinal diseases and certain types of cancer (Tharanathan, 2002).

Considering this, the present research aimed to evaluate RS effects on some parameters of biological response on rats.

MATERIALS AND METHODS

Diets and treatments

Four diets were formulated (Table 1), according to the recommendations of the American Institute of Nutrition (AIN) (Reeves, 1993), all of them containing equivalent contents of protein, fat, vitamins, minerals and total carbohydrates, but differing in RS content. As starch source we used cornstarch containing less than 0.1% of RS. As RS source we used a high amylose corn starch (Novelose 260[®]), containing 53.5% of RS, obtained from National Starch & Chemical Industrial Ltda (São Paulo, Brasil). These diets formed the treatments:

- **Control:** diet not supplemented with RS;
- **3% RS:** diet where Novelose 260[®] substituted for part of the cornstarch in order to obtain 3% of RS in the total composition;
- **9% RS:** diet where Novelose 260[®] substituted for part of the cornstarch in order to obtain 9% of RS in the total composition;
- **18% RS:** diet where Novelose 260[®] substituted for part of the cornstarch in order to obtain 18% of RS in the total composition;

Animals and experiment

Thirty-two male Wistar rats (97.1 ± 5.3 g) were randomly distributed among the treatments (8 animals/treatment), and individually housed in metabolic cages, with free access to feed and water. The period of adaptation to the experimental diets was 5 days. After that, the experimental period (15 days) began, when the determination of feed intake and the collection of the feces were made daily. The body weight of the animals was obtained every three days. These data and samples were collected to determine feed intake, body weight gain, apparent dry matter digestibility, apparent starch digestibility, wet and dry fecal production, fecal water content, fecal pH and fecal nitrogen excretion.

During adaptation and experimental period, temperature was maintained at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, and lighting was controlled by alternating periods of 12 hours of light and dark.

Analytical Methods

The determination of fecal water content ($105^{\circ}\text{C}/12\text{h}$) and fecal nitrogen (Micro-Kjeldahl) were carried out according to methods mentioned in AOAC (1995). Fecal pH was obtained from a solution of 1g of partly dried feces ($50^{\circ}\text{C}/48\text{h}$) in 10ml of distilled water.

Starch content of the experimental diets and feces was determined by the AOAC method 996.11 (1998), modified by Walter (2005). In this method, after the degradation of digestible starch (DS) by the combined use of α -amylase, protease and amyloglucosidase, RS is solubilized with dimethylsulfoxide and hydrolyzed with α -amylase and amyloglucosidase, and the resulting glucose determined by glucose oxidase-peroxidase reagent.

Apparent dry matter digestibility (ADMD) was calculated as the proportion of ingested dry matter that was not later recovered in the feces. Apparent starch digestibility (ASD) was calculated as the proportion of starch ingested that was not later recovered in the feces.

Experimental design and statistical analysis

The experiment was carried out in a completely random design. The results obtained were submitted to analysis of variance, with the means compared by Duncan's test at 5% of significance. The results were also submitted to correlation analysis at 5% of significance. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows 8.0 (1997).

Table 1. Composition (g/kg) of the experimental diets

	Control	3% RS	9% RS	18% RS
Cornstarch	620.692	564.622	452.472	284.242
Casein	140	140	140	140
Sucrose	100	100	100	100
Soybean oil	40	40	40	40
Purified cellulose	50	50	50	50
Novelose 260 [®]	0	56.07	168.22	336.45
Mineral and vitamin mix *	20	20	20	20
Sodium chloride	2.60	2.60	2.60	2.60
Bicalcium phosphate	15	15	15	15
Calcium carbonate	6	6	6	6
L-Cystine	1.8	1.8	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
TBHQ	8	8	8	8

* Mineral and vitamin mix (g or mg/kg mix): K 102.86g; S 8.57g; Mg 14.48g; Fe 1.00g; Zn 0.86g; Si 0.14g; Mn 0.30g; Cu 0.17g; Cr 0.028g; B 14.26mg; F 28.73mg; Ni 14.31mg; Li 2.85mg; Se 4.28mg; I 5.93mg; Mo 4.32mg; V 2.87mg; nicotinic acid 3.00g; Ca pantothenate 1.60g; pyridoxine-HCl 0.70g; thiamin-HCl 0.60g; riboflavin 0.60g; folic acid 0.20g; biotin 0.02g; vitamin B12 2.50g; vitamin E 15.00g; vitamin A 0.80g; vitamin D3 0.25g; vitamin K1 0.075g.

RESULTS AND DISCUSSION

Feed intake, body weight gain, apparent dry matter digestibility and apparent starch digestibility

The addition of RS to the experimental diets did not influence feed intake, but reflected significantly on body weight (Table 2). Similarly to the results observed in the present study, some researches have demonstrated that increases in diluting compounds, even though they reduce digestible energy in the diet, do not cause significant effect on feed intake and, many

times, on body weight gain of the animals (NRC, 1995). De Schrijver *et al.* (1999), Verbeek *et al.* (1995), Schulz *et al.* (1993) and Younes *et al.* (1995), using diets containing 6%, 14%, 24% and 24% of RS, respectively, also did not observe significant effects on feed intake and body weight in rats. In studies with humans, the inclusion of 30g of RS per day in the diet did not affect the body weight, although the subjects reported increased satiety (Jenkins *et al.* 1998). These results may be explained by the fact that, although the energy value of starch that was excreted intact in the feces is zero, fermented starch has a positive energy value, but significantly lower than that of starch which had been digested and absorbed in the form of glucose (Gee *et al.* 1991).

Table 2. Effect of increasing levels of resistant starch (RS) on animals' performance

	Control	3% RS	9% RS	18% RS
Feed intake (g)	104.06±11.15 ^a	101.91±10.27 ^a	103.91±3.31 ^a	99.95±9.18 ^a
Body weight gain (g)	1.34±4.89 ^a	1.01±2.93 ^a	-0.75±2.23 ^a	-6.76±4.22 ^b
ADMD * (%)	91.91±0.53 ^a	91.35±0.61 ^a	88.95±0.99 ^b	86.83±1.27 ^c
ASD † (%)	99.29±0.11 ^a	98.82±0.37 ^b	98.26±0.35 ^c	97.86±0.31 ^d

* Apparent dry matter digestibility

† Apparent starch digestibility

Results expressed as mean value ± standard deviation

Mean values followed by the same letter on the same line are not significantly different (Duncan's test at a level of 5% of significance).

The addition of 18% of RS in the diet did not affect feed intake, but significantly reduced the body weight gain of the animals (Table 2), which was also observed in the results by Morand *et al.* (1992), using the same level of RS in the diet of adult rats. Researches show that diets rich in RS reduce epididymal fat pads (De Deckere *et al.* 1993; De Deckere *et al.* 1995), probably due to the dilution of dietary energy caused by the substitution of DS by RS. Thus, it may reduce body fat and, consequently, body weight, just like the results obtained in

the present research.

The dilution effect of RS is evidenced by the reduced values of apparent dry matter digestibility (ADMD) in the present study, ascribed essentially to the lower apparent starch digestibility (ASD) (Table 2). However, we expected a more pronounced reduction in the ASD, in accordance with the RS levels of the experimental diets. This fact was not observed, because part of the RS that escapes digestion in the small intestine is fermented by the colonic bacteria, reducing the amount of starch excreted in the feces. Andrieux & Sacquet (1986) reported ASD values of 98% for conventional rats, compared to only 68% in germ free rats, demonstrating the effect of the microflora on RS fermentation. This increased bacterial activity may reflect significantly on quantitative and qualitative fecal characteristics, such as production and water content.

Wet and dry fecal production, and fecal water content

Wet and dry fecal production, although not affected by the addition of 3% of RS to the diet, was significantly increased with 9% and 18% of RS (Table 3). Fecal water content was significantly increased by RS addition, regardless of the level used (Table 3).

Table 3. Effect of increasing levels of resistant starch (RS) on fecal production and water content

	Control	3% RS	9% RS	18% RS
WFP * (g)	10.68±1.07 ^c	11.97±2.50 ^c	15.64±1.18 ^b	18.72±2.85 ^a
DFP † (g)	8.70±0.83 ^c	8.82±1.10 ^c	11.48±1.00 ^b	12.70±1.62 ^a
Fecal water content (%)	18.47±1.22 ^b	25.21±6.33 ^a	26.42±6.27 ^a	30.06±7.86 ^a

* Wet fecal production

† Dry fecal production

Results expressed as mean value ± standard deviation

Mean values followed by the same letter on the same line are not significantly different (Duncan's test at a level of 5% of significance).

De Schirjver *et al.* (1999), including 6% of RS to the diet of rats and pigs, also reported a significant increase in fecal production. Similarly, Faulks *et al.* (1989), De Deckere *et al.* (1995) and Verbeek *et al.* (1995) observed increased wet and dry fecal production adding 10%, 14% and 14% of RS to the diet of rats, respectively. In studies with humans, the consumption of 30 to 39g of RS per day, besides increasing fecal production, also facilitated defecation, but caused increased flatulence (Phillips *et al.* 1995; Jenkins *et al.* 1998).

Other studies also demonstrated that higher consumption of RS increases fecal production. Shetty & Kurpad (1986), providing 100g per day of cornstarch rich in RS, reported an increase of 30% in fecal mass, without modifying the transit time. Scheppach *et al.* (1988), by inhibiting starch small intestine digestion with acarbose, observed an increase of 68% in this measure.

This increase of fecal production cannot be attributed only to the resistance of starch to digestion, since its apparent digestibility was higher than expected (Table 3), but also due to its effects on bacteria present in the cecum and large intestine, and on water retention. Eastwood (1992) and Wenk (2001) reported that the increased bacterial activity in the gastrointestinal tract, promoted by the higher content of indigestible carbohydrates, increases the excretion of bacterial constituents, which may represent a significant part of the fecal mass.

Regarding the higher fecal water content, De Schrijver *et al.* (1999) and Gee *et al.* (1991) reported results similar to those obtained in the present study, adding, respectively, 6% and 10% of RS to the diet of rats.

Stephen & Cummings (1979) and Jeraci & Horvath (1989) explain that the increase in fecal water content of animals fed diets rich in indigestible compounds may not be related only to its hydration capacity, but also to a higher production and excretion of bacterial mass (demonstrated by the increased fecal nitrogen excretion and the reduced fecal pH – table 4),

which also has a high water-holding capacity.

The increased fecal production is important to prevent constipation and hemorrhoids, as well as to provide a substrate for increased bacterial growth, which increases production and concentration of potentially protective by-products while diluting production and concentration of potentially toxic compounds (Baghurst *et al.* 1996).

Fecal pH and nitrogen excretion

The increase of RS levels in the experimental diets significantly influenced fecal pH ($r = -0.90$; $p < 0.01$) and fecal nitrogen excretion ($r = 0.84$; $p < 0.01$) (Table 4).

Table 4. Resistant starch (RS) effects on fecal pH and nitrogen excretion

	Control	3% RS	9% RS	18% RS
Fecal Ph	6.42±0.08 ^a	6.12±0.15 ^b	5.73±0.21 ^c	5.41±0.22 ^d
Fecal nitrogen excretion (%)	2.66±0.12 ^c	2.66±0.12 ^c	2.88±0.04 ^b	3.22±0.22 ^a

Results expressed as mean value ± standard deviation

Mean values followed by the same letter on the same line are not significantly different (Duncan's test at a level of 5% of significance).

The decreased pH with RS consumption as well as the increased fecal concentration of short chain fatty acids was also observed in studies with humans (Phillips *et al.* 1995; Ahmed *et al.* 2000). Similarly, Hillman *et al.* (1983) reported a reduction in fecal pH with increasing levels of cellulose in diets for humans. This effect may be explained by the increase of indigestible carbohydrates available for fermentation, which, reaching the colon, are fermented by the microflora, resulting in the production of organic acids. Part of these acids is used by the organism, and part is excreted in the feces, resulting in lower pH, which is desirable for the maintenance of a healthy intestinal microflora.

The increase in fecal nitrogen excretion is also an indication of increased fermentative

activity in the cecocolic region of animals submitted to diets with higher levels of RS (Table 4). De Schrijver *et al.* (1999) and Younes *et al.* (1995) reported that the addition of 6% and 25% of RS to the diet of rats, respectively, significantly increased fecal nitrogen excretion. Likewise, the consumption of diets rich in fiber also increases fecal nitrogen excretion, which is normally associated with considerable development of cecum microflora (Eggum *et al.* 1984).

Probably, the results obtained in these studies, similar to those obtained in the present study, are due to the accelerated growth of cecocolic microorganisms, since the breakdown of high amounts of carbohydrates increases nitrogen incorporation in bacterial proteins (Demigné *et al.* 1980; Younes *et al.* 1995).

The nitrogen required for optimal bacterial growth is provided by proteins escaping small intestine breakdown, endogenous proteins (pancreatic and intestinal secretions, sloughed epithelial cells), or blood urea diffusing into digestive contents (Younes *et al.* 1995). Therefore, the increase in fecal nitrogen excretion could correspond to an increased fecal excretion of bacterial proteins and to a shift of nitrogen excretion from urine to the feces (Demigné & Rémésy, 1982).

Several sources of nitrogen used for rapid bacterial growth are metabolites of protein (phenol, cresol, indoles, amines and ammonia) that may have deleterious effects on the organism, such as development of skin, bladder and bowel cancer. So the presence of fermentable carbohydrates in the colon, neutralizing these metabolites, reduce the risk of certain kinds of cancer (Tharanathan, 2002). Besides, the shift of nitrogen excretion from urine to feces may help the management of chronic renal disease (Younes *et al.* 1995).

Through the results obtained in the present study, we may conclude that, except for feed intake, RS significantly affected all other evaluated parameters. These effects are essentially attributed to the lower apparent starch digestibility and its fermentation by the

intestinal microbiota, which demonstrate its beneficial effect on health maintenance.

The authors acknowledge the financial support granted by “Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”, National Starch & Chemical Industrial Ltda for the donation of Novelose 260[®], and Novozymes Latin American Limited for the donation of the enzymes used in resistant starch determination.

REFERENCES

- Ahmed R, Segal I & Hassan H (2000) Fermentation of dietary starch in humans. *Am J Gastroenterol* **95**, 1017-1020.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists (1995) *Official Methods of Analysis of the AOAC International*, 16th ed., supplement 1998. Washington: AOAC.
- Andrieux C & Sacquet E (1986) Effects of amylo maize starch on mineral metabolism in the adult rat: role of the microflora. *J Nutr* **116**, 991-998.
- Baghurst PA, Baghurst KI & Record SJ (1996) Dietary fibre, non-starch polysaccharides and resistant starch – a review. *Food Aust* **48**, S3-S35.
- Bianchini F, Caderni G, Magno C, Testolin G & Dolaro P (1992) Profile of short-chain fatty acids and rectal proliferation in rats fed sucrose or cornstarch diets. *J Nutr* **122**, 254-261.
- De Deckere EAM, Kloots WJ & Van Amelsvoort JMM (1993) Resistant starch decreases serum total cholesterol and triacylglycerol concentrations in rats. *J Nutr* **123**, 2142-2151.
- De Deckere EAM, Kloots WJ & Van Amelsvoort JMM (1995) Both raw and retrograded starch decrease serum triacylglycerol concentration and fat accretion in the rat. *Br J Nutr* **73**, 287-298.
- De Schrijver R, Vanhoof K & Vande Ginste J (1999) Nutrient utilization in rats and pigs fed enzyme resistant starch. *Nutr Res* **19**, 1349-1361.

- Demigné C, Rémésy C & Rayssiguier Y (1980) Effect of fermentable carbohydrates in volatile fatty acids, ammonia and mineral absorption in the rat caecum. *Reprod Nutr Dev* **20**, 1351-1359.
- Demigné C & Rémésy C (1982) Influence of unrefined potato starch on cecal fermentations and volatile fatty acid absorption in rats. *J Nutr* **112**, 2227-2234.
- Eastwood MA (1992) The physiological effect of dietary fiber: an update. *Annu Rev Nutr* **12**, 19-35.
- Eggum BO, Beames RM, Wolstrup J & Bach Knudsen KE (1984) The effect of protein quality and fibre level in the diet and microbial activity in the digestive tract on protein utilization and energy digestibility in rats. *Br J Nutr* **51**, 305-314.
- Faisant N, Champ M, Colonna P & Buléon A (1993) Structural discrepancies in resistant starch obtained in vivo in humans and in vitro. *Carbohydr Polym* **21**, 205-209.
- Faulks RM, Southon S & Livesey G (1989) Utilization of α -amylase (EC 3.2.1.1) resistant maize and pea (*Pisum sativum*) starch in the rat. *Br J Nutr* **61**, 291-300.
- Gee JM, Faulks RM & Johnson IT (1991) Physiological effects of retrograded, α -amylase-resistant cornstarch in rats. *J Nutr* **121**, 44-49.
- Haralampu SG (2000) Resistant starch – a review of the physical properties and biological impact of RS₃. *Carbohydr Polym* **41**, 285-292.
- Hillman L, Peters S, Fischer A & Pomare EW (1983) Differing effects of pectin, cellulose and lignin on stool pH, transit time and weight. *Br J Nutr* **50**, 189-195.
- Jenkins DJA, Wolever TM & Jenkins AL (1988) Starchy foods and glycemic index. *Diabetes Care* **11**, 149-159.
- Jenkins DJA, Vuksan V, Kendall CWC, Würsch P, Jeffcoat R, Waring S, Mehling CC, Vidgen E, Augustin LSA & Wong E (1998) Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. *J Am Coll Nutr* **17**, 609-

616.

Jeraci JL & Horvath PS (1989) In vitro fermentation of dietary fiber by human fecal organisms. *Anim Feed Sci Tech* **23**, 121-140.

Kabir M, Rizkalla SW, Champ M, Luo J, Boillot J, Bruzzo F & Slama G (1998) Dietary amylose-amylopectin starch content affects glucose and lipid metabolism in adipocytes of normal and diabetic rats. *J Nutr* **128**, 35-43.

Morand C, Rémésy C, Levrat MA & Demigné C (1992) Replacement of digestible wheat starch by resistant cornstarch alters splanchnic metabolism in rats. *J Nutr* **122**, 345-354.

NRC - National Research Council (1995) *Nutrient Requirement of Laboratory Animals – Nutrient Requirement of Domestic Animals*. Washington: National Academy Press

Phillips J, Muir JG, Birkett A, Lu ZX, Jones GP, O’Dea K & Young GP (1995) Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans. *Am J Clin Nutr* **62**, 121-130.

Reeves PG, Nielsen FH & Fahey Jr GC (1993) 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. *J Nutr* **23**, 1939-1951.

Scheppach W, Fabian C, Ahrens F, Spengler M & Kasper H (1988) Effect of starch malabsorption on colonic function and metabolism in humans. *Gastroenterology* **95**, 1549-1555.

Schulz AGM, Van Amelsvoort JMM & Beynen AC (1993) Dietary native resistant starch but not retrograded resistant starch raises magnesium and calcium absorption in rats. *J Nutr* **123**, 1724-1731.

Shetty PS & Kurpad AV (1986) Increasing starch intake in the human diet increases fecal bulk. *Am J Clin Nutr* **43**, 210-212.

Stephen AM & Cummings JH (1979) Water-holding by dietary fibre in vitro and its

- relationship to faecal output in man. *Gut* **20**, 722-729.
- Tharanathan RN (2002) Food-derived carbohydrates – Structural complexity and functional diversity. *Crit Rev Biotechnol* **22**, 65-84.
- Verbeek MJF, De Deckere EAM, Tijburg LBM, Van Amelsvoort JMM & Beynen AC (1995) Influence of dietary retrograded starch on the metabolism of neutral steroids and bile acids in rats. *Br J Nutr* **74**, 807-820.
- Walter M (2005) Amido resistente: metodologias de quantificação e resposta biológica em ratos. Masters Dissertation. Universidade Federal de Santa Maria.
- Wenk C (2001) The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. *Anim Feed Sci Tech* **90**, 21-33.
- Younes H, Demigné C, Behr S & Rémésy C (1995) Resistant starch exerts a lowering effect on plasma urea by enhancing urea N transfer into the large intestine. *Nutr Res* **15**, 1199-1210.
- Yue P & Waring S (1998) Resistant starch in food applications. *Cereal Food World* **43**, 690-695.

3.3. ARTIGO 3 – VERSÃO EM PORTUGUÊS

Submetido ao British Journal of Nutrition
(Configuração conforme normas da revista – Anexo 4)

EFEITO DO AMIDO RESISTENTE SOBRE A RESPOSTA BIOLÓGICA EM RATOS

M. WALTER¹, L. P. DA SILVA^{1,2}, D. M. X. PERDOMO¹

¹ Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais, Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – USFM – CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

² ProDoc, beneficiária de auxílio financeiro CAPES – Brasil

O amido resistente (AR) vem sendo intensamente pesquisado nos últimos anos devido aos seus efeitos benéficos, tais como diluição da energia da dieta, aumento da excreção fecal e desenvolvimento de microrganismos benéficos no trato intestinal, entre outros. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do AR da dieta sobre alguns parâmetros de resposta biológica. Foram utilizados ratos machos Wistar (97,1±5,3g) alimentados com rações experimentais suplementadas com 0%, 3%, 9% e 18% de AR. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 5 dias e, durante o período experimental (15 dias), foram obtidos dados e amostras para a determinação do consumo, ganho de peso, digestibilidade aparente da matéria seca e do amido, produção de fezes úmidas e secas, umidade e pH das fezes, e excreção fecal de nitrogênio. A adição de AR às rações não influenciou o consumo, mas diminuiu significativamente o peso dos animais. A produção de fezes úmidas e secas foi significativamente maior com níveis de 9% e 18% de AR. O acréscimo no consumo de AR também aumentou significativamente o teor de umidade e a excreção de nitrogênio nas fezes, bem como diminuiu o pH fecal. Os efeitos observados neste trabalho podem ser essencialmente atribuídos à menor digestibilidade aparente do amido e a sua fermentação pela microbiota intestinal, o que demonstra seu efeito benéfico no auxílio à manutenção da saúde.

Desempenho: produção de fezes: excreção de nitrogênio

Atualmente, sabe-se que várias doenças são decorrentes de uma alimentação inadequada, muitas delas relacionadas ao consumo insuficiente de fibras. Embora essa fração exerça efeitos biológicos importantes à manutenção da saúde, seu consumo é restrito devido, especialmente, as suas propriedades sensoriais, visto que a adição de fontes tradicionais de fibra provocam alterações organolépticas pronunciadas nos alimentos (ex. pão enriquecido com farelo de trigo) (Yue & Waring, 1998).

Neste contexto, surge a opção de uso de outro carboidrato indigestível, o amido resistente (AR), definido como a soma do amido e produtos de sua degradação não absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis (Faisant *et al.* 1993). Este possui propriedades semelhantes às da fibra, porém com características organolépticas menos pronunciadas.

Por não ser digerido pelas enzimas no trato gastrointestinal humano, o AR é considerado um diluidor de energia da dieta, podendo levar a alterações significativas no peso corporal (Morand *et al.* 1992), bem como contribuir para o aumento da massa fecal, agir na prevenção da constipação, diverticulose e hemorróidas, além de diluir compostos tóxicos (Yue & Waring, 1998). Esta fração também tem sido associada a respostas glicêmica e insulinêmica reduzidas, o que pode ter implicações benéficas no controle do diabetes (Kabir *et al.* 1998); e à redução nos níveis de colesterol e triglicerídios (Jenkins *et al.* 1988; De Deckere *et al.* 1995).

Atuando como substrato para o crescimento de microrganismos benéficos, o AR apresenta-se como um potencial agente prebiótico (Haralampu, 2000). Além disso, os produtos de sua fermentação reduzem o pH no ceco e nas fezes (Bianchini *et al.* 1992; Ahmed *et al.* 2000) e auxiliam na prevenção de doenças inflamatórias do intestino e de certos tipos de câncer (Tharanathan, 2002).

Em vista do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do AR sobre alguns parâmetros de resposta biológica em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Rações experimentais e tratamentos

Foram formuladas quatro rações (Tabela 1), de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition (AIN) (Reeves, 1993), todas contendo quantidade equivalente de proteína, gordura, vitaminas, minerais e carboidratos totais, mas diferenciadas quanto ao teor de AR. Como fonte de amido foi utilizado amido de milho contendo menos de 0,1% de AR. Como fonte de AR foi utilizado amido de milho com alto teor de amilose (Novelose 260[®]), contendo 53,5% de AR, obtido da National Starch & Chemical Industrial Ltda (São Paulo, Brasil). Essas rações formaram os tratamentos:

- **Controle:** ração não suplementada com AR;
- **3% AR:** ração com substituição parcial do amido de milho por Novelose 260[®] de modo a obter 3% de AR na composição total;
- **9% AR:** ração com substituição parcial do amido de milho por Novelose 260[®] de modo a obter 9% de AR na composição total;
- **18% AR:** ração com substituição parcial do amido de milho por Novelose 260[®] de modo a obter 18% de AR na composição total.

Animais experimentais e condução do experimento

Para a realização do experimento, foram utilizados 32 ratos machos Wistar ($97,1 \pm 5,3$ g), distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos (8 animais/tratamento), e alojados em gaiolas metabólicas individuais, com acesso livre à ração e à água. O período de adaptação dos animais às rações foi de cinco dias. Na seqüência, teve início o período experimental (15 dias), no qual foi realizado, diariamente, a determinação da quantidade de ração consumida e a coleta de fezes. O peso corporal dos animais foi obtido a cada 3 dias. Estes dados e amostras foram coletados a fim de determinar o consumo, ganho de peso, digestibilidade aparente da

matéria seca e do amido, produção de fezes úmidas e secas, umidade e pH das fezes e excreção de nitrogênio nas fezes.

Durante todo o período do ensaio biológico a temperatura foi mantida a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, e a luminosidade controlada alternando 12 horas de luz/escuro.

Métodos analíticos

As determinações de umidade ($105^{\circ}\text{C}/12\text{horas}$) e nitrogênio nas fezes (Micro-Kjeldahl) foram realizadas segundo metodologias descritas na AOAC (1995). O pH fecal foi obtido a partir de uma solução de 1g de fezes parcialmente secas ($50^{\circ}\text{C}/48\text{horas}$) em 10ml de água destilada.

O amido nas rações e nas fezes foi determinado segundo o método da AOAC 996.11 (1998), modificado por Walter (2005). Neste, após a degradação da fração digestível do amido pelo uso combinado de α -amilase, protease e amiloglicosidase, o AR é solubilizado com dimetilsulfóxido e hidrolisado com α -amilase e amiloglicosidase, sendo a glicose resultante quantificada por reação com o reagente glicose-oxidase peroxidase.

A digestibilidade aparente da matéria seca (DAMS) foi determinada como a proporção de matéria seca consumida que não foi recuperada nas fezes. A digestibilidade aparente do amido (DAA) foi determinada como a proporção de amido consumido não recuperado nas fezes.

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento completamente casualizado. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de significância. Os resultados também foram submetidos à análise de correlação a 5% de significância. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS for Windows 8.0 (1997).

Tabela 1. Composição (g/kg) das rações experimentais fornecidas aos ratos

	Controle	3% AR	9% AR	18% AR
Amido de milho	620,692	564,622	452,472	284,242
Caseína	140	140	140	140
Sacarose	100	100	100	100
Óleo de soja	40	40	40	40
Celulose purificada	50	50	50	50
Novelose 260 [®]	0	56,07	168,22	336,45
Mix mineral e vitamínico *	20	20	20	20
Cloreto de sódio	2,60	2,60	2,60	2,60
Fosfato bicálcico	15	15	15	15
Carbonato de cálcio	6	6	6	6
L-Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
TBHQ	8	8	8	8

* Mix mineral e vitamínico (g ou mg/kg mix): K 102,86g; S 8,57g; Mg 14,48g; Fe 1,00g; Zn 0,86g; Si 0,14g; Mn 0,30g; Cu 0,17g; Cr 0,028g; B 14,26mg; F 28,73mg; Ni 14,31mg; Li 2,85mg; Se 4,28mg; I 5,93mg; Mo 4,32mg; V 2,87mg; ácido nicotínico 3,00g; pantotenato de cálcio 1,60g; piridoxina-HCl 0,70g; tiamina-HCl 0,60g; riboflavina 0,60g; ácido fólico 0,20g; biotina 0,02g; vitamina B12 2,50g; vitamina E 15,00g; vitamina A 0,80g; vitamina D3 0,25g; vitamina K1 0,075g.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Consumo, ganho de peso, digestibilidade aparente da matéria seca e do amido

A adição de AR às rações experimentais não influenciou o consumo, mas se refletiu significativamente sobre o peso dos animais (Tabela 2). A exemplo do que se observou neste trabalho, algumas pesquisas têm demonstrado que aumentos nos níveis de compostos considerados diluidores, mesmo diminuindo a energia digestível da dieta, não causam efeitos significativos no consumo de ração e, muitas vezes, no ganho de peso dos animais (NRC,

1995). De Schrijver *et al.* (1999), Verbeek *et al.* (1995), Schulz *et al.* (1993) e Younes *et al.* (1995), ao fornecerem rações contendo níveis de 6%, 14%, 24% e 24% de AR, respectivamente, também não observaram efeitos significativos sobre o consumo e o peso de ratos. Em estudos com humanos, a inclusão de 30g de AR por dia na dieta não teve efeito sobre o peso, ainda que os participantes tenham declarado maior sensação de saciedade (Jenkins *et al.* 1998). Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que, embora o valor energético do amido excretado intacto nas fezes seja zero, o amido fermentado apresenta valor energético positivo, mas significativamente menor do que aquele do amido digerido e absorvido na forma de glicose (Gee *et al.* 1991).

Tabela 2. Efeito de níveis crescentes de amido resistente (AR) sobre o desempenho dos animais

	Controle	3% AR	9% AR	18% AR
Consumo (g)	104,06±11,15 ^a	101,91±10,27 ^a	103,91±3,31 ^a	99,95±9,18 ^a
Ganho de peso (g)	1,34±4,89 ^a	1,01±2,93 ^a	-0,75±2,23 ^a	-6,76±4,22 ^b
DAMS * (%)	91,91±0,53 ^a	91,35±0,61 ^a	88,95±0,99 ^b	86,83±1,27 ^c
DAA † (%)	99,29±0,11 ^a	98,82±0,37 ^b	98,26±0,35 ^c	97,86±0,31 ^d

* Digestibilidade aparente da matéria seca

† Digestibilidade aparente do amido

Resultados expressos como média ± desvio padrão

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de significância.

A adição de 18% de AR à ração não afetou o consumo, porém diminuiu significativamente o ganho de peso dos animais (Tabela 2), o que também foi observado nos resultados obtidos por Morand *et al.* (1992) utilizando o mesmo nível deste amido em dieta para ratos adultos. Estudos mostram que dietas com alto teor de AR levam à diminuição da gordura epididimal (De Deckere *et al.* 1993; De Deckere *et al.* 1995), provavelmente

decorrente da diluição da energia da dieta provocada pela substituição do amido disponível por AR. Sendo assim, pode ocorrer redução da gordura corporal e, conseqüentemente, do peso dos indivíduos, a exemplo do que se constatou no presente trabalho.

O efeito diluidor do AR é evidenciado pelos valores reduzidos de digestibilidade aparente da matéria seca (DAMS) encontrados neste trabalho, atribuídos essencialmente à menor digestibilidade aparente do amido (DAA) (Tabela 2). Entretanto, esperava-se uma redução mais pronunciada na DAA, condizente com os valores de AR adicionados às dietas. Este fato não foi observado, porque parte do AR que escapa à digestão no intestino delgado é fermentada pela flora bacteriana, reduzindo a quantidade de amido excretado nas fezes. Em estudo desenvolvido por Andrieux & Sacquet (1986) observou-se valores de DAA de 98% para ratos convencionais, enquanto que para aqueles tratados com antibióticos a DAA foi de 68%, demonstrando o efeito da flora bacteriana na fermentação do AR. Este aumento na atividade bacteriana pode se refletir significativamente sobre características quantitativas e qualitativas das fezes, tais como produção e umidade.

Produção de fezes úmidas e secas, e umidade das fezes

A produção de fezes úmidas e secas, embora não tenha sido afetada pela adição de 3% de AR à ração, foi significativamente maior com níveis de 9% e 18% (Tabela 3). Já, o teor de umidade das fezes foi significativamente aumentado pela adição de AR, independente do nível utilizado (Tabela 3).

De Schirjver *et al.* (1999), incluindo 6% desta fração à dieta de ratos e porcos, também observou aumento significativo na produção de fezes. Da mesma forma, Faulks *et al.* (1989), De Deckere *et al.* (1995) e Verbeek *et al.* (1995) observaram maior produção de fezes úmidas e secas com a adição de 10%, 14% e 14% de AR à dieta de ratos, respectivamente. Em estudos com humanos, o consumo de 30 a 39g por dia deste amido, além de aumentar a

produção de fezes, facilitou a defecação, embora tenha provocado aumento da flatulência (Phillips *et al.* 1995; Jenkins *et al.* 1998).

Tabela 3. Efeito de níveis crescentes de amido resistente (AR) sobre produção e umidade das fezes

	Controle	3% AR	9% AR	18% AR
PFU* (g)	10,68±1,07 ^c	11,97±2,50 ^c	15,64±1,18 ^b	18,72±2,85 ^a
PFS † (g)	8,70±0,83 ^c	8,82±1,10 ^c	11,48±1,00 ^b	12,70±1,62 ^a
Umidade das fezes (%)	18,47±1,22 ^b	25,21±6,33 ^a	26,42±6,27 ^a	30,06±7,86 ^a

* Produção de fezes úmidas

† Produção de fezes secas

Resultados expressos como média ± desvio padrão

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de significância.

Outros trabalhos também têm demonstrado que o maior consumo de AR aumenta a excreção fecal. Shetty & Kurpad (1986), fornecendo 100g/dia de amido de milho rico em AR, observaram aumento de 30% da massa fecal, sem modificação no tempo de trânsito. Já, Scheppach *et al.* (1988), inibindo a digestão do amido no intestino delgado com acarbose, observaram aumento de 68% na produção desta medida.

Esse aumento da massa fecal não pode ser atribuído somente à resistência do amido à digestão, visto que sua digestibilidade aparente foi maior do que a esperada (Tabela 2), mas também aos seus efeitos sobre a microbiota presente no ceco e intestino grosso, bem como, sobre a retenção de umidade. Eastwood (1992) e Wenk (2001), relatam que a maior atividade microbiana no trato gastrintestinal, provocada pela elevação nos teores de carboidratos indigestíveis, causa aumento na excreção de substâncias microbianas, as quais podem representar uma porcentagem significativa da massa fecal.

Quanto ao maior teor de umidade nas fezes, De Schrijver *et al.* (1999) e Gee *et al.*

(1991) também obtiveram resultados semelhantes aos do presente trabalho, adicionando, respectivamente, 6% e 10% de AR à dieta de ratos.

Stephen & Cummings (1979) e Jeraci & Horvath (1989) explicam que a maior umidade das fezes de animais recebendo dietas com teores elevados de compostos indigestíveis pode não estar relacionada somente com a maior capacidade de hidratação destes, mas também com a maior produção e excreção de massa bacteriana (demonstrada pelo aumento na excreção fecal de nitrogênio e redução do pH fecal – Tabela 4) que, por sua vez, também possui alta capacidade de retenção de água.

O aumento na produção de fezes é importante para prevenir constipação e hemorróidas, assim como para fornecer substrato ao crescimento bacteriano, o que aumenta a produção e concentração de produtos potencialmente protetores, enquanto dilui a produção e concentração de compostos potencialmente tóxicos (Baghurst *et al.* 1996).

pH e nitrogênio das fezes

A elevação nos teores de AR nas rações experimentais influenciou significativamente o pH ($r = -0,90$; $p < 0,01$) e a excreção de nitrogênio nas fezes ($r = 0,84$; $p < 0,01$) (Tabela 4).

A redução no pH com o consumo de AR, bem como o aumento na concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) nas fezes, também foi observada em estudos com humanos (Phillips *et al.* 1995; Ahmed *et al.* 2000). De forma semelhante, Hillman *et al.* (1983) observaram redução no pH fecal com o aumento nos teores de celulose em dietas consumidas por humanos. Este efeito pode ser explicado pelo aumento de carboidratos indigestíveis disponíveis à fermentação os quais, ao atingirem o cólon, são fermentados pela flora bacteriana, resultando na produção de ácidos orgânicos. Parte destes ácidos é utilizada pelo organismo, e parte é excretada nas fezes, resultando na redução do pH, o que é desejável à manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal.

O aumento na excreção de nitrogênio também é indicativo de maior atividade fermentativa na região cecocólica de animais submetidos a dietas com níveis mais elevados de AR (Tabela 4). De Schrijver *et al.* (1999) e Younes *et al.* (1995), observaram que a adição de 6% e 25% de AR à dieta de ratos, respectivamente, aumentou de forma significativa a excreção fecal de nitrogênio. De modo semelhante, o consumo de dietas acrescidas de fibra também aumenta a excreção fecal de nitrogênio, o que geralmente é associado ao desenvolvimento considerável da microflora do ceco (Eggum *et al.* 1984).

Tabela 4. Efeito de níveis crescentes de amido resistente (AR) sobre o pH fecal e excreção de nitrogênio nas fezes

	Controle	3% AR	9% AR	18% AR
pH fecal	6,42±0,08 ^a	6,12±0,15 ^b	5,73±0,21 ^c	5,41±0,22 ^d
Nitrogênio nas fezes (%)	2,66±0,12 ^c	2,66±0,12 ^c	2,88±0,04 ^b	3,22±0,22 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de significância.

Provavelmente os resultados obtidos nestes trabalhos, semelhantes aos nossos, sejam devido ao crescimento acelerado de microorganismos cecocólicos, uma vez que a quebra de grandes quantidades de carboidratos aumenta a incorporação de nitrogênio às proteínas bacterianas (Demigné *et al.* 1980; Younes *et al.* 1995).

O nitrogênio necessário ao crescimento bacteriano ótimo é fornecido pelas proteínas não digeridas no intestino delgado, pelas proteínas endógenas (secreções pancreática e intestinal, células epiteliais descamadas), ou pela uréia sanguínea transferida para o ceco (Younes *et al.* 1995). Portanto, a maior excreção fecal de nitrogênio poderia corresponder a um aumento na excreção fecal de proteínas bacterianas e a uma troca da excreção de nitrogênio da urina para as fezes (Demigné & Rémésy, 1982).

Várias das fontes de nitrogênio utilizadas para o rápido crescimento bacteriano são metabólitos protéicos (fenol, cresol, indol, aminas e amônia) que apresentam efeitos deletérios ao organismo, como desenvolvimento de câncer de pele, bexiga e intestino. Desta maneira, a presença de carboidratos fermentáveis no cólon, atuando como neutralizadores destes metabólitos, diminuem o risco de certos tipos de câncer (Tharanathan, 2002). Além disso, o desvio da excreção de nitrogênio da via renal à fecal pode auxiliar no controle de doença renal crônica (Younes *et al.* 1995).

Pelos resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir que, exceto para o consumo, todos os outros parâmetros avaliados foram significativamente afetados pelos níveis de AR na dieta. Estes efeitos são essencialmente atribuídos à menor digestibilidade aparente do amido e a sua fermentação pela microbiota intestinal, o que demonstra seu efeito benéfico no auxílio à manutenção da saúde.

Os autores agradecem à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, National Starch & Chemical Industrial Ltda pela doação da Novelose 260[®], e Novozymes Latin American Limited pela doação das enzimas utilizadas nas análises de amido resistente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed R, Segal I & Hassan H (2000) Fermentation of dietary starch in humans. *Am J Gastroenterol* **95**, 1017-1020.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists (1995) *Official Methods of Analysis of the AOAC International*, 16th ed., supplement 1998. Washington: AOAC.
- Andrieux C & Sacquet E (1986) Effects of amylo maize starch on mineral metabolism in the adult rat: role of the microflora. *J Nutr* **116**, 991-998.

- Baghurst PA, Baghurst KI & Record SJ (1996) Dietary fibre, non-starch polysaccharides and resistant starch – a review. *Food Aust* **48**, S3-S35.
- Bianchini F, Caderni G, Magno C, Testolin G & Dolaro P (1992) Profile of short-chain fatty acids and rectal proliferation in rats fed sucrose or cornstarch diets. *J Nutr* **122**, 254-261.
- De Deckere EAM, Kloots WJ & Van Amelsvoort JMM (1993) Resistant starch decreases serum total cholesterol and triacylglycerol concentrations in rats. *J Nutr* **123**, 2142-2151.
- De Deckere EAM, Kloots WJ & Van Amelsvoort JMM (1995) Both raw and retrograded starch decrease serum triacylglycerol concentration and fat accretion in the rat. *Br J Nutr* **73**, 287-298.
- De Schrijver R, Vanhoof K & Vande Ginste J (1999) Nutrient utilization in rats and pigs fed enzyme resistant starch. *Nutr Res* **19**, 1349-1361.
- Demigné C, Rémésy C & Rayssiguier Y (1980) Effect of fermentable carbohydrates in volatile fatty acids, ammonia and mineral absorption in the rat caecum. *Reprod Nutr Dev* **20**, 1351-1359.
- Demigné C & Rémésy C (1982) Influence of unrefined potato starch on cecal fermentations and volatile fatty acid absorption in rats. *J Nutr* **112**, 2227-2234.
- Eastwood MA (1992) The physiological effect of dietary fiber: an update. *Annu Rev Nutr* **12**, 19-35.
- Eggum BO, Beames RM, Wolstrup J & Bach Knudsen KE (1984) The effect of protein quality and fibre level in the diet and microbial activity in the digestive tract on protein utilization and energy digestibility in rats. *Br J Nutr* **51**, 305-314.
- Faisant N, Champ M, Colonna P & Buléon A (1993) Structural discrepancies in resistant starch obtained in vivo in humans and in vitro. *Carbohydr Polym* **21**, 205-209.
- Faulks RM, Southon S & Livesey G (1989) Utilization of α -amylase (EC 3.2.1.1) resistant maize and pea (*Pisum sativum*) starch in the rat. *Br J Nutr* **61**, 291-300.

- Gee JM, Faulks RM & Johnson IT (1991) Physiological effects of retrograded, α -amylase-resistant cornstarch in rats. *J Nutr* **121**, 44-49.
- Haralampu SG (2000) Resistant starch – a review of the physical properties and biological impact of RS₃. *Carbohydr Polym* **41**, 285-292.
- Hillman L, Peters S, Fischer A & Pomare EW (1983) Differing effects of pectin, cellulose and lignin on stool pH, transit time and weight. *Br J Nutr* **50**, 189-195.
- Jenkins DJA, Wolever TM & Jenkins AL (1988) Starchy foods and glycemic index. *Diabetes Care* **11**, 149-159.
- Jenkins DJA, Vuksan V, Kendall CWC, Würsch P, Jeffcoat R, Waring S, Mehling CC, Vidgen E, Augustin LSA & Wong E (1998) Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. *J Am Coll Nutr* **17**, 609-616.
- Jeraci JL & Horvath PS (1989) In vitro fermentation of dietary fiber by human fecal organisms. *Anim Feed Sci Tech* **23**, 121-140.
- Kabir M, Rizkalla SW, Champ M, Luo J, Boillot J, Bruzzo F & Slama G (1998) Dietary amylose-amylopectin starch content affects glucose and lipid metabolism in adipocytes of normal and diabetic rats. *J Nutr* **128**, 35-43.
- Morand C, Rémésy C, Levrat MA & Demigné C (1992) Replacement of digestible wheat starch by resistant cornstarch alters splanchnic metabolism in rats. *J Nutr* **122**, 345-354.
- NRC - National Research Council (1995) *Nutrient Requirement of Laboratory Animals – Nutrient Requirement of Domestic Animals*. Washington: National Academy Press
- Phillips J, Muir JG, Birkett A, Lu ZX, Jones GP, O’Dea K & Young GP (1995) Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans. *Am J Clin Nutr* **62**, 121-130.
- Reeves PG, Nielsen FH & Fahey Jr GC (1993) 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. *J Nutr* **23**, 1939-1951.
- Scheppach W, Fabian C, Ahrens F, Spengler M & Kasper H (1988) Effect of starch malabsorption on colonic function and metabolism in humans. *Gastroenterology* **95**, 1549-1555.
- Schulz AGM, Van Amelsvoort JMM & Beynen AC (1993) Dietary native resistant starch but not retrograded resistant starch raises magnesium and calcium absorption in rats. *J Nutr* **123**, 1724-1731.
- Shetty PS & Kurpad AV (1986) Increasing starch intake in the human diet increases fecal bulk. *Am J Clin Nutr* **43**, 210-212.
- Stephen AM & Cummings JH (1979) Water-holding by dietary fibre in vitro and its relationship to faecal output in man. *Gut* **20**, 722-729.
- Tharanathan RN (2002) Food-derived carbohydrates – Structural complexity and functional diversity. *Crit Rev Biotechnol* **22**, 65-84.
- Verbeek MJF, De Deckere EAM, Tijburg LBM, Van Amelsvoort JMM & Beynen AC (1995) Influence of dietary retrograded starch on the metabolism of neutral steroids and bile acids in rats. *Br J Nutr* **74**, 807-820.
- Walter M (2005) Amido resistente: metodologias de quantificação e resposta biológica em ratos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria.
- Wenk C (2001) The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. *Anim Feed Sci Tech* **90**, 21-33.
- Younes H, Demigné C, Behr S & Rémésy C (1995) Resistant starch exerts a lowering effect on plasma urea by enhancing urea N transfer into the large intestine. *Nutr Res* **15**, 1199-1210.

Yue P & Waring S (1998) Resistant starch in food applications. *Cereal Food World* **43**, 690-695.

4. DISCUSSÃO

Várias das doenças que acometem a população mundial atualmente são decorrentes de uma dieta desequilibrada, muitas delas causadas pelo consumo excessivo de alimentos refinados, pobres em fibra. Embora os efeitos benéficos dessa fração sejam extensamente relatados, seu consumo é pouco atrativo devido ao seu sabor acentuado, baixa palatabilidade e textura grosseira, que alteram as características organolépticas dos alimentos. Neste contexto, surge a opção pelo uso de amido resistente, uma outra fonte de carboidrato indigestível que, ao contrário da maioria das fontes de fibra utilizadas, apresenta pouca ou nenhuma interferência na palatabilidade.

A quantificação adequada dessa fração é o primeiro passo para que se possa usufruir adequadamente de seus benefícios. Para tal, deve-se considerar que o método analítico 996.11 recomendado pela AOAC pode apresentar problemas na quantificação do amido disponível e resistente, em função da não utilização de protease. Sem esta enzima, a hidrólise do amido pode ser dificultada devido à presença de uma camada protéica ao redor do grânulo, a qual impediria a adsorção das enzimas amilolíticas à superfície deste, e pela formação de complexos proteína-amido, principalmente durante o processamento. Nesta situação, os resultados de amido disponível poderiam ser subestimados, enquanto os de amido resistente seriam superestimados, o que salienta a importância da inclusão da hidrólise protéica no método analítico estudado. Os resultados obtidos na presente pesquisa (Artigo 2) demonstraram variações significativas no teor de amido disponível e resistente em um mesmo alimento, influenciadas pela presença ou ausência de hidrólise proteolítica no método preconizado. A partir destas observações, pode-se concluir que o uso de protease no método de quantificação do amido disponível e resistente preconizado pela AOAC é importante, já que aproxima o processo de hidrólise da análise *in vitro* com os eventos digestivos no trato gastrointestinal.

Quanto à operacionalidade e precisão metodológicas, constatou-se que a utilização de maior quantidade de material em relação ao preconizado pelo método diminuiu a variação entre as replicatas, o que é desejável. Ainda, quanto a economicidade os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que a substituição do tampão MOPS por tampão fosfato, ao mesmo tempo que não alterou os resultados, proporcionou menor custo à análise.

Sendo assim, a recomendação resultante desta pesquisa é que seja usado, juntamente com o aumento na quantidade de amostra e utilização do tampão fosfato, a inclusão da

protease no processo de digestão enzimática.

Com um método adequado para a quantificação do amido resistente nos diversos alimentos é possível manipular seus níveis de acordo com os efeitos biológicos pretendidos, o que é demonstrado no Artigo 3. Neste, foi possível visualizar que o amido resistente pode ser utilizado como auxiliar no tratamento da constipação, em função do aumento na umidade e produção de fezes, ou em dietas de redução de peso, tendo em vista o menor peso corporal dos animais. A diminuição no pH fecal, aliada ao aumento na excreção de nitrogênio nas fezes, sugere a seletividade das bactérias acidófilas ao amido resistente, ou seja, o efeito prebiótico desta fração. Estes microrganismos são essenciais para a manutenção da saúde do trato intestinal e inibição do desenvolvimento de agentes oportunistas (ex. *Salmonella* sp), responsáveis por diversas infecções intestinais. Os produtos gerados pela fermentação do AR, em especial o butirato, também têm demonstrado ser importante fonte energética aos enterócitos, bem como, atuam na renovação das células epiteliais, diminuindo os riscos de mutagênese, que muitas vezes levam ao desenvolvimento de câncer.

Assim, pode-se inferir que mesmo o consumo de níveis relativamente baixos de amido resistente é capaz de exercer efeitos benéficos ao organismo, os quais tendem a ser potencializados à medida que o consumo desta fração aumenta, até o nível testado de 18%. Esses resultados também apontam para a necessidade de testar dietas com outros níveis de amido resistente, pois só assim será possível estabelecer correlações entre o amido resistente ingerido e o efeito biológico desejado.

5. CONCLUSÃO

- A utilização da protease, aliada ao aumento na quantidade de amostra e à substituição do tampão MOPS por tampão fosfato, melhorou a performance, bem como reduziu os custos de análise do método analítico 996.11 preconizado pela AOAC para a quantificação de amido disponível e resistente. Portanto, o protocolo contendo estas modificações, por apresentar melhor simulação das condições de hidrólise, menor coeficiente de variação e custo reduzido, pode ser preferencialmente utilizado em relação ao protocolo original.

- A adição de níveis crescentes (0%, 3%, 9% e 18%) de amido resistente à dieta de ratos não afetou o consumo, entretanto provocou redução de peso corporal. Da mesma forma, foi verificada diminuição da digestibilidade aparente da matéria seca e do amido, e do pH fecal, aliados ao aumento da produção e umidade das fezes, e da excreção fecal de nitrogênio. Estes efeitos podem ser essencialmente atribuídos à menor digestibilidade aparente do amido e a sua fermentação pela microbiota intestinal, o que demonstra seu efeito benéfico no auxílio à manutenção da saúde.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, R.; SEGAL, I.; HASSAN, H. Fermentation of dietary starch in humans. **Am. J. Gastroenterol.**, v.95, n.4, p.1017-1020, 2000.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16th ed., supplement 1998. Washington: AOAC, 1995. 1018p.

ANDRIEUX, C. & SACQUET, E. Effects of amylo maize starch on mineral metabolism in the adult rat: role of the microflora. **J. Nutr.**, v.116, n.6, p.991-998, 1986.

ASP, N.G. Dietary carbohydrates: classification by chemistry and physiology. **Food Chem.**, v.57, n.1, p.9-14, 1996.

BAGHURST, P.A.; BAGHURST, K.I.; RECORD, S.J. Dietary fibre, non-starch polysaccharides and resistant starch – a review. **Food Aust.**, v.48, n.3, p.S3-S35, 1996.

BATEY, I.L. Starch analysis using thermostable alpha-amylases. **Starch/Stärke**, v.34, n.4, p.125-128, 1982.

BERRY, C.S. Resistant starch: formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. **J. Cereal Sci.**, v.4, p.301-314, 1986.

BIANCHINI, F.; CADERNI, G.; MAGNO, C. *et al.* Profile of short-chain fatty acids and rectal proliferation in rats fed sucrose or cornstarch diets. **J. Nutr.**, v.122, n.2, p.254-261, 1992.

BOTHAM, R.L.; CAIRNS, P.; MORRIS, V.J. *et al.* A physicochemical characterization of chick pea starch resistant to digestion in the human small intestine. **Carbohydr. Polym.**, v.26, n.2, p.83-90, 1995.

CHAMP, M. Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.46, n.2, p.S51-S62, 1992.

CHAMP, M. & FAISANT, N. Resistant starch: analytical and physiological aspects. **Bol. SBCTA**, v.30, n.1, p.37-43, 1996.

DE DECKERE, E.A.M.; KLOOTS, W.J.; VAN AMELSVOORT, J.M.M. Resistant starch decreases serum total cholesterol and triacylglycerol concentrations in rats. **J. Nutr.**, v.123, n.12, p.2142-2151, 1993.

DE DECKERE, E.A.M.; KLOOTS, W.J.; VAN AMELSVOORT, J.M.M. Both raw and retrograded starch decrease serum triacylglycerol concentration and fat accretion in the rat. **Br. J. Nutr.**, v.73, n.2, p.287-298, 1995.

DE SCHRIJVER, R.; VANHOOF, K.; VANDE GINSTE, J. Nutrient utilization in rats and pigs fed enzyme resistant starch. **Nutr. Res.**, v.19, n.6, p.1349-1361, 1999.

DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C.; RAYSSIGUIER, Y. Effect of fermentable carbohydrates in volatile fatty acids, ammonia and mineral absorption in the rat caecum. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.20, p.1351-1359, 1980.

DEMIGNÉ, C. & RÉMÉSY, C. Influence of unrefined potato starch on cecal fermentations and volatile fatty acid absorption in rats. **J. Nutr.**, v.112, n.12, p.2227-2234, 1982.

EASTWOOD, M.A. The physiological effect of dietary fiber: an update. **Annu. Rev. Nutr.**, v.12, n.1, p.19-35, 1992.

EERLINGEN, R.C. & DELCOUR, J.A. Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. **J. Cereal Sci.**, v.22, p.129-138, 1995.

EGGUM, B.O.; BEAMES, R.M.; WOLSTRUP, J. *et al.* The effect of protein quality and fibre level in the diet and microbial activity in the digestive tract on protein utilization and energy digestibility in rats. **Br. J. Nutr.**, v.51, n.2, p.305-314, 1984.

EGGUM, B.O.; JULIANO, B.O.; PEREZ, C.M. *et al.* The resistant starch, undigestible energy and undigestible protein contents of raw and cooked milled rice. **J. Cereal Sci.**, v.18, p.159-170, 1993.

ELIASSON, A.C. **Carbohydrates in food**. New York: Marcel Dekker, 1996. 561p.

ENGLYST, H.N.; WIGGINS, H.S.; CUMMINGS, J.H. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, v.107, n.2, p.307-318, 1982.

ENGLYST, H.N.; HAY, S.; MACFARLANE, G.T. Polysaccharide breakdown by mixed

populations of human faecal bacteria. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.95, p.163-171, 1987.

ENGLYST, H.N.; KINGMAN, S.M.; CUMMINGS, J.H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.46, p.S33-S50, 1992.

ENGLYST, H.N. & HUDSON, G.J. The classification and measurement of dietary carbohydrates. **Food Chem.**, v.57, n.1, p.15-21, 1996.

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M.C.; MORALES, M.D. *et al.* An approach to the influence of nutrients and other food constituents on resistant starch formation. **Food Chem.**, v.60, n.4, p.527-532, 1997.

FAISANT, N.; CHAMP, M.; COLONNA, P. *et al.* Structural discrepancies in resistant starch obtained in vivo in humans and in vitro. **Carbohydr. Polym.**, v.21, p.205-209, 1993.

FAULKES, R.M.; SOUTHON, S.; LIVESEY, G. Utilization of α -amylase (EC 3.2.1.1) resistant maize and pea (*Pisum sativum*) starch in the rat. **Br. J. Nutr.**, v.61, n.2, p.291-300, 1989.

GALLANT, O.J.; BOUCHET, B.; BULEON, A. *et al.* Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymic degradation. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.46, p.S3-S16, 1992.

GARCÍA-ALONSO, A.; SAURA-CALIXTO, F.; DELCOUR, J.A. Influence of botanical source and processing on formation of resistant starch type III. **Cereal Chem.**, v.75, n.6, p.802-804, 1998.

GEE, J.M.; FAULKES, R.M.; JOHNSON, I.T. Physiological effects of retrograded, α -amylase-resistant cornstarch in rats. **J. Nutr.**, v.121, n.1, p.44-49, 1991.

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

GRANFELDT, Y.E.; DREWS, A.W.; BJÖRCK, I.M.E. Starch bioavailability in arepas made from ordinary or high amylose corn: concentration and gastrointestinal fate of resistant starch in rats. **J. Nutr.**, v.123, n.10, p.1676-1684, 1993.

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

HILLMAN, L.; PETERS, S.; FISCHER, A. *et al.* Differing effects of pectin, cellulose and lignin on stool pH, transit time and weight. **Br. J. Nutr.**, v.50, n.2, p.189-195, 1983.

HOLM, J.; BJÖRCK, I.; SJOBERG, L. *et al.* Starch availability in vitro and in vivo after flaking, steam-cooking and popping of wheat. **J. Cereal Sci.**, v.3, p.193-206, 1985.

HOLM, J., BJÖRCK, I.; DREWS, A. *et al.* A rapid method for the analysis of starch. **Starch/Stärke**, v.38, n.7, p.224-226, 1986.

JENKINS, D.J.A.; WOLEVER, T.M.; JENKINS, A.L. Starchy foods and glycemic index. **Diabetes Care**, v.11, n.2, p.149-159, 1988.

JENKINS, D.J.A.; VUKSAN, V.; KENDALL, C.W.C. *et al.* Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.17, n.6, p.609-616, 1998.

JERACI, J.L. & HORVATH, P.S. In vitro fermentation of dietary fiber by human fecal organisms. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v.23, n.1, p.121-140, 1989.

KABIR, M.; RIZKALLA, S.W.; CHAMP, M. *et al.* Dietary amylose-amylopectin starch content affects glucose and lipid metabolism in adipocytes of normal and diabetic rats. **J. Nutr.**, v.128, n.1, p.35-43, 1998.

LI, M. & LEE, T.C. Effect of cysteine on the functional properties and microstructures of wheat flour extrudates. **J. Agric. Food Chem.**, v.44, n.7, p.1871-80, 1996.

MADEKA, H. & KOKINI, J.L. Effect of addition of zein and gliadin on the rheological properties of amylopectin starch with low-to-intermediate moisture. **Cereal Chem.**, v.69, n.5, p.489-494, 1992.

MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; LEVRAT, M.A. *et al.* Replacement of digestible wheat starch by resistant cornstarch alters splanchnic metabolism in rats. **J. Nutr.**, v.122, n.2, p.345-354, 1992.

MUIR, J.G. & O'DEA, K. Measurement of resistant starch: factors affecting the amount of starch escaping digestion *in vitro*. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.56, n.1, p.123-127, 1992.

MUIR, J.G. & O'DEA, K. Validation of an *in vitro* assay for predicting the amount of starch that escapes digestion in the small intestine of humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.57, n.4, p.540-

546, 1993.

NRC - National Research Council. **Nutrient Requirement of Laboratory Animals – Nutrient Requirement of Domestic Animals.** Washington: National Academy Press, 1995.

O'DEA, K.; SNOW, P.; NESTEL, P. Rate of starch hydrolysis *in vitro* as a predictor of metabolic responses to complex carbohydrate *in vivo*. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.34, n.10, p.1991-1993, 1981.

PHILLIPS, J.; MUIR, J.G.; BIRKETT, A. *et al.* Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.62, n.1, p.121-130, 1995.

PROSKY, L.; ASP, N.G.; SCHWEIZER, T.F. *et al.* Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory Study. **J. Assoc. Off. Ana. Chem.**, v.71, n.5, p.1017-1023, 1988.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v.23, n.11, 1939-1951, 1993.

SAMBUCETTI, M.E. & ZULETA, A. Resistant starch in dietary fiber values measured by the AOAC method in different cereals. **Cereal Chem.**, v.73, n.6, p.759-761, 1996.

SAQUET, E.; LEPRINCE, C.; RIOTTOT, M. Effect of amylo maize starch on cholesterol and bile acid metabolisms in germfree (axenic) and conventional (holoxenic) rats. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.23, n.4, p.783-792, 1983.

SCHEPPACH, W.; FABIAN, C.; AHRENS, F. *et al.* Effect of starch malabsorption on colonic function and metabolism in humans. **Gastroenterology**, v.95, n.6, p.1549-1555, 1988.

SCHULZ, A.G.M.; VAN AMELSVOORT, J.M.M.; BEYNEN, A.C. Dietary native resistant starch but not retrograded resistant starch raises magnesium and calcium absorption in rats. **J. Nutr.**, v.123, n.10, p.1724-1731, 1993.

SHETTY, P.S. & KURPAD, A.V. Increasing starch intake in the human diet increases fecal bulk. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.43, n.2, p.210-212, 1986.

STEPHEN, A.M. & CUMMINGS, J.H. Water-holding by dietary fibre *in vitro* and its relationship to faecal output in man. **Gut**, v.20, n.8, p.722-729, 1979.

TESTER, R.F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. **J. Cereal Sci.**, v.39, p.151-165, 2004.

THARANATHAN, R.N. Food-derived carbohydrates – Structural complexity and functional diversity. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v.22, n.1, p.65-84, 2002.

TOVAR, J.; BJÖRCK, I.M.; ASP, N.G. Incomplete digestion of legume starches in rats: a study of precooked flours containing retrograded and physically inaccessible starch fractions. **J. Nutr.**, v.122, n.7, p.1500-1507, 1992.

VERBEEK, M.J.F.; DE DECKERE, E.A.M.; TIJBURG, L.B.M. *et al.* Influence of dietary retrograded starch on the metabolism of neutral steroids and bile acids in rats. **Br. J. Nutr.**, v.74, n.6, p.807-820, 1995.

WALTER, M. **Amido resistente**: metodologias de quantificação e resposta biológica em ratos. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

WANG, L.Z. & WHITE, P.J. Structure and properties of amylose, amylopectin, and intermediate materials of oat starches. **Cereal Chem.**, v.71, n.3, p.263-268, 1994.

WENK, C. The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v.90, n.1, p.21-33, 2001.

WOLF, B.W.; BAUER, L.L.; FAHEY Jr., G.C. Effects of chemical modification on *in vitro* rate and extent of food starch digestion: an attempt to discover a slowly digested starch. **J. Agr. Food Chem.**, v.47, n.10, p.4178-4183, 1999.

YOUNES, H.; DEMIGNÉ, C.; BEHR, S. *et al.* Resistant starch exerts a lowering effect on plasma urea by enhancing urea N transfer into the large intestine. **Nutr. Res.**, v.15, n. 8, p.1199-1210, 1995.

YUE, P. & WARING, S. Resistant starch in food applications. **Cereal Food. World**, v.43, n.9, p.690-695, 1998.

7. APÊNDICE

APÊNDICE A – Composição centesimal (% na matéria seca) das amostras de amido de milho, arroz branco, banana verde, flocos de milho e Novelose 260[®]

	FT ¹	FI ²	FS ³	PT ⁴	CZ ⁵	EE ⁶
Amido de milho	1,83	1,43	0,39	0,02	0,00	0,48
Arroz branco	3,00	1,24	1,77	10,80	0,35	0,40
Banana verde	10,49	8,16	2,33	6,64	2,44	0,50
Flocos de milho	4,34	4,14	0,20	0,45	3,57	0,46
Novelose 260 [®]	65,90	21,88	44,02	0,06	0,18	0,59

¹ Fibra total

² Fibra insolúvel

³ Fibra solúvel

⁴ Proteína

⁵ Cinzas

⁶ Extrato etéreo

8. ANEXOS

ANEXO 1

CIÊNCIA RURAL

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões bibliográficas e notas devem ser encaminhados em três vias, datilografados e/ou editados em idioma Português ou Inglês e paginados. O trabalho deverá ser digitado em folha com tamanho A4 210 x 297mm, com no máximo, 28 linhas em espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigos científicos, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e ilustrações. Cada gráfico, figura, ilustração ou tabela equivale a uma página. Enviar a forma digitalizada somente quando solicitada.

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão; Agradecimento(s); Fontes de Aquisição, quando houver, e Referências Bibliográficas. Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências Bibliográficas. Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto [sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão (podendo conter tabelas ou figuras)]; Fontes de aquisição

se houver; Referências Bibliográficas. Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estão disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista.

7. Os nomes dos autores deverão ser colocados por extenso abaixo do título, um ao lado do outro, seguidos de números que serão repetidos no rodapé, para a especificação (formação, titulação e instituição) e indicação de autor para correspondência (com endereço completo, CEP e obrigatoriamente E-mail). Faculta-se a não identificação da autoria em duas cópias dos artigos enviados.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos. Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências Bibliográficas deverão ser efetuadas conforme ABNT (NBR 6023/2000):

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Três autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

AUDE, M.I.S. et al. (Mais de 2 autores) Época de plantio e seus efeitos na produtividade e teor de sólidos solúveis no caldo de cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.22, n.2,

p.131-137, 1992.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad).** 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose.** São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal: identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o **endereço completo do autor** (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral:** análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

LeBLANC, K.A. **New development in hernia surgery.** Capturado em 22 mar. 2000. Online. Disponível na Internet <http://www.medscape.com/Medscape/surgery/TreatmentUpdate/1999/tu01/public/toc-tu01.html>.

UFRGS. Transgênicos. **Zero Hora Digital,** Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Capturado em 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>.

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas,** (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina.

Anais... Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias – UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. Tabelas e figuras devem ser enviadas à parte, cada uma sendo considerada uma página. Os desenhos e gráficos (em largura de 7,5 ou 16cm) devem ser feitos em editor gráfico impresso a laser, em papel fotográfico glossy sempre em qualidade máxima, e devem conter no verso o nome do autor, orientação da borda superior e o número das legendas correspondentes, as quais devem estar em folhas à parte. Alternativamente, após aprovação as figuras poderão ser enviadas digitalizadas com ao menos 800dpi, em extensão .tiff. Fotografias, desenhos e gráficos devem ser enviados, obrigatoriamente, em três vias. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. O ofício de encaminhamento dos artigos deve conter, obrigatoriamente, a assinatura de todos os autores ou termo de compromisso do autor principal, responsabilizando-se pela inclusão dos co-autores.

13. Taxas de publicação e tramitação

Ciência Rural cobra taxas de tramitação e publicação de artigos. A taxa para tramitação será o equivalente a US\$ 7,00 por trabalho submetido; e a taxa para publicação será de US\$ 10,00 por página impressa. Os pagamentos deverão ser feitos em reais (R\$), de acordo com a taxa de câmbio comercial do dia. Essas taxas deverão ser pagas no Banco do Brasil, Agência 1484-2, Conta Corrente 250304-2 em nome da FATEC – Projeto 95304. Alternativamente poderá ser enviado um cheque no valor correspondente em nome da FATEC. Pagamentos por cartão de crédito VISA são também aceitos. A submissão do artigo deverá ser obrigatoriamente acompanhada do recibo da taxa de tramitação (cheque correspondente ou cartão de crédito). A taxa de submissão é obrigatória para todos os trabalhos independentemente de ser assinante. A taxa de publicação somente deverá ser paga (e o comprovante anexado) após a revisão final das provas do manuscrito pelos autores. Os pesquisadores assinantes da Ciência Rural não pagarão a taxa de publicação, se pelo menos um dos autores for assinante. Professores do

Centro de Ciências Rurais e dos Programas de Pós-graduação do Centro têm seus artigos previamente pagos por esse Centro, estando isentos da taxa de publicação, devendo, no entanto, pagar a taxa de tramitação. No caso de impressão colorida, todos os trabalhos publicados deverão pagar um adicional de US\$ 120,00 equivalente por página impressa, independentemente do número de figuras na respectiva página. Este pagamento também deverá ser anexado no momento da devolução do artigo rubricado obedecendo uma das duas formas previamente mencionadas. O remetente do numerário deverá deixar claro em nome de quem o recibo deverá ser emitido, pessoa física enviar o número do CIC e no caso de pessoa jurídica CNPJ e inscrição estadual caso não seja isento (ex.: instituições privadas).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão devolvidos.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

ANEXO 2

CIÊNCIA RURAL

Revista Científica do Centro de Ciências Rurais

Universidade Federal de Santa Maria

CEP: 97105-900 – Santa Maria – RS, BRASIL

e-mail: cienciarural@mail.ufsm.br

homepage: <http://www.ufsm.br/ccr/revista>

<http://www.scielo.br/cr>

Fone: (55) 220-8698 - Fax: (55) 220-8695

ISSN 0103-8478

Santa Maria, 26 de janeiro de 2005.

Número do Artigo: 352/04


Título do Artigo: AMIDO RESISTENTE: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO

Senhor(a) Pesquisador(a):

Vimos, por meio deste, informar que o artigo protocolado com a referência acima teve parecer favorável do Comitê Científico de Ciência Rural e será publicado nesta Revista v.35, n.4, 2005.

Autores: MELISSA WALTER, LEILA PICOLLI DA SILVA, TATIANA EMANUELLE

Atenciosamente



Comissão Editorial

Ilmo.(a) Sr(a): MELISSA WALTER

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

NIDAL/CCR

SANTA MARIA - RS

97105-900

ANEXO 3

ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

Apresentação

Os trabalhos devem ser apresentados em duas vias e cópia das ilustrações. Textos em disquetes serão acompanhados do printer (cópia impressa fiel, do disquete), no programa word; apresentados em lauda-padrão - A4 (30 linhas de 70 toques e espaços duplos); os textos devem ter de 15 a 30 páginas, no máximo.

Estrutura do trabalho

Os trabalhos devem obedecer à seguinte seqüência: Título; Autor(es) (por extenso e apenas o sobrenome em maiúscula);Filiação científica do(s) autor(es) (indicar em nota de rodapé: Departamento, Instituto ou Faculdade, Universidade-sigla, CEP, Cidade, Estado, País); Resumo (com o máximo de 200 palavras); Palavras-chave (com até 7 palavras retiradas de Thesaurus da área, quando houver); Texto (Introdução, Material e Método(s), Resultado(s), Discussão, Conclusão); Agradecimentos; Abstract e keywords (versão para o inglês do resumo e palavras-chave precedida pela Referência Bibliográfica do próprio artigo); Referências Bibliográficas (trabalhos citados no texto).

Referências bibliográficas

Devem ser dispostas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor e numeradas consecutivamente, seguir a NBR 6023 (agosto2000) da ABNT.

Livros e outras monografias

CERVO, A. L.; BERVIAN, P. A. Metodologia científica: para uso dos estudantes universitários. 2. Ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1978. 144p.

Capítulos de livros

DEL NEGRO, G. Doenças produzidas por fungos. In: GUIMARÃES, R.X.; GUERRA, C. C. Clínica e laboratório: interpretação P.255-259 clínica das provas laboratoriais. São Paulo: Sarvier, 1976.p. 255-259.

Dissertações e teses

VEIGA NETO, E. R. Aspectos anatômicos de glândula lacrimal e de sua inervação no macaco-prego (*Cebus apela*), (Linnaeus, 1758). 1988. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1988.

Artigos de periódicos

Os títulos de periódicos deverão ser abreviados conforme o Biological Abstract, Chemical Abstract, Index Medicus, Current Contents. Exemplos:

SOUZA, V. Indicação de grampos para extremidades livres. Rev. Odont. UNESP, São Paulo, v.20, p.299-310, 1991.

Trabalhos de congressos ou similar (publicado)

TRAINA JUNIOR, C. GEO: um sistema de gerenciamento de base de dados orientado a objeto: estado atual de desenvolvimento e implementação. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BANCOS DE DADOS, 6, 1991, Manaus. Anais...Manaus: Imprensa Universitária da FUA, 1991. P.193-207.

Citação no texto

Utilizar sistema numérico. A citação de um autor no texto (quando necessária) deverá ser pelo sobrenome e o número da referência na entrelinha superior. No caso de dois autores, os sobrenomes devem ser separados por &. Mais de dois autores, indicar apenas o sobrenome do primeiro seguido de et al.

Notas

Devem ser reduzidas ao mínimo e colocadas no pé de página. As remissões para o rodapé devem ser feitas por asteriscos, na entrelinha superior.

Anexos e/ou apêndices

Serão incluídos somente quando imprescindíveis à compreensão do texto.

Tabelas

Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas pelo título.

Figuras

Desenhos, gráficos, mapas, esquemas, fórmulas, modelos (em papel vegetal e tinta nanquim,

ou computador); fotografias (em papel brilhante); radiografias e cromos (em forma de fotografia). As figuras e suas legendas devem ser claramente legíveis após sua redução no texto impresso de 10 X 17cm. Devem-se indicar, a lápis, no verso: autor, título abreviado e sentido da figura. Legenda das ilustrações nos locais em que aparecerão as figuras, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos e iniciadas pelo termo FIGURA.

Unidade de medida e símbolos

Devem restringir-se apenas àqueles usados convencionalmente ou sancionados pelo uso. Unidades não usuais devem ser claramente definidas no texto. Nomes comerciais de drogas citados entre parênteses, utilizando-se no texto, o nome genérico das mesmas. Fórmulas e equações escritas em linha, por exemplo, escreva a/b , x , escreva $ex/2$. Os dados e conceitos emitidos nos trabalhos, bem como a exatidão das referências bibliográficas, são de inteira responsabilidade dos autores. Os trabalhos que não se enquadrarem nestas normas serão devolvidos aos autores, ou serão solicitadas adaptações, indicadas por carta pessoal.

Indexação/Indexing

Os artigos publicados na ALIMENTOS E NUTRIÇÃO são indexados por:/The articles published in ALIMENTOS E NUTRIÇÃO are indexed by:

Abstracts on Tropical Agriculture; Base de Dados IALINE; Biological and Agricultural Index; CAB Abstracts; CAS DDS; Chemical Abstracts; Food Science and Technology Abstracts (FSTA); Foods Adlibra; Key to the World's Food Literature; Francis – Leather-Head Food Research Abstracts; Industries Agro-Alimentaires: Bibliographie Internationale; Nutrition Abstracts and Reviews; Periodica: Indice de Revistas Latinoamericanas en Ciências; Science and Technology Abstracts journal; Survey of Periodic Publications; Survey Food Literature.

Assinatura/Subscribe

Solicita-se permuta/Exchange desired

Endereço/Address

Envio dos trabalhos

Correspondência e artigos para publicação deverão ser encaminhados a:/ Correspondence and articles should be addressed by:

ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP

Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1

Caixa Postal 502

14801-902 Araraquara, SP - Brasil

Fax:(0XX16)222-0073

Email to: revistas@fcfar.unesp.br

ANEXO 4

BRITISH JOURNAL OF NUTRITION

The *British Journal of Nutrition* is an international peer-reviewed journal which publishes original papers, review articles (including those critically re-examining published information and the conclusions drawn from it), technical notes and short communications in all branches of nutritional science. Short communications will be expedited through the review process. The underlying aim of all work should be, as far as possible, to develop nutritional concepts. Prospective authors should note that they (or their institutions) now retain the copyright of their material published in the *British Journal of Nutrition*. As a contributor you are asked to follow the guidelines set out below. Prospective authors may also contact the Editorial Office directly on + 44 (0)207 371 6225 (telephone), +44 (0)207 602 1756 (fax), or edoffice@nutsoc.org.uk (email).

Papers submitted for publication should be written in English and be as concise as possible. The *BJN* now operates an on-line submission and reviewing system (eJournalPress). Authors should submit to the following address: <http://bjn.msubmit.net>. Receipt of papers will be acknowledged immediately.

Papers should be accompanied by a statement signed by each author (or by the submitting author on behalf of the others) to the effect that the conditions laid down in the Directions to Contributors are accepted. The statement should affirm that the submission represents original work that has not been published previously and which is not currently being considered by another journal, and that if accepted for the *British Journal of Nutrition* it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Editor-in-Chief. It should also confirm that each author has seen and approved the contents of the submitted manuscript. The submission letter should be accompanied by a completed copy of the 'Licence to Publish' (in lieu of copyright transfer) as reproduced in the January 2003 issue (vol 89, no 1) of the *British Journal of Nutrition* or on the Nutrition Society's web pages (<http://www.nutsoc.org.uk/>); the Society no longer requires copyright of the material published in the journal, only a 'Licence to Publish', the authors or their institution retaining the copyright.

Authors' names should be given without titles or degrees and one forename may be given in full. The name and address of the institution where the work was performed should be given.

Any necessary descriptive material about the author, e.g. Beit Memorial Fellow, should appear at the end of the paper in the acknowledgments section.

Manuscripts should bear the name and address, together with telephone and fax numbers and email address, of the person to whom correspondence is to be sent and should also give a shortened version of the paper's title, not exceeding forty-five letters and spaces in length, suitable for a running title in the published pages of the work.

If a paper requiring revision is not resubmitted within 3 months, it may, on resubmission, be deemed a new paper and the date of receipt altered accordingly.

Short Communications. Papers submitted as Short Communications should consist of an Abstract (250 words maximum), and no more than 3000 words of text (including references). Each Short Communication can include up to two Tables or one Table and one Figure, but these will be at the expense of text (one half-page Table or Figure is equivalent to about 500 words in two columns or 250 words in one column).

Nutrition Discussion Forum. Letters are invited which discuss, criticize or develop themes put forward in papers published in the *Journal*, or which deal with matters relevant to it. They should not, however, be used as a means of publishing new work. Acceptance will be at the discretion of the Editorial Board, and editorial changes may be required. Wherever possible, letters from responding authors will be included in the same issue.

Form of Papers Submitted for Publication. The onus of preparing a paper in a form suitable for sending to press lies with the author. Authors are advised to consult a current issue in order to make themselves familiar with the practice of the *British Journal of Nutrition* as to typographical and other conventions, layout of tables and so on. Papers will not be accepted as part of a numbered series; instead there should be a short common title separated by a colon from a subtitle more specific to the paper. Sufficient information should be given to permit repetition of the published work by any competent reader of the *Journal*. Authors are invited to nominate up to four potential referees who may then be asked by the Editorial Board to help review the work.

Papers should be in double-spaced typescript on paper with wide margins (2 cm or more). At the ends of lines, words should not be hyphenated unless hyphens are to be printed. A space of 50mm should be left at the top of the first sheet. Line-numbered paper is encouraged.

Spelling should generally be that of the *Concise Oxford Dictionary* (1995), 9th ed. Oxford:

Clarendon Press. Paper should normally be divided into the following parts:

(a) *Abstract*: each paper must open with an abstract of not more than 250 words. The abstract should be a single paragraph of continuous text outlining the aims of the work, the experimental approach taken, the principal results, and the conclusions and their relevance to nutritional science.

(b) *Introduction*: it is not necessary to introduce a paper with a full account of the relevant literature, but the introduction paragraph should indicate briefly the nature of the question asked and the reasons for asking it.

(c) *Experimental methods adopted*: methods should appear after the introduction.

(d) *Results*: these should be given as concisely as possible, using figures or tables as appropriate.

(e) *Discussion*: while it is generally desirable that the presentation of the results and the discussion of their significance should be presented separately, there may be occasions when combining these sections may be beneficial. Authors may also find that additional or alternative sections such as 'conclusions' may be useful.

(f) *Acknowledgments*: these should be given in a single paragraph after the discussion and be as brief as possible.

(g) *References*: these should be given in the text thus: Sebrell & Harris (1967) showed that ..., or ... has been shown (Wallace & West, 1982); where a paper to be cited has more than two authors, citations should appear thus: (Peto *et al.* 1981). Where more than one paper has appeared in one year for which the first name in a group of three or more authors is the same, the reference should be given as follows: Adams *et al.* (1962*a,b,c*) ..., or ... (Adams *et al.* 1962*a,b,c*). In the text, references grouped together should be given in chronological order thus: ... (Wallace & West, 1982; Lau, 1988). At the end of the paper, on a page(s) separate from the text, references should be listed in alphabetical order according to the name of the first author of the publication quoted and should include the author's initials and the title of the paper. When an article has more than ten authors only the names of the first three authors should be given followed by *et al.* Names and initials of authors of unpublished work should be given in the text and not included in the References. Titles of journals should appear in their abbreviated form using the NICB LinkOut page (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/journals/loftext_noprov.html). References to books and monographs should include the Publisher's name, the town of publication and the number of the edition to which reference is made. Thus:

Ablett JG & McCance RA (1971) Energy expenditure of children with kwashiorkor. *Lancet* **ii**,

517–519.

Adams RL, Andrews FN, Gardiner EE, Fontaine WE & Carrick CW (1962a) The effects of environmental temperature on the growth and nutritional requirements of the chick. *Poultry Sci* **41**, 588–594.

Adams RL, Andrews FN, Rogler JC & Carrick CW (1962b) The protein requirement of 4-week-old chicks as affected by temperature. *J Nutr* **77**, 121–126.

Adams RL, Andrews FN, Rogler JC & Carrick CW (1962c) The sulfur amino acid requirement of the chick from 4 to 8 weeks as affected by temperature. *Poultry Sci* **41**, 1801–1806.

Agricultural Research Council (1981) *The Nutrient Requirements of Pigs*. Slough: Commonwealth Agricultural Bureaux.

Clément K, Vaisse C, Lahlou N, *et al.* (1998) A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **392**, 398–401.

Edmundson W (1980) Adaptation to undernutrition: how much food does man need? *Soc Sci Med* **14 D**, 19–126.

European Communities (1971) *Determination of Crude Oils and Fats, Process A*. Part 18, *Animal Feeding-stuffs*, pp. 15–19. London: H. M. Stationery Office.

Hegsted DM (1963) Variation in requirements of nutrients – amino acids. *Fed Proc* **22**, 1424–1430.

Heneghan JB (1979) Enterocyte kinetics, mucosal surface area and mucus in gnotobiotics. In *Clinical and Experimental Gnotobiotics. Proceedings of the VIth International Symposium on Gnotobiology*, pp. 19–27 [TM Fliedner, H Heit, D Niethammer and H Pflieger, editors]. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Hill DC (1977) Physiological and biochemical responses of rats given potassium cyanide or linamarin. In *Cassava as an Animal Feed. Proceedings of a Workshop held at University of Guelph, 1977. International Development Research Centre Monograph 095e*, pp. 33–42 [B Nestel and M Graham, editors]. Ottawa, Ont., Canada: International Development Research Centre.

Lau EMC (1988) Osteoporosis in elderly Chinese (letter). *Br Med J* **296**, 1263.

Louis-Sylvestre J (1987) Adaptation de l'ingestion alimentaire aux dépenses énergétiques (Adaptation of food intake to energy expenditure). *Reprod Nutr Dév* **27**, 171–188.

Martens H & Rayssiguier Y (1980) Magnesium metabolism and hypomagnesaemia. In *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*, pp. 447–466 [Y Ruckebusch and P Thivend, editors]. Lancaster: MTP Press Ltd.

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1977) *Energy Allowances and Feeding Systems for Ruminants. Technical Bulletin* no. 33. London: H.M. Stationery Office.

Peto R, Doll R, Buckley JD & Sporn MB (1981) Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* **290**, 201–208.

Sebrell WH Jr & Harris RS (1967) *The Vitamins*, 2nd ed., vol. 1. London: Academic Press.

Technicon Instruments Co. Ltd (1967) *Technicon Methodology Sheet* N-36. Basingstoke: Technicon Instrument Co. Ltd.

Van Dokkum W, Wesstra A & Schippers F (1982) Physiological effects of fibre-rich types of bread. 1. The effect of dietary fibre from bread on the mineral balance of young men. *Br J Nutr* **47**, 451–460.

Wallace RJ & West AA (1982) Adenosine 5' triphosphate and adenylate energy charge in sheep digesta. *J Agric Sci (Cambridge)* **98**, 523–528.

Wilson J (1965) Leber's disease. PhD Thesis, University of London.

World Health Organization (1965) *Physiology of Lactation. Technical Report Series* no. 305. Geneva: WHO.

References to material available on websites should include the full Internet address, and the date of the version cited. Thus:

Department of Health (1997) Committee on Toxicity of Chemicals in Food Consumer Products and the Environment. Statement on vitamin B6 (pyridoxine) toxicity. <http://www.open.gov.uk/doh/hef/B6.htm>

Mathematical Modelling of Nutritional Processes. Papers in which mathematical modelling of nutritional processes forms the principal element will be considered for publication provided: (i) they are based on sound biological and mathematical principles, (ii) they advances nutritional concepts or identifies new avenues likely to lead to such advances, (iii) assumptions used in their construction are fully described and supported by appropriate argument, (iv) they are described in such a way that the nutritional purpose is clearly apparent, (v) the contribution of the model to the design of future experimentation is clearly defined.

Units. Results should be presented in metric units according to the International System of Units (see *Quantities, Units, and Symbols* (1971) London: The Royal Society, and *Metric Units, Conversion Factors and Nomenclature in Nutritional and Food Sciences* (1972) London: The Royal Society – as reproduced in *Proceedings of the Nutrition Society* (1972)

31, 239–247).

Energy measurements should be expressed in joules.

For substances of known molecular weight, e.g. glucose, urea, Ca, Na, Fe, K, P, values should be expressed as mol/l: for substances of indeterminate molecular weights, e.g. phospholipids, proteins, and for trace elements, e.g. Cu, Zn, then g/l should be used.

Time. The 24 h clock should be used, e.g. 15.00 hours.

Statistical Treatment of Results. Data from individual replicates should not be given for large experiments, but may be given for small studies. The methods of statistical analysis used should be described, and references to statistical analysis packages included in the text, thus: Statistical Analysis Systems statistical software package version 6.11 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Information such as analysis of variance tables should be given in the paper only if they are relevant to the discussion. A statement of the number of replicates, their average value and some appropriate measure of variability is usually sufficient.

Comparisons between means can be made by using either confidence intervals or significance tests. The most appropriate of such measures is usually the standard error of a difference between means (SED), or the standard errors of the means (SE or SEM) when these vary between means. The standard deviation (SD) is more useful only when there is specific interest in the variability of individual values. The degrees of freedom associated with SED, SEM or SD should also be stated. The number of decimal places quoted should be sufficient but not excessive.

If comparisons between means are made using confidence intervals (CI), these may be presented as, e.g. ‘difference between means 0.73 g (95 % CI 0.314, 1.36)’. If significance tests are used, a statement that the difference between the means for two groups of values is (or is not) statistically significant should include the level of significance attained, preferably as an explicit *P* value (e.g. $P = 0.016$ or $P = 0.32$) rather than as a range (e.g. $P < 0.05$ or $P > 0.05$). It should be stated whether the significance levels quoted are one-sided or two-sided. Where a multiple comparison procedure is used, a description or explicit reference should be given. Where appropriate, a superscript notation may be used in tables to denote levels of significance; similar superscripts should denote lack of a significant difference.

Where the method of analysis is unusual, or if the experimental design is at all complex, further details (e.g. experimental plan, raw data, confirmation of assumptions, analysis of variance tables, etc.) should be included.

Figures. In curves presenting experimental results the determined points should be clearly shown. Curves and symbols should not extend beyond the experimental points. Scale-marks on the axes should be on the inner side of each axis and should extend beyond the last experimental point. Ensure that lines and symbols used in graphs and shading used in histograms are large enough to be easily identified when the figure is reduced to fit the printed page.

Figures and diagrams should be provided with numbers and lettering, preferably using computer-based graphical programmes.

The names of the authors, title of the paper and the figure number should be given in pencil on the back of each figure. Legends for all figures should be typed on a separate sheet and numbered. Each figure, with its legend, should be comprehensible without reference to the text. The approximate position of each should be indicated in the margin of the text.

Plates. The *Journal* will now also consider the inclusion of colour plates. The size of photomicrographs may have to be altered in printing; in order to avoid mistakes, the magnification should be shown by scale on the photograph itself. The scale with the appropriate unit together with any lettering should be drawn by the author, preferably using appropriate software.

Tables. Tables should carry headings describing their content and should be comprehensible without reference to the text. The dimensions of the values, e.g. mg/kg, should be given at the top of each column. Tables should be typed on separate sheets at the end of the text. Tables should not be subdivided by ruled lines. Abbreviations in tables must be defined in footnotes. Signs for footnotes should be used in the sequence: * † ‡ § || ¶, then ** etc. (omit * or †, or both, from the sequence if they are used to indicate levels of significance). The approximate position should be indicated in the margin of the text.

Key Words. Authors are asked to supply three or four key words or phrases (each containing up to three words) on the title page of the typescript. Please see a recent issue of the *British Journal of Nutrition Cumulative Index* for examples of approved key words.

Chemical Formulas. These should be written as far as possible on a single horizontal line. With inorganic substances, formulas may be used from first mention. With salts, it must be stated whether or not the anhydrous material is used, e.g. anhydrous CuSO₄, or which of the

different crystalline forms is meant, e.g. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Descriptions of Solutions, Compositions and Concentrations. Solutions of common acids, bases and salts should be defined in terms of molarity (M), e.g. 0.1 M- NaH_2PO_4 . Compositions expressed as mass per unit mass (w/w) should have values expressed as ng, μg , mg or g per kg; similarly for concentrations expressed as mass per unit volume (w/v), the denominator being the litre.

Concentrations or compositions should not be expressed on a percentage basis. The common measurements used in nutritional studies, e.g. digestibility, biological value and net protein utilization, should be expressed as decimals rather than as percentages, so that amounts of available nutrients can be obtained from analytical results by direct multiplication. See *Metric Units, Conversion Factors and Nomenclature in Nutritional and Food Sciences*. London: The Royal Society, 1972 (para. 8).

Nomenclature of Vitamins. Most of the names for vitamins and related compounds that are accepted by the Editors are those recommended by the IUNS Committee on Nomenclature. See *Nutrition Abstracts and Reviews A* (1978) **48**, 831–835.

Generic descriptors. The terms **vitamin A**, **vitamin C** and **vitamin D** may still be used where appropriate, for example in phrases such as ‘vitamin A deficiency’, ‘vitamin D activity’.

Vitamin E. The term **vitamin E** should be used as the descriptor for all tocol and tocotrienol derivatives exhibiting qualitatively the biological activity of α -tocopherol. The term **tocopherols** should be used as the generic descriptor for all methyl tocols. Thus, the term **tocopherol** is not synonymous with the term **vitamin E**.

Vitamin K. The term **vitamin K** should be used as the generic descriptor for 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menaphthone) and all derivatives exhibiting qualitatively the biological activity of phyloquinone (phytylmenaquinone).

Niacin. The term **niacin** should be used as the generic descriptor for pyridine 3-carboxylic acid and derivatives exhibiting qualitatively the biological activity of nicotinamide.

Vitamin B6. The term **vitamin B6** should be used as the generic descriptor for all 2-methylpyridine derivatives exhibiting qualitatively the biological activity of pyridoxine.

Folate. Due to the wide range of carbon-substituted, unsubstituted, oxidized, reduced and mono- or polyglutamyl side-chain derivatives of pteroylmonoglutamic acid which exist in nature, it is not possible to provide a complete list. Authors are encouraged to use either the generic name or the correct scientific name(s) of the derivative(s), as appropriate for each

circumstance.

Vitamin B12. The term **vitamin B12** should be used as the generic descriptor for all corrinoids exhibiting qualitatively the biological activity of cyanocobalamin. The term **corrinoids** should be used as the generic descriptor for all compounds containing the corrin nucleus and thus chemically related to cyanocobalamin. The term **corrinoid** is not synonymous with the term **vitamin B12**.

Vitamin C. The terms **ascorbic acid** and **dehydroascorbic acid** will normally be taken as referring to the naturally occurring Lforms. If the subject matter includes other optical isomers, authors are encouraged to include the L- or D-prefixes, as appropriate. The same is true for all those vitamins which can exist in both natural and alternative isomeric forms.

Amounts of vitamins and summation. Weight units are acceptable for the amounts of vitamins in foods and diets. For concentrations in biological tissues, SI units should be used; however, the authors may, if they wish, also include other units, such as weights or international units, in parentheses.

See Metric Units, Conversion Factors and Nomenclature in Nutritional and Food Sciences (1972) paras. 8 and 14–20. London:

The Royal Society.

Nomenclature of Fatty Acids and Lipids. In the description of results obtained for the analysis of fatty acids by conventional gas–liquid chromatography, the shorthand designation proposed by Farquhar JW, Insull W, Rosen P, Stoffel W & Ahrens EH (*Nutrition Reviews* (1959), **17**, Suppl.) for individual fatty acids should be used in the text, tables and figures. Thus 18 : 1 should be used to represent a fatty acid with eighteen carbon atoms and one double bond; if the position and configuration of the double bond is unknown. The shorthand designation should also be used in the abstract. If the positions and configurations of the double bonds are known, and these are important to the discussion, then a fatty acid such as linolenic acid may be referred to as *cis*-9,*cis*-12-18 : 2 (positions of double bonds related to the carboxyl carbon atom 1). However, to illustrate metabolic relationship between different unsaturated fatty acid families, it is sometimes more helpful to number the double bonds in relation to the terminal methyl carbon atom, *n*. The preferred nomenclature is then: 18 : 3*n*-3 and 18 : 3*n*-6 for α -linolenic and γ -linolenic acids respectively; 18 : 2*n*-6 and 20 : 4*n*-6 for linoleic and arachidonic acids respectively and 18 : 1*n*-9 for oleic acid. Positional isomers such as α - and γ -linolenic acid should always be clearly distinguished. It is assumed that the double bonds are methylene-interrupted and are of the *cis* configuration (see Holman RT in

Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids (1966) vol. 9, part 1, p. 3. Oxford: Pergamon Press. Groups of fatty acids that have a common chain length but vary in their double bond content or double bond position should be referred to, for example, as C20 fatty acids or C20 polyunsaturated fatty acids. The modern nomenclature for glycerol esters should be used, i.e. triacylglycerol, diacylglycerol, monoacylglycerol *not* triglyceride, diglyceride, monoglyceride. The form of fatty acids used in diets should be clearly stated, i.e. whether ethyl esters, natural or refined fats or oils. The composition of the fatty acids in the dietary fat and tissue fats should be stated clearly, expressed as mol/100 mol or g/100 g total fatty acids.

Nomenclature of Micro-organisms. The correct name of the organism, conforming with international rules of nomenclature, should be used: if desired, synonyms may be added in parentheses when the name is first mentioned. Names of bacteria should conform with the current Bacteriological Code and the opinions issued by the International Committee on Systematic Bacteriology. Names of algae and fungi must conform with the current International Code of Botanical Nomenclature. Names of protozoa should conform with the current International Code of Zoological Nomenclature.

Nomenclature of Plants. For plant species where a common name is used that may not be universally intelligible, the Latin name in italics should follow the first mention of the common name. The cultivar should be given where appropriate.

Other Nomenclature, Symbols and Abbreviations. Authors should follow current numbers of the *British Journal of Nutrition* in this connection. The IUPAC rules on chemical nomenclature should be followed, and the Recommendations of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (see *Biochemical Journal* (1978) **169**, 11–14). The symbols and abbreviations, other than units, are essentially those listed in *British Standard 5775* (1979–1982), *Specifications for Quantities, Units and Symbols*, parts 0–13.

Day should be abbreviated to d, for example 7 d, except for ‘each day’, ‘7th day’ and ‘day 1’. Elements and simple chemicals (e.g. Fe and CO₂) can be referred to by their chemical symbol or formula from the first mention in the text; titles can be taken as an exception. Well-known abbreviations for chemical substances may be used without explanation, thus: RNA for ribonucleic acid and DNA for deoxyribonucleic acid. Other substances that are mentioned frequently may also be abbreviated, the abbreviation being placed in parentheses at the first mention, thus: free fatty acids (FFA), and an alphabetical list of abbreviations used should be

included on a separate sheet of paper. Terms such as 'bioavailability' or 'available' may be used providing that the use of the term is adequately defined.

Spectrophotometric terms and symbols are those proposed in *IUPAC Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units* (1979) London: Butterworths. The attention of authors is particularly drawn to the following symbols: m (milli, 10.3), μ (micro, 10.6), n (nano, 10.9) and p (pico, 10.12). Note also that ml (millilitre) should be used instead of cc, μm (micrometre) instead of μ (micron) and μg (microgram) instead of γ .

Numbers. Figures should be used with units, for example, 10 g, 7 d, 4 years (except when beginning a sentence, thus: 'Four years ago...'); otherwise, words (except when 100 or more), thus: one man, ten ewes, ninety-nine flasks, three times (but with decimal, 2.5 times), 100 patients, 120 cows, 136 samples.

Ethics of Human Experimentation. The notice of contributors is drawn to the guidelines in the Declaration of Helsinki (1964) (*British Medical Journal* (1964) **ii**), 177–178), the Report of ELSE as printed in *British Journal of Nutrition* (1973) **29**, 149, the *Guidelines on the Practice of Ethics Committees Involved in Medical Research Involving Human Subjects* (1990) London: The Royal College of Physicians, and to the *Guidelines for the Ethical Conduct of Medical Research Involving Children*, published in 1992 by the British Paediatric Association, 5 St Andrew's Place, Regents Park, London NW1 4LB. A paper describing any experimental work on human subjects should include a statement that the Ethical Committee in the Institution in which the work was performed has approved it. A paragraph headed *Ethical considerations* in which the experiments are discussed from an ethical standpoint should form the last paragraph of the Experimental section.

Animal Experimentation. The Editors will not accept papers reporting work carried out using inhumane procedures. The general criteria adopted are set out in *Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations*, published in 1987 by the Biological Council, Institute of Biology, 20 Queensbury Place, London SW7 2DZ.

Proofs. PDF proofs are sent to authors in order that they make sure that the paper has been correctly set up in type. Excessive alterations involving changes other than typesetting errors may have to be disallowed or made at the author's expense. All corrections should be made in ink in the margins: marks made in the text should be only those indicating the place to which the corrections refer.

Corrected proofs should be returned within 3 days either by Express mail to the Publications Office, *British Journal of Nutrition*, 10 Cambridge Court, 210 Shepherds Bush Road, London W6 7NJ, UK; by fax +44 (0)20 7602 1756 or via email edoffice@nutsoc.org.uk.

Offprints. Order forms for offprints should be completed and returned to the Publications Office. A copy of the issue together with fifty offprints and a PDF file of the paper will be supplied free of charge to the corresponding author of each paper or short communication (twenty-five for all other items), and additional offprints may be ordered on the same form.

SUBMISSION PROCESS

The *BJN* now operates an on-line submission and reviewing system (eJournalPress). Authors should submit to the following address: <http://bjn.msubmit.net/>. If any difficulties are encountered please contact the Publications Office immediately.

The manuscript submission process is broken into a series of 4 screens that gather detailed information about your manuscript and allow you to upload the appropriate text and figure/table files. The sequence of screens is as follows:

1. A form requesting author details, manuscript title, abstract, and associated information and the file quantities. Although there is the option of saving your information and returning to complete your submission at a later date we strongly advise you to submit your paper in one session if possible.
2. A screen asking for the actual file locations (via an open file dialogue). After completing this screen, your files will be uploaded to our server.
3. A completion screen that will provide you with a specific manuscript number for your manuscript. You may be asked to select the order in which your uploaded files should be presented.
4. An approval screen that will allow you to verify that your manuscript has been uploaded and converted to PDF correctly.

Each converted file must be approved individually to complete your online submission. If the conversion is not correct, you can replace or delete your manuscript files as necessary. After you have reviewed the converted files, you will need to click on "Approve Manuscript". This link will have a red arrow next to it.

Throughout the system, red arrows reflect pending action items that you should address.

Before submitting a manuscript, please gather the following details for all authors:

- Title, First and Last Names
- Full Postal Address for Corresponding Author only
- Institutions
- Country
- Work Fax Number for Corresponding Author only (including international dialling code)
- E-mail addresses

In addition we require full manuscript details:

- Covering Letter
- Title (you may copy and paste this from your manuscript)
- Abstract (you may copy and paste this from your manuscript)
- Manuscript files in PDF, Word, WordPerfect, or RTF format.
- Ideally manuscript files should have the tables/figures given at the end of the article.
- For illustrations, preferred software packages are Adobe Illustrator, Adobe Photoshop, Aldus Freehand, Chemdraw or CorelDraw. Preferred formats are TIFF or JPEG, if a TIFF file is not possible save as an EPS or a windows metafile.

Please provide contact details for up to 4 potential Referees (email addresses and institutions).

For further information, please contact the Publications Office:

Tel: +44 (0) 20 7371 6225

Fax: +44 (0) 20 7602 1756

Email: edoffice@nutsoc.org.uk