

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DAYANNE REGINA MENDES

**OBTENÇÃO DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE A PARTIR DE RESÍDUO DE BAINHA
DE PUPUNHA E SUA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA COMO SUPLEMENTO DE FIBRAS
NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL**

CURITIBA

2013

DAYANNE REGINA MENDES

**OBTENÇÃO DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE A PARTIR DE RESÍDUO DE BAINHA
DE PUPUNHA E SUA AVALIAÇÃO COMO SUPLEMENTO DE FIBRAS NA
ALIMENTAÇÃO ANIMAL**

Monografia apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel do Curso de Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Márcia Helena Mendonça

Co-orientadora: Cristiane Vieira Helm

CURITIBA
2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, maior dom que alguém pode ter.

Ao meu marido Rodolfo Andrade, pelo amor, incentivo e paciência hoje e sempre.

Aos meus pais, Celso e Eliane Mendes, pelo amor e esforço de formarem seus filhos e insistirem na educação.

À minha irmã, pelo amor e pela descontração nos momentos certos.

À pesquisadora Cristiane Vieira Helm que, além de indispensável para o meu crescimento profissional, com paciência e atenção, dedicou seu tempo para me orientar em cada passo desta pesquisa.

À professora Márcia Helena Mendonça, pela orientação, correções e sugestões para melhoria do trabalho e ajuda nas buscas de respostas nos momentos mais complicados.

Ao pesquisador Washington Magalhães, pela oportunidade e incentivo para trabalhar com nanofibrilas.

À professora Lorena Benathar Ballod Tavares, pelo apoio e ao Centro de Bioterismo da FURB, em especial as funcionárias Neli e Ester pelo acondicionamento e manejo dos animais ao longo de todo o ensaio biológico com os ratos.

Ao Laboratório de histotecnologia da UFPR, em especial à mãe e técnica de laboratório Eliane Regina Mendes, pela confecção das Lâminas e ao Herculano Salviano dos Reis Filho, pela interpretação das mesmas.

Ao Centro de Microscopia eletrônica da UFPR, em especial à Professora Célia Regina Cavichiolo Franco e aos técnicos do CME, pelas análises de MEV e MET.

À professora Carolina Camargo de Oliveira, pelo auxílio no tratamento estatístico dos dados.

À professora Graciela Inês Bonzon de Muniz, pelo apoio financeiro concedido.

Aos colegas do laboratório de tecnologia de produtos não madeiráveis, e a todos os colegas da Embrapa Florestas que contribuíram nos experimentos.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O processamento de cada haste do palmito pupunha gera um grande percentual (cerca de 95%) de bainha. Esta bainha corresponde às capas mais externas da planta e é considerada como resíduo, representando um problema na agroindústria. Iniciativas no sentido de tratar e/ou aproveitar os resíduos são essenciais para minimizar problemas ambientais, bem como para gerar fonte alternativa de renda por sua utilização no desenvolvimento de produtos alimentícios. O objetivo deste projeto é a obtenção de nanofibrilas de celulose a partir de bainha de pupunha e sua utilização como suplemento alimentar, seguida de ensaios em animais para verificar seus efeitos fisiológicos. Uma solução de nanofibrilas de celulose de bainha de pupunha foi produzida e caracterizada quimicamente ao nível centesimal. Essa solução foi submetida a testes de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Após ser adicionada, nas concentrações de 7%, 14% e 21%, em ração animal AIN-93M, realizaram-se ensaios biológicos em ratos adultos para verificação de massa corpórea, parâmetros bioquímicos, excreção de nutrientes minerais e análises histológicas do fígado. O teste com *Artemia salina* mostrou que até concentrações de 50 g/L de solução, esse composto não é tóxico ao organismo. Não foram detectadas variações significativas nos resultados em função das diferentes concentrações de nanofibrilas adicionadas às rações. Os dados relativos às massas corpóreas, glicemia e outros parâmetros bioquímicos não sofreram influência significativa da presença de nanofibrilas na dieta. A análise histológica e eliminação de minerais pelas fezes também não mostram efeitos nos organismos experimentados. Não foram detectados danos aos animais em experimentação, não havendo, portanto, contraindicações no emprego de baixas concentrações de nanofibrilas como suplemento alimentar. Estudos posteriores, com maiores concentrações de nanofibrilas, se fazem necessários para uma melhor avaliação do resíduo de pupunha como suplemento de fibras na ração animal.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Dimensões das microfibras e nanofibrilas.	17
FIGURA 2 - Diagrama esquemático experimental.	26
FIGURA 3 - Diagrama esquemático da produção das nanofibrilas.	27
FIGURA 4 - Equipamento utilizado para obtenção das nanofibrilas.	27
FIGURA 5 - Microscópio eletrônico de varredura.	28
FIGURA 6 - Microscópio eletrônico de Transmissão (MET).	29
FIGURA 7 – Balança analítica utilizada no processo experimental.	29
FIGURA 8 - Estufa utilizada nos testes para determinação de umidade.	30
FIGURA 9 - Mufla utilizada nos testes para determinação de cinzas.	31
FIGURA 10 – Aparelho extrator de lipídeos	32
FIGURA 11 – Tubos no processo de digestão da matéria orgânica para determinação de proteínas.	33
FIGURA 12 – Destilador de Nitrogênio Tecnal, TE 036/1.	34
FIGURA 13 - Incubação das amostras em banho maria Dubnoff.	35
FIGURA 14 – Filtração das amostras de Fibras após precipitação.	36
FIGURA 15 – <i>Artemia salina</i>	37
FIGURA 16 – Lupa estereoscópica utilizada para contagem dos microcrustáceos no ensaio de toxicidade.	38
FIGURA 17 – Biotério Central da Universidade de Blumenau.	39
FIGURA 18 – Rações produzidas segundo AIN – 93 M.	41
A. Ração Padrão (Controle); B. Ração padrão com 7% de solução de nanofibrilas; C. Ração padrão com 14% de solução ;D. Ração padrão com 21% da mesma solução	41
FIGURA 19 – Ensaio para verificação do teor de acidez.	42
FIGURA 20 – pHmetro utilizado para a verificação do pH das rações.	42
FIGURA 21 – Separação do plasma para análises bioquímicas.	43
FIGURA 22 - Triturador de bancada Waring.	45
FIGURA 23 – Espectrômetro de Absorção Atômica.	46
FIGURA 24 - Espectrofotômetro UV-Vis.	46
FIGURA 25 - Fotômetro de Chama.	46
FIGURA 26 - Procedimento de pesagem dos animais.	47
FIGURA 27 - Sistema de monitoramento de glicemia.	47
FIGURA 28 – Aspecto de gel da suspensão de nanofibrilas.	49
FIGURA 29 – Imagem obtida por MEV aumento de 35.000 X.	50

FIGURA 30 – Imagem obtida por MET aumento de 50.000 X.	50
FIGURA 31 – Gráfico mostrando toxicidade das nanofibrilas frente a <i>Artemia salina</i> A. 24, 48 e 72 horas, em diferentes concentrações; B.% de microcrustáceos vivos em 24 horas; C.% de microcrustáceos vivos em 48 horas; D.% de microcrustáceos vivos em 24 horas.	52
FIGURA 32 – Análise estatística dos resultados das análises de composição centesimal DAS quatro diferentes rações utilizados no exPerimento. A. Umidade; B. Cinzas; C. Proteínas; D. Lipídeos; E. Acidez; F. pH; G. Fibras.....	57
FIGURA 33 – Resultados da análise de massa corpórea nos diferentes grupos no decorrer do experimento.	58
FIGURA 34 – Resultados da análise de glicemia nos diferentes grupos no decorrer do experimento.	59
FIGURA 35 – Gráfico das análises bioquímicas realizadas. a. Triglicerídeos; b. Colesterol Total.	62
FIGURA 36 – Gráficos com a composição dos minerais encontrados nas fezes dos ratos nos diferentes grupos. A. micronutrientes. B. Cálcio, Magnésio e Nitrogênio. C Fósforo, Sódio e potássio.....	63
FIGURA 37 - Análise estatística dos resultados de minerais excretados.	64
FIGURA 38 – Análises histológicas do fígado nos diferentes grupos. Aumento de 100X na imagem da direita e 400X na imagem da esquerda. A. Grupo controle; B. Grupo 1 (com adição de 7% de solução de nanofirbilas); C. Grupo 2 (com adição de 14% de solução de nanofirbilas); D. Grupo 3 (com adição de 21% de solução de nanofirbilas).	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Formulação das dietas AIN – 93 M para manutenção de roedores (Reeves <i>et al.</i> , 1993).	40
TABELA 2 – Composição centesimal das nanofibrilas produzidas, em base úmida.	51
TABELA 3 – Composição centesimal das rações, em base seca.	55
TABELA 4 – Composição dos minerais nas fezes dos ratos nos diferentes grupos.	63

SUMÁRIO

1	Introdução	10
2	Revisão Bibliográfica	12
2.1	Resíduo da agroindústria de palmito pupunha	12
2.2	Fibras alimentares	13
2.2.1	Fibras insolúveis	13
2.2.2	Fibras solúveis	15
2.2.3	Fibras solúveis e insolúveis na dieta	15
2.3	NANOFIBRILAS NA ALIMENTAÇÃO	17
2.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS	19
2.4.1	Ensaio de toxicidade utilizando microcrustáceos	19
2.4.2	Análise em ratos	20
2.4.2.1	Análise da glicemia	21
2.4.2.2	Análise de Lipídeos	22
2.4.2.3	Análises dos minerais	22
2.4.2.4	Análises histológicas do fígado	23
3	Objetivos	25
3.1	Objetivos gerais	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	Materiais e Métodos	26
4.1	Produção das nanofibrilas	26
4.1.1	Caracterização das nanofibrilas	28
4.1.1.1	Análise ultra-estrutural em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e em microscopia eletrônica de transmissão (MET)	28
4.1.1.2	Caracterização química das nanofibrilas	29
4.1.1.2.1	Teor de Umidade	30
4.1.1.2.2	Teor de Cinzas	31
4.1.1.2.3	Teor de Lipídeos	32
4.1.1.2.4	Teor de Proteínas	33
4.1.1.2.5	Teor de Fibras Totais	35
4.1.1.2.6	Teor de carboidratos	36
4.1.1.2.7	Valor calórico Total	37
4.2	Ensaio Biológico	37
4.2.1	Teste de toxicidade das nanofibrilas frente à <i>Artemia salina</i>	37

4.2.2 Ensaio biológico em <i>Rattus norvegicus albinus</i>	38
4.2.2.1 Animais	38
4.2.2.2 Dietas	39
4.2.2.2.1 Caracterização das Rações usadas nas Dietas	41
4.2.2.3 Ensaio Biológico propriamente dito.....	43
4.2.2.3.1 Parâmetros metabólicos.....	43
4.2.2.3.2 Teores de Minerais nas Fezes.....	44
4.2.2.3.3 Massa Corporal e análise da taxa glicêmica	46
4.2.2.3.4 Análises Histológicas dos fígados	47
4.3 Análise Estatística.....	48
5 Resultados e Discussão	49
5.1 Caracterização das nanofibrilas de celulose	49
5.2 Caracterização físico-química das nanofibrilas de celulose	50
5.3 Teste de toxicidade das nanofibrilas frente à <i>Artemia salina</i>	52
5.4 Ensaio biológicos em <i>Rattus norvegicus albinus</i>	54
5.4.1 Composição das Rações	54
5.4.2 Análise de massa corpórea	57
5.4.3 Análises bioquímicas	59
5.4.3.1 Determinação da glicemia	59
5.4.3.2 Perfil lipídico	61
5.4.4 Análises dos minerais excretados	62
5.4.5 Análises Histológicas dos fígados	68
6 Conclusões	71
Referências Bibliográficas	72

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países latinos em que são registrados altos níveis de desperdício de subprodutos agrícolas, com a consequente geração de grandes quantidades de resíduos. Esses representam perda de biomassa e de nutrientes, além de possuírem potencial de aproveitamento para diversas finalidades. O elevado custo associado ao tratamento, ao transporte e à disposição final desses resíduos acaba por aumentar o risco associado à disposição inadequada que, além da poluição de solos e de corpos hídricos, quando da lixiviação de compostos, acarreta problemas de saúde pública (ROSA, 2011).

Uma alternativa, que vem crescendo desde o início da década de 1970, consiste no aproveitamento de resíduos (principalmente cascas) de certos alimentos como matéria-prima para determinados processos (ISHIMOTO *et al.*, 2007). Um exemplo é o trabalho de Bergamaschine *et al.* (2005), que cita o aproveitamento da bainha da pupunha para suplementação na alimentação de ruminantes.

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de palmito, sendo responsável por mais de 50% de todo o produto comercializado legalmente no mundo, o que representa, aproximadamente, 80.000 toneladas por ano (REIS *et al.*, 2000). Só no estado do Paraná há 1.293 hectares de área plantada de palmito (BELLETTINI, 2004). Estima-se que no beneficiamento do palmito pupunha, espécie nativa das Américas, ocorra a geração de cerca de 70%, em massa, de resíduos por haste beneficiada (FARINA *et al.*, 2012).

Devido a sua composição fibrosa, o resíduo da pupunha mostra um grande potencial de reaproveitamento para ser incluído como suplemento de fibras na alimentação animal, as quais promovem diversos efeitos benéficos no metabolismo animal. As dificuldades residem, entre outras, no seu adequado processamento.

Nesse viés, um ramo promissor é a nanotecnologia. Essa área da ciência tem se desenvolvido muito atualmente e beneficiado a indústria de alimentos, principalmente no que tange ao desenvolvimento de novos materiais funcionais em micro e nanoescala (MORARU *et al.*, 2003).

O prefixo “nano”, nesse contexto, refere-se a uma escala do sistema métrico em que o nanômetro representa um bilionésimo do metro, e estruturas com essas dimensões apresentam propriedades funcionais únicas, que devem ser cuidadosamente avaliadas (ASSIS *et al.*, 2012).

Embora existam vários trabalhos sobre a caracterização físico-química de diversos nanomateriais, sabe-se que legislações atuais não preveem procedimentos específicos para testes e avaliações nos mesmos, ainda que sejam produtos cosméticos e gêneros alimentícios.

Aliando o potencial de aproveitamento dos resíduos da bainha da pupunha ao grande volume gerado e às promissoras pesquisas acerca dos nanomateriais, o presente trabalho visa a produção de nanofibrilas de celulose e a investigação dos seus efeitos sobre o metabolismo animal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESÍDUO DA AGROINDÚSTRIA DE PALMITO PUPUNHA

A palmeira de pupunha (*Bactris gasipaes*) é uma planta perene, nativa da região tropical das Américas, utilizada, há séculos, para a produção de palmito e frutos. Em função da redução das reservas naturais e da preocupação em se preservar as espécies remanescentes de palmito nativo, o processamento da pupunha vem sendo uma alternativa para a sua substituição (GUERREIRO, 2002).

Essa espécie de palmeira pode atingir até 20 m de altura, o diâmetro da estipe varia de 15 a 20 cm e o comprimento dos entrenós de 2 a 30 cm. Os entrenós apresentam numerosos espinhos rígidos pretos ou marrons escuros, porém algumas espécies são desprovidas de espinhos (GUERREIRO, 2002).

A exploração agroindustrial e industrialização do palmito trazem benefícios socioeconômicos incontestáveis, porém, tem como consequência a geração de grandes quantidades de resíduos, um problema para o meio ambiente e para os responsáveis envolvidos neste processo.

Dados das indústrias de beneficiamento apontam que uma fábrica produz cerca de 135 toneladas de resíduos/mês. Esses resíduos acabam gerando grande poluição ambiental, pois normalmente ficam armazenados em pátios formados por solos rasos ou mesmo impermeáveis, dificultando a decomposição do material e atraindo vetores de doenças. Ainda nessa condição, esses resíduos geram chorume, uma importante fonte de contaminação de lençóis freáticos (MORAES, 2011).

Diante disso, acredita-se que iniciativas no sentido de tratar e/ou aproveitar os resíduos tornam-se essenciais para minimizar problemas ambientais e de saúde pública, bem como para gerar fontes alternativas de renda contribuindo assim, para o desenvolvimento sustentável (FARINA *et al.*, 2012).

Estudos mostram que cerca de 82% dos restos das pupunheiras podem ser usados na alimentação animal, já que apresentam fibra digerível. Em lavouras do litoral paranaense, por exemplo, encontrou-se 10% de proteína bruta nas folhas da pupunha. Embora esse percentual esteja abaixo do encontrado por outros pesquisadores em São Paulo (16%), em ambos os casos os teores são significativos, podendo-se indicar o fornecimento das folhas, ao natural, para gado leiteiro, com possível vantagem econômica (MORSBACH; RODRIGUES, 1998).

2.2 FIBRAS ALIMENTARES

Os estudos de Bombo (2006) resgatam o histórico do emprego da expressão fibra alimentar. O termo foi proposto por Hipsley em 1953, para designar carboidratos e componentes na dieta resistentes à digestão. Essa terminologia elevou o *status* deste componente da dieta humana sobre o comumente empregado “fibra bruta” derivado da nutrição animal. Já em 1972 Trowell *et al.* definiram as fibras alimentares como sendo “os componentes da parede celular dos vegetais que resistem à digestão pelas enzimas das secreções digestivas humanas, incluindo a celulose, hemicelulose, pectina e lignina”. Em 1976 os autores modificaram essa definição, incluindo componentes não digeríveis que não fazem parte da parede celular, tais como: gomas, mucilagens e polissacarídeos de reserva. A definição de Trowell, citado por Bombo (2006) tem servido às pesquisas em saúde e comunidade regulatória (órgãos reguladores) por mais de 30 anos.

As fibras podem ser classificadas com base na sua solubilidade em água em: solúveis e insolúveis. As fibras solúveis incluem as pectinas, beta glucanas, gomas, mucilagens e polissacarídeos. Entre as fibras insolúveis estão a celulose, as hemiceluloses e a lignina (MIRA *et al.*, 2009).

2.2.1 Fibras insolúveis

O material ligninocelulósico é o principal constituinte da biomassa vegetal. É produzido por fotossíntese e composto por três tipos de polímeros (fibras insolúveis): a celulose (38 – 48%), a hemicelulose (24 – 40%) e a lignina (18 – 35%), que estão fortemente entrelaçadas e quimicamente ligadas por ligações covalentes e não covalentes (KOVUR, 2003, *apud* REMÉDIOS, 2010).

A celulose é o componente principal da parede celular das plantas, composta por cadeias lineares de D-glicose, que variam de 300 a 15.000 resíduos de açúcar. Esses monossacarídeos estão unidos por ligações β -1,4, com alto grau de polimerização e elevado peso molecular. A celulose apresenta-se, principalmente, em sua forma cristalina, o que confere alta resistência ao rompimento de suas ligações por substâncias químicas. De mesma forma, sua cadeia não ramificada e conformação molecular cristalina envolvida pela matriz da parede celular lhe confere

baixa solubilidade em água. As cadeias de celulose podem se unir através de ligações de hidrogênio formando protofibrilas, que se unem a polioses formando microfibrilas de celulose. O grau de cristalinidade destas fibrilas ou a presença de outros polímeros associados à matriz celulósica são de grande importância na avaliação de forragens, pois estas interações podem influenciar na suscetibilidade da molécula de celulose à hidrólise enzimática microbiana (MIRA *et. al.*, 2009; MORGADO; GALZERANO, 2009.).

Suas propriedades mais importantes para a dieta animal estão relacionadas, primariamente, com a susceptibilidade da molécula à hidrólise microbiana e, em segundo lugar, com sua capacidade de absorção de água. Tem sido observado que a celulose proporciona retenção de água nas fezes (até 40% do seu peso), aumento do volume e peso fecal, elevação do peristaltismo, redução do tempo de trânsito colônico e diminuição da pressão intraluminal (BELO, 2003).

As hemiceluloses, por sua vez, constituem-se em amplo grupo de polissacarídeos formados pela junção, em diferentes proporções, de unidades de monossacarídeos (glicose, galactose, xilose, arabinose, manose e ácidos urônicos). Não apresentam qualquer relação biossintética ou estrutural com a celulose, porém, foram assim denominadas por apresentarem propriedades físico-químicas semelhantes às da celulose. Apresentam os mesmos efeitos no sistema digestório dos animais, acrescidos ainda do aumento da excreção de ácidos biliares. A composição das hemiceluloses varia entre espécies vegetais e representam, em média, 10 a 25% da matéria seca das forragens e de muitos subprodutos industriais (farelos, polpa cítrica e de beterraba, etc.) e, entre 2 a 12% nos grãos de cereais e raízes (MORGADO; GALZERANO, 2009).

A lignina é uma macromolécula de alto peso molecular, resultante da junção de diversos ácidos e álcoois fenilpropílicos, que proporcionam uma estrutura tridimensional de polímero amorfo. Constitui-se, assim de polímeros condensados de diferentes álcoois fenilpropanóides cujos precursores são o p-cumárico, coniferílico e o sinapílico, além do ácido ferúlico, unidos por ligações do tipo éter ou ligações covalentes entre os núcleos benzênicos ou aliados aos radicais propano. Tais polímeros são insolúveis em ácidos e bases fortes, não sendo digeridos nem absorvidos, além de não sofrer ação da flora bacteriana. Podem fixar os ácidos biliares e outros compostos orgânicos, como o colesterol, retardando ou reduzindo a absorção destes componentes no intestino delgado. A proporção destes

componentes é irregular entre as plantas, e estão presentes em maior proporção na parede celular secundária, cuja principal função é de suporte estrutural e de resistência física às plantas (BELO, 2003).

2.2.2 Fibras solúveis

As fibras solúveis estão presentes em diversos produtos como frutas, verduras, cevada e leguminosas. São conhecidas por diferentes tipos, tais como as pectinas, gomas, mucilagens, beta glucanas e até algumas hemiceluloses (do tipo a).

As beta glucanas são fibras alimentares principalmente solúveis, encontradas em pequenas quantidades no trigo e centeio e em grandes quantidades na aveia e na cevada. São componentes das gomas e possuem estrutura linear composta por várias unidades de glicose, unidas por ligações glicosídicas (CHIMOFF, 2008).

As pectinas dão firmeza as plantas, sendo encontradas junto a suas paredes celulares. São utilizadas como espessantes, emulsificantes, conservantes alimentares e para formação de géis.

As fibras solúveis têm a propriedade de se ligarem à água, formando um gel que reduz a absorção de lipídios e açúcares, tornando-se substrato para a formação de rica flora bacteriana (RIQUE *et al.*, 2002)

2.2.3 Fibras solúveis e insolúveis na dieta

O principal local de digestão e absorção de nutrientes é o intestino delgado, onde ocorre hidrólise de polímeros na primeira parte de duodeno. Sendo assim, uma manipulação dietética provoca uma alteração neste ambiente, o que afetará a digestibilidade dos alimentos consumidos, assim como a composição das fezes. As fibras alimentares têm como características comuns não serem digeridas no intestino delgado e serem fermentadas no intestino grosso (MIRA *et al.*, 2009).

Dietas ricas em fibras alimentares promovem efeitos benéficos para o metabolismo. As fibras solúveis aumentam o tempo de trânsito intestinal, diminuem a velocidade de esvaziamento gástrico, reduzem a glicemia pós-prandial e o colesterol sérico. São altamente fermentescíveis, contribuindo para produção de ácidos graxos

de cadeia curta no intestino grosso. As fibras insolúveis, por outro lado, diminuem o tempo de trânsito intestinal, aumentam o volume fecal, reduzem a absorção de glicose e são indicadas para promover melhoria da função intestinal, o que pode explicar seu efeito na absorção diminuída de triacilgliceróis e colesterol sérico (HELM, 2004).

O alto consumo de fibras na dieta ainda está relacionado à redução do risco de doenças crônicas não-transmissíveis, envolvendo mecanismos como melhoria do perfil lipídico, redução da oxidação lipídica e a formação de moléculas inflamatórias, redução da pressão arterial, melhor sensibilidade à insulina e atividade fibrinolítica; prevenção da constipação; aumento da saciedade; redução do risco de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares; prevenção e tratamento de diverticuloses e manejo do diabetes tipo 1 (MIRA *et al.*, 2009).

A ingestão excessiva de fibras insolúveis, em acréscimo, pode levar ao refluxo gastrintestinal, diarreia e a formação de benzoars (bolas de fibras no estômago). Visando evitar esses possíveis efeitos adversos, o monitoramento de uma possível intolerância gastrintestinal à fibra é recomendado (OLREE *et al.*, 1998; BELO, 2003). Entretanto, quando a ingestão de fibras alimentares situa-se no nível recomendado (20 a 35 g/dia), segundo a *American Diabetes Association* (2004), os malefícios não vão, geralmente, além da flatulência leve a moderada. Esse sintoma decorre da adaptação ao aumento do substrato fermentescível nos intestinos e o desconforto tende a reduzir com alguns dias. Assim, a adição lenta e gradual de fibras alimentares à dieta se constitui em uma boa estratégia para minimizar os efeitos colaterais gastrintestinais, atribuídos ao seu uso (BELO, 2003).

Existe ainda a preocupação de que uma elevada ingestão de fibras alimentares possa prejudicar a retenção de minerais, especialmente ferro, cobre, cálcio e zinco por causa da redução da biodisponibilidade, como resultado da capacidade de troca de cátions das fibras e/ou a presença de fitatos (BELO, 2003). No entanto, Roberfroid (1993) constatou que, sendo a ingestão de fibras em nível razoável e não existindo interferência de proteínas e fitatos, as fibras não têm nenhum efeito sobre a biodisponibilidade dos principais cátions no intestino delgado.

As quantidades recomendadas com relação à quantidade de fibras dietéticas para humanos ainda não são definidas. Vários grupos recomendam um aumento na sua ingestão: a *American Dietetic Association* (ADA, 2004) recomenda, para adultos, o consumo de 20 a 35 g/dia, já a Organização Mundial de Saúde estabelece de 16 a

24 g/dia de fibra alimentar para a prevenção de constipação intestinal em crianças e adultos, o Conselho de Nutrição e Alimentação (*Food and Nutrition Board - FNB*), por sua vez, por meio da ingestão dietética de referência (*dietary reference intake-DRI*), definiu a ingestão adequada (*adequate intake*) para as fibras de 38 g para homens adultos e 25 g para mulheres adultas (DONATTO *et al.*, 2006).

2.3 NANOFIBRILAS NA ALIMENTAÇÃO

Nanoestruturas de celulose possuem baixo custo, são ambientalmente corretas e exibem características mecânicas excepcionais, o que as torna uma das mais atraentes classes de materiais para elaboração de nanomateriais (AZEVEDO, 2012).

Cada microfibrila é formada por agregação de fibrilas elementares, constituídas por partes cristalinas e amorfas. A porção cristalina corresponde aos nanocristais (*whiskers*), com até 20 nm de diâmetro e milhares de nanômetros de comprimento. Já as nanofibrilas de celulose são feixes de cadeias de celulose estabilizadas por meio de ligações de hidrogênio, que possuem comprimentos maiores que 1 micrometro, mas espessura de 5 a 30 nm (AZEVEDO, 2012).

A FIGURA 1 mostra a diferença de dimensões entre microfibras e nanofibrilas.

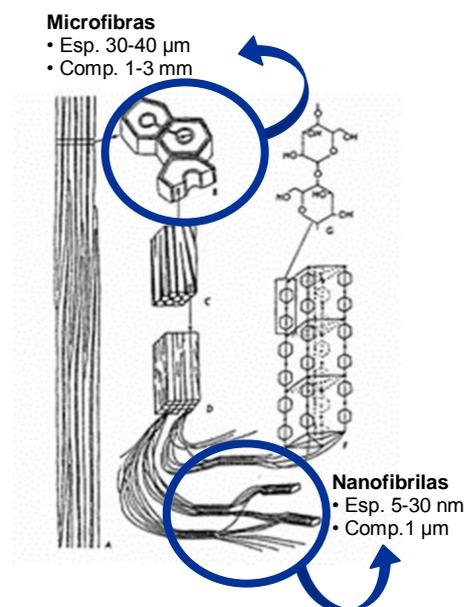


FIGURA 1 – DIMENSÕES DAS MICROFIBRAS E NANOFIBRILAS.

Fonte: Wiley (1977).

Entre as inúmeras aplicações da nanotecnologia, a área de alimentos tem se beneficiado muito com desenvolvimento de novos materiais funcionais, além de nanosensores para a segurança alimentar (MORARU *et al.*, 2003).

Como exemplo, pode ser citado o uso de nanocompósitos como constituinte de embalagem para alimentos, que protegem, aumentam a sua vida útil e são considerados uma alternativa ambientalmente correta, pois reduzem a exigência de utilização de plásticos, como materiais de embalagem (WEISS *et al.*, 2006)

Além disso, algumas nanopartículas, como a prata por exemplo, podem inibir o crescimento microbiano ou servir como veículos para antibióticos (AZEVEDO, 2012).

Outra aplicação conhecida é a adição de nanocristais de celulose a materiais a base de amido, o que melhora suas propriedades termomecânicas e reduz a sensibilidade do material à umidade, uma das limitações do amido, mantendo sua biodegradabilidade. A absorção da água neste caso é inversamente proporcional à concentração de nanocristais de celulose (AZEVEDO, 2012).

No entanto, em razão de seu uso crescente, a segurança de nanoproductos tem chamado cada vez mais a atenção, gerando questionamentos no meio científico. Este tipo de questionamento é fortalecido pela falta de ferramentas legais e científicas, informações e recursos necessários para monitorar o crescimento exponencial do mercado da nanotecnologia (BLASCO; PICÓ, 2011).

Hoet *et al.* (2004) concluíram que algumas partículas de dimensões nanométricas podem entrar no corpo humano, via pulmões e intestinos. As chances de penetração dependem do tamanho e das propriedades de superfície das partículas e também do ponto de contato no pulmão ou nos intestinos. A exposição também é possível por via cutânea, no uso de produtos cosméticos por exemplo. Portanto, nanomateriais, em função de sua área superficial aumentada, poderão causar efeitos tóxicos dentro do organismo, que, por sua vez, poderão não ser aparentes como nos materiais de tamanho macro (SOZER; KOKINI, 2009).

Igualmente, não estão claros os riscos ao meio ambiente, advindos dos produtos em escala nano. Não é ainda compreensível se tais partículas, por serem extremamente pequenas, podem adentrar na cadeia alimentar, ou ainda como podem afetar as florestas e a qualidade do ar (SHATKIN, 2008).

A legislação atual não prevê procedimentos específicos para testes (por exemplo, estudos toxicológicos) e avaliação de nanomateriais, para materiais já

estudados em escala nano, tais como dióxido de titânio, óxido de zinco, óxido de ferro, dióxido de silício ou de negro de fumo. Além disso, devido ao pequeno número de estudos disponíveis, torna-se difícil fazer afirmações comparativas.

Dado que a exposição dos seres humanos e do meio ambiente tende a aumentar rapidamente e que as propriedades toxicológicas, ecotoxicológicas e os riscos do emprego dos nanoproductos ainda não serem avaliados, existe a necessidade de realizar novas investigações sobre seus efeitos biológicos.

No entanto, deve-se ressaltar também que partículas nanométricas não são exatamente novas, e nem todas foram sintetizadas pelo homem. Existem partículas com estas dimensões que são de ocorrência natural, como os nanomaquinaria presente nas plantas para o processo de fotossíntese.

Uma vez que há escassez de dados científicos sobre os potenciais efeitos da exposição dos organismos vivos a diferentes tipos de nanopartículas, aqui cabe a importância de se avaliar a degradabilidade e a durabilidade de nanoproductos, que devem ser analisados considerando a combinação de cada nanopartícula sob condições ambientais adversas.

2.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Novos produtos, sejam eles alimentos ou não, antes de serem liberados para consumo, devem ser submetidos a testes para que se estabeleça sua eficácia, segurança, benefícios e possíveis efeitos colaterais. Em certas etapas das pesquisas torna-se necessário verificar como um organismo vivo responde à droga ou manipulação em ensaios. Com este propósito, utilizam-se testes biológicos.

2.4.1 Ensaios de toxicidade utilizando microcrustáceos

Ensaios de toxicidade revelam o tempo e/ou a concentração em que o material em estudo é potencialmente prejudicial, pois para qualquer produto o contato com a membrana ou sistema biológico pode não produzir um efeito adverso se a concentração do produto for baixa, ou o tempo de contato for insuficiente. Importante destacar que a concentração e o tempo de exposição estão diretamente relacionados (FONSECA, 1991). Desta forma, os testes de toxicidade são

elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES *et al.*, 1994).

Os organismos-teste selecionados para os testes de toxicidade são escolhidos de acordo com a sua abundância, com a facilidade de se manter ou de cultivar em laboratório, com a sua representatividade no ecossistema, com a sua sensibilidade e com a disponibilidade de informação suficiente.

A *Artemia sp.* é um gênero de fácil manipulação em laboratório e baixo custo econômico, além de possuir uma ampla distribuição mundial, devido a grande dispersão do gênero de forma partenogênica (VEIGA; VITAL, 2002). Estudos comprovam a ação tóxica de várias substâncias naturais sobre o crustáceo *Artemia sp.* (RIOS, 1995).

O organismo é filtrador, se alimentando de bactérias, algas, protozoários e detritos do meio. Deve ser destacado que a taxa de filtração diminui com o aumento da concentração de partículas, ficando estas acumuladas, interferindo o processo normal de seus batimentos (SOUTO, 1991). Tem sido utilizada em testes de toxicidade devido a sua capacidade para formar cistos dormentes, fornecendo, desse modo, material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo (superiores a seis meses), sem perda de viabilidade e sem necessidade de serem mantidas culturas contínuas de organismos-teste (BAROSA *et al.*, 2003).

Os testes de toxicidade animal, que utilizam o microcrustáceo *Artemia salina*, são de interesse, já que os efeitos produzidos nestes animais de laboratório são aplicáveis também aos mamíferos (KLASSEN; WATKINS, 2001).

O referido ensaio é simples, rápido, sensível e com custo relativamente baixo, consistindo apenas na estimativa da concentração de uma substância através da medida de uma resposta biológica: vida ou morte (CAVALCANTE *et al.*, 2001).

2.4.2 Análise em ratos

O principal modelo adotado para estudos de metabolismo é o rato. Devido a grande variabilidade genética e dos hábitos dietéticos das populações humanas, o modelo experimental com ratos mostra-se adequado para estudos experimentais desse gênero. O importante é a existência de uma similaridade geral entre o sistema

cardiovascular e outros sistemas fisiológicos, de ratos com o de outros mamíferos, incluindo o homem.

Em 1977, o Instituto Americano de Nutrição (AIN) publicou a fórmula de uma dieta experimental para roedores, denominada AIN-76A. Em 1993, a formulação desta dieta foi substituída e publicada como AIN-93, por Reeves *et al.*, a qual é utilizada amplamente em ensaios biológicos com ratos na atualidade.

2.4.2.1 Análise da glicemia

A glicemia é a concentração de glicose no sangue ou mais precisamente no plasma. A glicose é um monossacarídeo produzido pelos vegetais através da fotossíntese, ou no organismo pela hidrólise de carboidratos mais complexos. A gliconeogênese também sintetiza a glicose, principalmente no fígado, a partir dos resíduos de carbono de outros compostos. Após a absorção pelo intestino delgado, a glicose pode tornar-se disponível como fonte de energia para o metabolismo celular, formar glicogênio para ser armazenado no fígado e nos músculos ou ser transformada em triglicerídeos para utilização subsequente como fonte de energia (NURO *et al.*, 2010).

As fibras insolúveis geralmente não reduzem os níveis sanguíneos de glicose, enquanto as fibras solúveis tornam-se viscosas quando misturadas com água, aumentando o tempo de trânsito intestinal e retardando a absorção da glicose (ANDERSON, 2003).

Muitos estudos demonstram que uma série de fatores podem influenciar nas respostas glicêmicas dos alimentos, incluindo o tipo de carboidrato, natureza do amido, modo de processamento do alimento, entre outros (ADA, 2004).

A taxa glicêmica está associada com o aparecimento da sensação de fome. Quando a glicemia cai muito, automaticamente faz com que o ser vivo aumente sua ingestão de alimentos e, eventualmente a glicemia volta ao normal, sendo que a taxa normal de açúcar no sangue varia de 70 mg/dL a 99 mg/dL em um organismo em repouso (NURO *et al.*, 2010).

2.4.2.2 Análise de Lipídeos

As fibras insolúveis se ligam a sais biliares e reduzem a absorção de gordura e colesterol, mas nem sempre alteram os níveis de colesterol sérico, parcialmente porque a síntese de colesterol hepático pode compensar a má absorção de colesterol. As fibras solúveis, parecem diminuir especificamente o colesterol LDL (HENRIQUES *et al.*, 2008)

Os lipídeos séricos constituem-se basicamente de colesterol e triacilgliceróis (BISTNER *et al.*, 2002), sendo que o fígado tem a capacidade de converter triacilgliceróis em colesterol. O nível total de colesterol em ratos variam de 40-130 mg/dL (BIRCHARD; SHERDING, 1998).

O colesterol é importante para a formação e função das membranas celulares e para a síntese de sais biliares, de hormônios esteróides e da vitamina D, entretanto em excesso é o principal fator associado a doenças cardiovasculares. (SPOSITO *et al.*, 2007)

Os triacilgliceróis constituem a principal forma na qual os lipídeos são armazenados, sendo seu tipo predominante os lipídeos fornecidos pela dieta.

Os estudos acima indicam, portanto, que variabilidade no nível de colesterol e de triglicérides no plasma animal depende da dieta do mesmo (BISTNER *et al.*, 2002).

2.4.2.3 Análises dos minerais

Algumas fibras apresentam a capacidade de complexar-se com outros constituintes da dieta, arrastando-os para a excreção fecal. Os nutrientes da dieta, como proteínas, minerais, carboidratos digeríveis e lipídeos, também poderão ser excretados em maior ou menor quantidade, dependendo do tipo e quantidade de fibras presente na dieta (RAUPP *et al.*, 2004).

Algumas pesquisas, citadas por Schweizer e Edwards (1992), mostraram que a ingestão de fibras pode provocar um aumento de nitrogênio fecal. No entanto, outras investigações dos mesmos autores mostram que as fibras não interferem na excreção de proteína junto às fezes. A digestibilidade do nitrogênio protéico é influenciada pela natureza da fibra alimentar, dos carboidratos da dieta, da proporção de proteína da dieta, tempo de trânsito e degradabilidade da fibra. Vários

estudos apresentaram resultados contraditórios com relação ao efeito das fibras no processo de digestão-absorção dos minerais. Pesquisas de Cook *et al.* (1983) mostraram que, em indivíduos saudáveis, a celulose em baixa quantidade não causa interferência na absorção do zinco e do ferro, mas, quando fornecida em alta quantidade (16 g/ dia) pode causar um decréscimo de cálcio.

Agunbiade e Longe (1998) demonstraram, em ratos, que fibras insolúveis de feijão causaram a diminuição da absorção de minerais, com exceção do cálcio. Já a absorção de nitrogênio parece ser afetada quando é ingerida uma dieta contendo alta proporção de fibra alimentar. Igualmente foi observado que as proteínas associadas à fibra dos alimentos naturais parecem ser menos digeríveis, devido a sua íntima associação com a matriz da parede celular vegetal (TOMA; CURTIS, 1986).

Sendo assim, a influência das fibras alimentares na biodisponibilidade de minerais tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos.

2.4.2.4 Análises histológicas do fígado

Apesar dos avanços tecnológicos nas últimas décadas e o surgimento de técnicas avançadas de imagens e de biologia molecular, muitos dos diagnósticos pertinentes ao tratamento de patologias de alguns órgãos ainda dependem de análise morfológica do tecido, como é caso do tecido hepático.

O fígado é o segundo maior órgão do corpo e a maior glândula, no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para utilização por outros órgãos. Sendo assim, é uma interface entre o sistema digestivo e o sangue. A veia porta é responsável por grande parte do sangue que vai para o fígado, sendo que os nutrientes chegam do intestino ao fígado por esta via, com exceção dos lipídeos complexos. A posição do fígado no sistema circulatório é ideal para captar, transformar e acumular metabólitos, como também para a neutralização e eliminação de substâncias tóxicas. A eliminação ocorre na bile, uma secreção exócrina do fígado, importante para a digestão dos lipídeos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O órgão possui coloração vermelho acastanhado e é recoberto por uma fina e forte cápsula de tecido conjuntivo. No corpo humano, pesa em torno de 1500 g e situa-se no lado direito do corpo, com sua superfície superior convexa adaptada a

superfície inferior do diafragma em forma de cúpula (CORMACK, 1994).

O fígado possui diversas funções metabólicas bioquímicas essenciais como: metabolismos de carboidratos, lipídios, proteínas; síntese de proteínas plasmáticas e fatores de coagulação; excreção de medicamentos, toxinas e metabólitos; e formação e eliminação da bile. É um órgão com grande capacidade de funcionamento e regeneração (CALAMARI, 2011).

Como os diversos órgãos, o fígado é composto por parênquima e estroma. O parênquima é formado por células epiteliais de origem endodérmica, denominadas células hepáticas chamadas de hepatócitos. Os hepatócitos se agrupam em placas interconectadas, dispostas radialmente, conhecidas por lóbulos hepáticos. Em regiões nas periferias dos lóbulos existe tecido conjuntivo, junto com vasos linfáticos, ductos biliares, nervos e vasos sanguíneos, chamado espaço porta. A veia porta contém sangue proveniente do trato digestivo, pâncreas e baço. Os espaços entre os cordões de hepatócitos contêm capilares, chamados de sinusóides hepáticos. Na periferia desses sinusóides, encontram-se macrófagos fixos do fígado, conhecidos por células de Kupffer. Essas células fagocitárias possuem funções específicas de metabolizar eritrócitos envelhecidos, digerir hemoglobina, secretar proteínas relacionadas com o processo imunológico e destruir bactérias que eventualmente entrem no fígado a partir do intestino grosso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; CORMACK, 1994).

Os hepatócitos frequentemente podem armazenar glicose e lipídeos na forma de glicogênio e triglicerídeos, respectivamente, em quantidades que variam de acordo com o ritmo circadiano e estado nutricional do organismo. Desta forma, o fígado contribui para manutenção da glicemia sanguínea e, conseqüentemente, da homeostasia do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção e utilização de nanofibrilas de celulose para potencial utilização em alimentação animal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar as nanofibrilas de celulose a partir de resíduos de bainha de pupunha.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações das nanofibrilas de celulose frente a *Artemia salina*.
- Avaliar *in vivo* em ratos, *Rattus norvegicus albinus*, os efeitos da dieta contendo diferentes concentrações de nanofibrilas de celulose no perfil lipídico e na glicemia dos animais.
- Caracterizar e quantificar os micro e macronutrientes minerais nas fezes dos animais dos diferentes grupos.
- Verificar a correlação do consumo das nanofibrilas das rações com a massa corporal.
- Avaliar por análise histológica, o fígado dos animais para investigar alterações com relação com o grupo controle.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A FIGURA 2 mostra um diagrama esquemático do experimento realizado no presente trabalho.

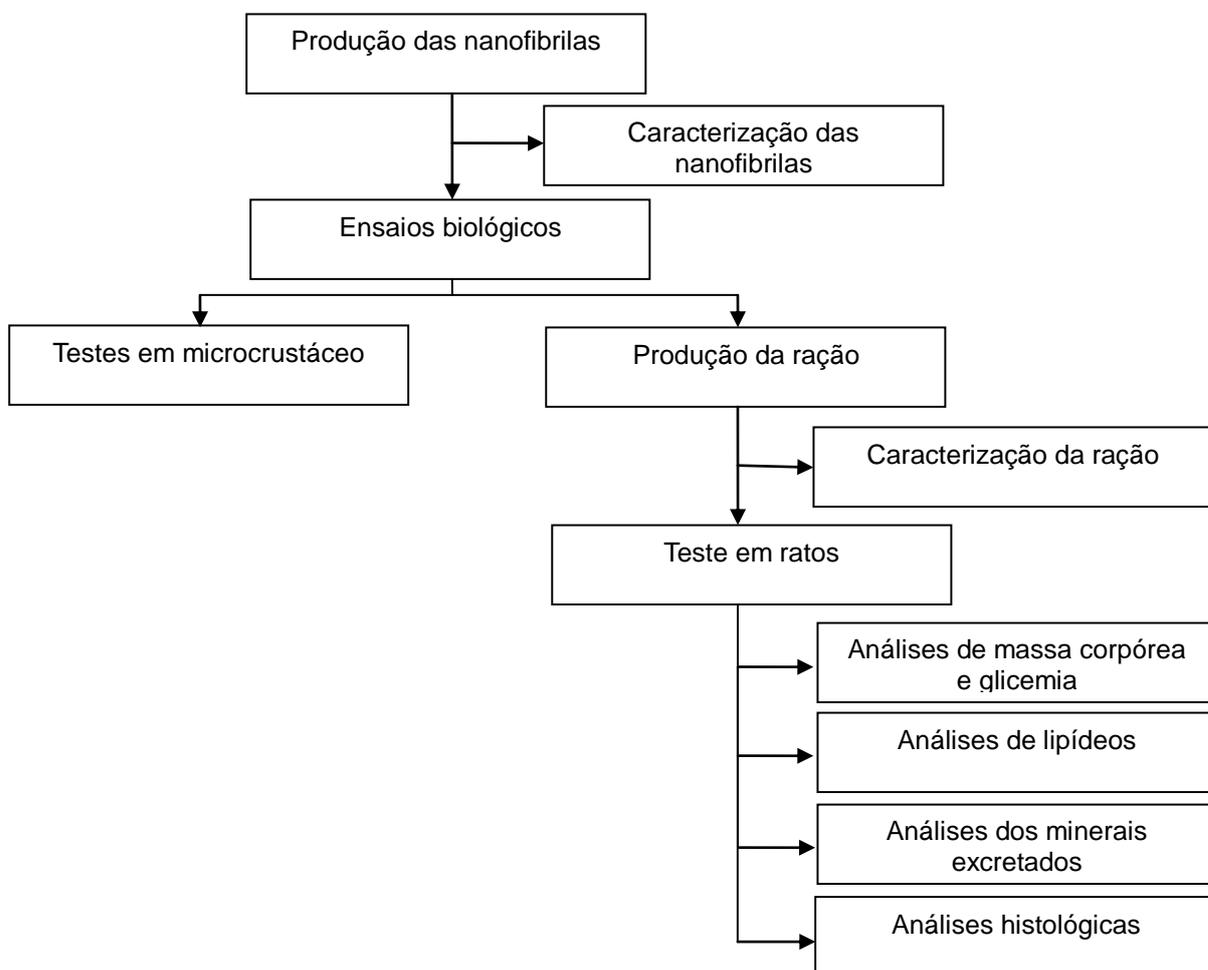


FIGURA 2 - Diagrama esquemático experimental.

Fonte: A autora (2013).

4.1 PRODUÇÃO DAS NANOFIBRILAS

As nanofibrilas tiveram como matéria-prima o resíduo das bainhas de pupunha, obtido de uma agroindústria de palmito pupunha, localizada em Morretes, no Estado do Paraná. A etapa de produção das nanofibrilas encontra-se esquematizada na FIGURA 3. O processamento foi realizado no Laboratório de

Tecnologia de Produtos Não-Madeiráveis da Embrapa Florestas (Colombo – PR).

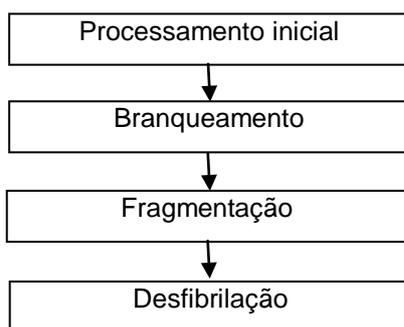


FIGURA 3 - Diagrama esquemático da produção das nanofibrilas.

Fonte: A autora (2013).

A etapa preliminar, de branqueamento do resíduo de bainha de pupunha, consistiu na inserção de 5 g de amostra junto a 160 mL de água, 1,5 g de clorito de sódio e 10 gotas de ácido acético em erlenmeyer de 250 mL e aquecimento por 60 min, em temperatura entre 70 – 80 °C. Esta etapa foi repetida até a verificação do branqueamento total da amostra, em média 3 vezes.

A polpa celulósica inicialmente foi fragmentada em liquidificador com 450 W de potência, por 10 minutos com a concentração de 1%. Posteriormente, foi submetida à moagem. O moinho utilizado para obtenção das nanofibrilas foi o Microprocessador Super Masscolloider Masuko Sangyo, que consiste em um disco giratório acoplado a um disco fixo, com uma abertura ajustável entre eles onde foi depositada a amostra. Através do atrito entre as fibras e os discos ocorreu a desfibrilação. Tal equipamento encontra-se representado na FIGURA 4.



FIGURA 4 - Equipamento utilizado para obtenção das nanofibrilas.

Fonte: A autora (2013).

Os parâmetros técnicos adotados para obtenção das nanofibrilas de celulose foram: Consistência 0,01%; Rotação 1500 rpm; Número de passes 30; Distância entre discos 0,1mm.

4.1.1 Caracterização das nanofibrilas

As nanofibrilas foram caracterizadas quanto às suas dimensões e características químicas.

4.1.1.1 Análise ultra-estrutural em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e em microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para análise em MEV, cerca de 10 gotas de amostra foram depositadas sobre lamínulas circulares (13 mm de diâmetro), as quais foram secas a seguir, a temperatura ambiente. Na sequência, as lamínulas foram submetidas à metalização com ouro, empregando-se o auxílio do aparelho SCD 030 – Balzers. Procedeu-se à análise posterior no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6360 – LV SCANNING ELECTRON MICROSCOPE) do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR, apresentado na FIGURA 5.



FIGURA 5 - Microscópio eletrônico de varredura

Fonte: A autora (2013).

Para a análise em MET, a amostra foi submetida a um procedimento de individualização das fibras de celulose. Para tal processo, uma parte da amostra foi diluída em 4 partes de álcool etílico PA em eppendorf. Essa amostra diluída foi submetida à sonicação por 60 min. Após essa etapa, a amostra foi gotejada sobre

telinha com cobertura de Parlódio. Uma vez secas a temperatura ambiente, as amostras foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), marca JEOL, modelo JEM1200EX-II, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR, que pode ser visualizado na FIGURA 6.

As imagens resultantes foram processadas com o software Paint.netTM versão 3.5.10, o que permitiu uma estimativa do dimensionamento das fibrilas.



FIGURA 6 - MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO (MET).

Fonte: A autora (2013).

4.1.1.2 Caracterização química das nanofibrilas

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Produtos Não Madeiráveis da Embrapa Florestas e os dados foram expressos em % em base seca (m/m). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que cada dado corresponde à média aritmética de três repetições. O equipamento utilizado para pesagens de todas as amostras foi a balança analítica Marte, modelo AY220, apresentada na FIGURA 7.



FIGURA 7 – Balança analítica utilizada no processo experimental.

Fonte: A autora (2013).

4.1.1.2.1 Teor de Umidade

A umidade corresponde à perda de peso sofrida pelo produto, quando aquecido em condições nas quais a água é removida. Para a quantificação do teor de umidade das amostras utilizou-se o método gravimétrico, segundo a metodologia preconizada nos Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005). Obedecendo à técnica, cerca de 5 g de diferentes amostras foram pesados em cadinhos de porcelana (50 mL), previamente secos, numerados e tarados. Procedeu-se em seguida à secagem em estufa Fanem, 315 SE (FIGURA 8) a 105°C *overnight*. As amostras foram, então, retiradas da estufa, colocadas em dessecador até resfriamento a temperatura ambiente e pesadas novamente.



FIGURA 8 - Estufa utilizada nos testes para determinação de umidade.

Fonte: A autora (2013).

Os cálculos para verificação do teor de umidade foram realizados conforme fórmula a seguir:

$$\text{Teor de Umidade (\%)} = 100 \times \frac{(m3-m2)}{m1}$$

Onde, $m3$ = massa do cadinho com a amostra seca, em gramas

$m2$ = massa do cadinho previamente seco, em gramas

$m1$ = massa da amostra úmida, em gramas

4.1.1.2.2 Teor de Cinzas

O teor de cinzas é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura de 550 °C. Geralmente as cinzas são obtidas por ignição de quantidade conhecida de amostra (BRASIL, 2005).

Aproximadamente 2g de amostra foram pesados em cadinhos de porcelana (25 mL), previamente calcinados, numerados e tarados.



FIGURA 9 - Mufla utilizada nos testes para determinação de cinzas.

Fonte: A autora (2013).

As amostras foram carbonizadas em chapa elétrica em baixas temperaturas e, na sequência, transferidas para a mufla JUNG, J200 (FIGURA 9), onde foram aquecidas à 550°C por 4 horas até eliminação do carvão. Após esse procedimento, o material foi colocado em dessecador durante 60 min para resfriamento e pesado novamente.

Para verificação do teor de cinzas, utilizou-se da seguinte fórmula:

$$\text{Teor de Cinzas (\%)} = 100 \times \frac{(m3-m2)}{m1}$$

Onde, $m3$ = massa do cadinho com a amostra calcinada, em gramas

$m2$ = massa do cadinho previamente calcinado, em gramas

$m1$ = massa da amostra úmida, em gramas

4.1.1.2.3 Teor de Lipídeos

Os lipídeos foram extraídos diretamente das amostras em aparelho extrator de gordura (Tecnal, TE-044), com éter etílico anidro como solvente e gravimetria, de acordo como método oficial número 920.39 C da *Association of official analytical chemists* (BRASIL,2005).

Cada amostra (cerca de 1 g) foi seca em cadinhos de alumínio, contendo algodão desengordurado a 105 °C por 4 horas. Após a secagem foram colocadas em cartuchos de celulose. Paralelamente, *reboylers* também foram secos a 105 °C por 4 horas, identificados e pesados.



FIGURA 10 – Aparelho extrator de lipídeos .

Fonte: A autora (2013).

No aparelho extrator de lipídeos, mostrado na FIGURA 10, 100 mL de éter etílico foram transferidos para os *reboylers*, junto ao cartucho de celulose contendo cada amostra, para extração de lipídeos por ebulição direta durante 1h e 30 min, seguidos da recuperação do solvente. Os *reboylers* contendo os lipídeos extraídos foram então secos a 105 °C por 4 horas, para posterior pesagem.

O resíduo obtido não é constituído unicamente por lipídeos, mas por todos os componentes que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo éter etílico. Esses outros componentes, no entanto, não chegam a representar uma diferença significativa nas determinações, conforme indicado nos métodos da ANVISA (BRASIL,2005).

Os cálculos para verificação do teor de lipídeos foram realizados conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Teor de Lipídeos (\%)} = 100 \times \frac{(Rf - Ri)}{m1}$$

Onde, Rf = massa do Reboylet com os lipídeos extraídos, em gramas

Ri = massa do Reboylet seco, em gramas

$m1$ = massa da amostra úmida, em gramas

4.1.1.2.4 Teor de Proteínas

A quantificação de proteínas baseou na determinação de nitrogênio, segundo o método clássico de Kjeldahl. O nitrogênio total foi determinado pelo método micro KJELDAHL, por digestão da matéria orgânica, seguida por destilação e titulação de acordo com método oficial número 991.20 da *Association of official analytical chemists* (BRASIL, 2005).

Em tubos específicos para tal finalidade, foram pesados (em triplicata) 0,5 g de amostra e 0,5 g de catalisador (selenito de sódio, sulfato de sódio e sulfato de cobre), adicionando-se à mistura 5mL de ácido sulfúrico P.A. Esses tubos foram levados a um bloco digestor, conforme FIGURA 11, onde a matéria orgânica existente na amostra foi decomposta e o nitrogênio foi transformado em sal amoniacal, pelo aquecimento gradativo a 350 °C. Este ponto foi verificado pela mudança da coloração da amostra de escura a verde clara.



FIGURA 11 – Tubos no processo de digestão da matéria orgânica para determinação de proteínas.

Fonte: A autora (2013).

Procedeu-se à destilação em destilador de nitrogênio Tecnal, TE 036/1 (FIGURA 12), onde os tubos receberam hidróxido de sódio 40% até viragem de

coloração. Este momento indica que a amônia foi liberada do sal amoniacal. Na sequência, a amostra foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL contendo uma solução de ácido bórico 5%, contendo indicador misto.



FIGURA 12 – Destilador de Nitrogênio Tecnal, TE 036/1.

Fonte: A autora (2013).

A titulação, ou seja, a determinação da quantidade de nitrogênio presente na amostra, foi realizada com ácido clorídrico 0,1 mol/L, com o auxílio de uma bureta automática VitLab. Os cálculos para verificação do teor de proteínas foram realizados conforme fórmula:

$$\text{Teor de Proteínas (\%)} = \frac{V \times 0,14 \times fc \times 6,25}{m1}$$

Onde, V = valor em mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L gasto na titulação

fc = fator de correção do ácido clorídrico 0,1 mol/L

$m1$ = massa da amostra em gramas

O fator de conversão 6,25 é utilizado no método oficial da *Association of official analytical chemists*, número 991.20 (BRASIL, 2005), com base nas premissas de que a maior parte das proteínas contém 16% de nitrogênio, que elas são 100% digeríveis, e que quantidades desprezíveis de nitrogênio não protéico estão presentes nos alimentos.

4.1.1.2.5 Teor de Fibras Totais

O termo fibra alimentar, como visto anteriormente, foi proposto por Hipsely e definida por Trowell como os componentes das paredes celulares vegetais incluídas na dieta humana que resistem a ações das secreções do trato intestinal (BOMBO, 2006).

Para a determinação das fibras totais, foi utilizado o método enzimático-gravimétrico modificado segundo a metodologia Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Luz (BRASIL, 2005).

Cerca de 1 g de cada amostra foi pesado, em duplicata, em erlenmeyer de 250 mL e diluído em 50 mL de tampão fosfato. A digestão das amostras, ilustrada na FIGURA 13 consistiu na incubação em banho maria Dubnoff (Nova Técnica, NT 232) com três diferentes enzimas, de forma sequencial, primeiramente incubação com α -amilase a 100 °C por 30 min, seguido por incubação com protease a 60 °C por 30 min) e finalmente com amiloglicosidase a 60°C por 30 min. Após o período de incubação procedeu-se à precipitação das fibras pela adição de álcool etílico a 60 °C, seguido de repouso por 60 minutos.



FIGURA 13 - Incubação das amostras em banho maria Dubnoff.

Fonte: A autora (2013).

Após a precipitação, as fibras foram filtradas, conforme FIGURA 14, com o auxílio da Bomba de vácuo Marconi, em cadinhos previamente preparados contendo celite (reagente a base de sílica, utilizado para diminuir as perdas por filtração), levados para estufa a 105 °C por 12 horas, ou até peso constante, resfriados e pesados. Após a pesagem dos cadinhos, uma das amostras da duplicata foi submetida à análise de cinzas e outra a de proteínas, conforme procedimentos já citados.



FIGURA 14 – Filtração das amostras de Fibras após precipitação.

Fonte: A autora (2013).

Para os cálculos do teor de fibras utilizou-se a seguinte equação:

$$CAD = \frac{(Cf - Ci) \times 100}{m1}$$

Onde, Cf = Cadinho após filtração e permanência em estufa, em gramas

Ci= Cadinho preparado previamente com celite, em gramas

m1 = massa da amostra úmida, em gramas

$$Fibra\ alimentar\ Total\ (\%) = \frac{CAD\ 1 + CAD\ 2}{2} - \% Cinzas - \% Proteínas$$

Onde, CAD 1 = Um dos cadinhos da duplicata

CAD 2 = Outro cadinho da duplicata

4.1.1.2.6 Teor de carboidratos

O conteúdo de carboidratos foi estimado por diferença seguindo-se a metodologia utilizada por SILVA *et al.* (2001). Para o cálculo foram somadas as cinco determinações: umidade (%), lipídios (%), proteína (%), fibra alimentar (%) e cinzas (%). Esta soma foi subtraída do total (100%) e o resultado representa o teor de carboidratos do produto.

4.1.1.2.7 Valor calórico Total

O valor calórico total (VCT) de uma amostra de alimento foi calculado a partir dos dados de composição centesimal, de acordo com a RDC nº 360 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2003). No cálculo foram usados os fatores de conversão de 4 kcal/g para carboidratos e proteínas e de 9 kcal/g para lipídios, e expressos em kcal/g seguindo a equação:

$$VCT \text{ (Kcal/100g)} = (\text{proteína} \times 4) + (\text{carboidratos} \times 4) + (\text{lipídios} \times 9)$$

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.2.1 Teste de toxicidade das nanofibrilas frente à *Artemia salina*

As quantidades de nanofibrilas foram avaliadas quanto à letalidade frente à *Artemia salina* (FIGURA 15), com adaptações da metodologia de MEYER *et al.* (1982). Os ovos foram colocados para eclodir em solução salina comercial (*Salinity – Aqua vitro®*) na concentração de 35 g/L a 27 °C, 250 rpm por 24 horas.



FIGURA 15 – *Artemia salina*.

Fonte: A autora (2013).

Para os testes de toxicidade foram realizadas análises em triplicata das amostras, contendo 10 microcrustáceos em cada tubo e concentrações crescentes de gel de nanofibrilas de celulose, variando de 30 g/L a 110 g/L. O preparo e a leitura

dos testes foi realizada com auxílio de lupa estereoscópica (Leica L2), mostrada na FIGURA 16, decorridos os períodos de tempos 24, 48 e 72 horas após o início dos mesmos. O controle negativo consistiu em tubos com microcrustáceos em solução salina, sem adição de nanofibrilas.



FIGURA 16 – Lupa estereoscópica utilizada para contagem dos microcrustáceos no ensaio de toxicidade.

Fonte: A autora (2013).

4.2.2 Ensaio biológico em *Rattus norvegicus albinus*

4.2.2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) linhagem Wistar pesando entre 150 e 200 g, provenientes do Biotério Central da Universidade de Blumenau, no estado de Santa Catarina. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Nutrição da mesma Universidade, a temperatura controlada de 21 ± 2 °C, em ciclos claro/escuro de 12 horas, conforme mostrado na FIGURA 17. Tiveram acesso à água e ração *ad libitum*, sendo alimentados todos os dias.



FIGURA 17 – Biotério Central da Universidade de Blumenau.

Fonte: A autora (2013).

Previamente à realização dos ensaios, os animais permaneceram no laboratório durante um período de 24 horas para aclimatação.

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Blumenau/FURB/SC, segundo protocolo n^o 15/2012.

A seleção de ratos machos para o ensaio biológico visou evitar a possível interferência do ciclo estral das fêmeas, caracterizado por durar de 4 a 6 dias e ocorrer o ano todo. O efeito hormonal sobre a pressão arterial das fêmeas poderia gerar singularidades no experimento.

4.2.2.2 Dietas

A dieta é talvez o fator mais importante na experimental nutrição animal. No presente trabalho a ração de escolha foi a AIN 93, à semelhança de estudos anteriores, por ser muito utilizada em experimentação animal. Os critérios utilizados para formulação das dietas AIN 93 foram: 1) as rações devem ser feitas a partir de ingredientes purificados; 2) estão de acordo com as necessidades nutricionais dos animais; 3) devem ser produzidas com ingredientes facilmente disponíveis e a um custo razoável; 4) as composições são estáveis e reproduzíveis e 5) as dietas podem ser usadas numa ampla gama de aplicações. Os componentes para compor a dieta, apresentados na TABELA 1, foram adquiridos pela empresa RHOSTER

(Indústria e Comércio Ltda., Vargem Grande Paulista - SP) e preparados em uma vez única, no laboratório de Produtos Não-Madeiráveis, da Embrapa Florestas. A seguir, as dietas foram divididas em porções adequadas e enviadas para o Biotério Central da Universidade de Blumenau, onde os ensaios foram realizados.

Foram preparados quatro tipos diferentes de dietas: Grupo 0 (Dieta padrão - Controle); Grupo 1 (Dieta padrão complementada com 7% de suspensão de nanofibrilas); Grupo 2 (Dieta padrão adicionada de 14% de suspensão de nanofibrilas); Grupo 3 (Dieta padrão adicionada de 21% de suspensão de nanofibrilas).

Os teores de vitaminas, minerais e demais componentes da ração foram equilibrados segundo as recomendações da AIN-93M para ratos. A composição da ração padrão está apresentada na TABELA 1.

TABELA 1 – Formulação das dietas AIN – 93 M para manutenção de roedores (Reeves *et al.*, 1993).

Amido de milho (g/Kg)	465,69
Caseína (85% de proteína) (g/Kg)	140
Amido de milho dextrinizado (g/Kg)	155
Sacarose (g/Kg)	100
Óleo de soja (g/Kg)	40
Fibras (g/Kg)	50
Mistura mineral (AIN-93M) (g/Kg) *	35
Mistura de vitaminas (AIN-93-M) (g/Kg) **	10
L-Cistina (g/Kg)	1,8
Bitartarato de colina (41,1% de colina) (g/Kg)	2,5
Terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (mg/Kg)	8

* Mistura mineral (g/kg): Carbonato de cálcio anidro 357,00; Fosfato de potássio monobásico 250,00; Citrato de potássio 28,00; Cloreto de sódio 74,0; Sulfato de potássio 46,60; Óxido de magnésio 24,00; Citrato férrico 6,06; Carbonato de zinco 1,65; Sódio meta-silicato 1,45; Carbonato de manganês 0,63; Carbonato de cobre 0,30; Sulfato de cromo e potássio 0,275; Ácido bórico 81,50 (mg/Kg); Fluoreto de sódio 63,50 (mg/Kg); Carbonato de níquel 31,80 (mg/Kg); Cloreto de lítio 17,40 (mg/Kg); Selenato de sódio anidro 10,25 (mg/Kg); Iodato de potássio 10,00 (mg/Kg); Paramolibdato de amônio 7,95 (mg/Kg); Vanadato de amônio 6,66 (mg/Kg) ; Sacarose pulverizada 209,806. ** Mistura Vitamínica (g/kg): Ácido nicotínico 3,00; Pantotenta de cálcio 1,60; Piridoxina-HCl 0,70; Tiamina-HCl 0,60; Riboflavina 0,60; Ácido fólico 0,20; Biotina 0,02; Vitamina B-12 2,50; Vitamina E 15,00; Vitamina A 0,80; Vitamina D-3 0,25; Vitamina k-1 0,07; Sacarose pulverizada 974,655.

A FIGURA 18 mostra o aspecto geral das diferentes misturas alimentares.

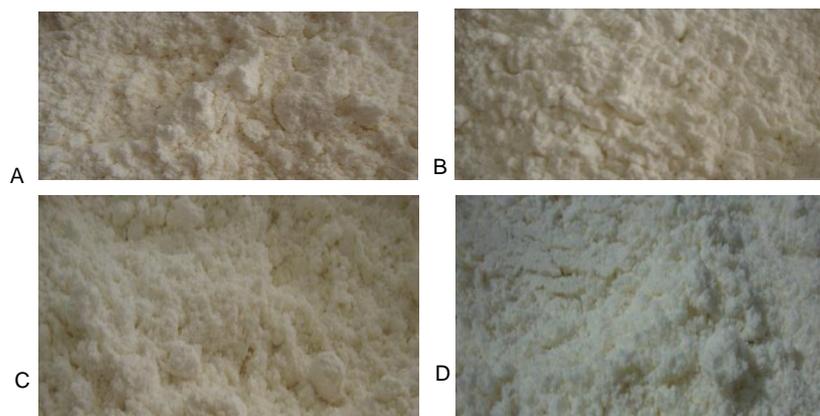


FIGURA 18 – Rações produzidas segundo AIN – 93 M.

A. Ração Padrão (Controle); B. Ração padrão com 7% de solução de nanofibrilas; C. Ração padrão com 14% de solução ;D. Ração padrão com 21% da mesma solução .

Fonte: A autora (2013).

4.2.2.2.1 Caracterização das Rações usadas nas Dietas

Os quatro tipos diferentes de rações foram caracterizados quanto à composição centesimal, por teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e fibras, conforme apresentado no Item 3.1.1 deste documento. Além da composição centesimal básica, ainda foram determinados os teores de acidez e o pH.

a) Teor de Acidez

Para a determinação da acidez, utilizou-se titulometria, segundo metodologia padrão para análise de alimento das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Luz (BRASIL, 2005).

Foram pesados 5 g de amostra em erlenmeyer de 125 mL e adicionados 100 mL de água de osmose reversa. A solução foi homogeneizada e filtrada em papel filtro qualitativo. Uma alíquota de 25 mL do filtrado foi separada e procedeu-se à titulação, utilizando-se bureta automática VitLab, com hidróxido de sódio 0,1 mol/L e fenolftaleína como indicador, conforme ilustra a FIGURA 19.



FIGURA 19 – Ensaio para verificação do teor de acidez.

Fonte: A autora (2013).

Os cálculos foram realizados segundo a fórmula:

$$\text{Acidez (\%)} = \frac{V \times fc \times 100}{m \times c}$$

Onde, *V* = volume (mL) de hidróxido de sódio gasto na titulação.

Fc = fator de correção do hidróxido de sódio utilizado

m = massa da amostra utilizada em gramas

c = fator de correção, que é igual a 10 para uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L.

b) pH

A análise de pH foi realizada com a mistura de 10 g de amostra em 100 mL de água de osmose reversa com o auxílio de um pHmetro (Hanna Instruments, modelo pH211) previamente calibrado (FIGURA 20), segundo metodologia oficial do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005).



FIGURA 20 – pHmetro utilizado para a verificação do pH das rações.

Fonte: A autora (2013).

4.2.2.3 Ensaio Biológico propriamente dito

Os animais foram divididos em quatro grupos de oito, de acordo com a variação da concentração de nanofibrilas adicionadas à ração e alimentados durante 30 dias para testes bioquímicos, incluindo a verificação da taxa glicêmica e para a avaliação do peso.

Ao final dos 30 dias de experimento, os ratos foram mantidos em jejum de oito horas, com acesso à água *ad libitum* e sacrificados por overdose anestésica, conforme FIOCRUZ (2008), de xilazina, quetamina e barbitúrico. Imediatamente após o momento do sacrifício foram coletados os fígados dos animais para as análises histológicas e amostras de sangue para as análises de lipidograma.

4.2.2.3.1 Parâmetros metabólicos

As amostras de sangue para as análises de lipidograma foram coletadas através de punção cardíaca, no momento do sacrifício, armazenadas em tubos de ensaio e estocadas em geladeira, sem anticoagulante. Para a realização dos ensaios bioquímicos, as amostras foram centrifugadas, em Centrifuga Excelsa Baby 1 da Marca Fanem, para separar o coágulo (ou os elementos figurados do sangue) do plasma, por 10 minutos a 3500 rpm, conforme mostrado na FIGURA 21.



FIGURA 21 – Separação do plasma para análises bioquímicas.

Fonte: A autora (2013).

Para as análises de colesterol total e triglicerídeos foram utilizados kits da

marca Analisa[®]. Todas as determinações incluíram ensaios em branco e do respectivo padrão.

Para a análise do colesterol total foi utilizado um método enzimático colorimétrico (Trinder), onde os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol-esterase formando colesterol livre que, após a oxidação com colesterol-oxidase, forma peróxido de hidrogênio. Este peróxido reage com fenol, 4-aminoantipirina através da oxidação catalisada pela peroxidase, produzindo uma substância de cor vermelha, a quinonimina. Para a realização do ensaio, 10 microlitros de plasma e 1000 microlitros de reagente de cor foram transferidos para um tubo de ensaio, com o auxílio de micropipetador automático. Seguiu-se a incubação em banho maria a 37 °C por 10 minutos e a leitura espectrofotométrica a 500 nm para a detecção da quinonimina formada. (ANALISA, Belo Horizonte- MG, 2010).

A análise de triglicerídeos seguiu um método enzimático colorimétrico (Trinder), onde os triacilgliceróis são hidrolisados pela lipase lipoprotéica. O glicerol liberado é fosforilado pela glicerolquinase formando glicerofosfato, que é então oxidado à dihidroxiacetona e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através da reação da copulação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com a 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, produzindo uma substância de cor avermelhada (quinoneimina) que é lida em espectrofotômetro. Para a dosagem, foram adicionados 10 microlitros de amostra e 1000 microlitros de reagente de cor em um tubo de ensaio, Esse tubo foi levado para incubação em banho maria a 37 °C por 10 minutos e realizou-se leitura espectrofotométrica a 505 nm (ANALISA, Belo Horizonte- MG, 2010).

4.2.2.3.2 Teores de Minerais nas Fezes

Todas as amostras de fezes a serem analisadas passaram por processamento em triturador de bancada Waring modelo 334BL97, (FIGURA 22), e posteriormente foram submetidas à secagem a 60 °C durante 24 horas, para retirada da umidade residual.



FIGURA 22 - Triturador de bancada Waring.

Fonte: A autora (2013).

Para a determinação de minerais é necessário tornar os analitos de interesse disponíveis em solução. A destruição da matéria orgânica é considerada uma etapa crítica podendo levar a erros no resultado final, por contaminação da amostra ou perda do analito de interesse por meio de adsorção ou volatilização (BRASIL, 2005).

Amostras de aproximadamente 0,5 g, previamente secas, foram pesadas em um tubo apropriado. Acrescentou-se 4 mL de ácido nítrico P.A. (65%). Os tubos foram colocados, então, no bloco digestor com aumento gradativo de 50 °C até a temperatura de 150 °C. No ponto em que a amostra encontrava-se bem digerida, visível pelo aspecto incolor, foram acrescentados 0,5 mL de ácido perclórico e promoveu-se o aumento da temperatura do bloco, que foi a 180 °C. A digestão total das amostras tomou cerca de seis horas. Quando as amostras encontraram-se totalmente digeridas, restando aproximadamente 0,5 ml do extrato mineral incolor, aguardou-se o resfriamento dos tubos e adicionou-se 15 ml de água de osmose reversa.

A determinação dos micronutrientes como Cobre, Ferro, Manganês e Zinco e dos macronutrientes Cálcio e Magnésio, foram efetuadas no Espectrômetro de Absorção Atômica AAnalyst 200, da Perkin Elmer (FIGURA 23). As leituras referentes aos micronutrientes foram realizadas em amostra pura, enquanto as leituras de cálcio e magnésio foram diluídas. A determinação de Enxofre e Fósforo foi realizada no Espectrofotômetro UV-VIS 1800, Shimadzu (FIGURA 24), enquanto a determinação de Sódio e Potássio no Fotômetro de Chama 910 MS, da marca Analyser (FIGURA 25).



FIGURA 23 – Espectrômetro de Absorção Atômica.
Fonte: A autora (2013).



FIGURA 24 - Espectrofotômetro UV-Vis.
Fonte: A autora (2013).



FIGURA 25 - Fotômetro de Chama.
Fonte: A autora (2013).

4.2.2.3.3 Massa Corporal e análise da taxa glicêmica

O controle da massa corporal dos animais foi realizado semanalmente, com auxílio de uma balança de precisão OHAUS, conforme mostrado na FIGURA 26.



FIGURA 26 - Procedimento de pesagem dos animais.

Fonte: A autora (2013).

A determinação da glicemia sanguínea foi realizada com o emprego do sistema de monitoramento de Glicemia True Read da Marca HOME Diagnostics. Para a testagem, uma pequena gota de sangue da cauda do animal é colocada sobre a ponta de uma fita específica do aparelho, e este fornece a leitura em mg/dL, conforme mostrado na FIGURA 27.



FIGURA 27 - Sistema de monitoramento de glicemia.

Fonte: A autora (2013).

4.2.2.3.4 Análises Histológicas dos fígados

O material foi processado segundo a técnica histológica de rotina, conforme metodologia descrita por Ribeiro e Groztner (2012). Os fígados dos animais foram fixados em formaldeído 10% por 72 horas. O fixador preserva e oxida o material,

favorecendo a coloração (fator preponderante) e promove um prévio endurecimento do material. Após a fixação, realizou-se a desidratação com banhos sequenciais de uma hora e meia de duração com álcool etílico a 70%, 80%, 90%, seguidos por mais quatro banhos de álcool absoluto. Após este procedimento, procedeu-se a diafanização com 3 banhos de xilol, com durações de 40, 30 e 15 minutos, respectivamente. Posteriormente, o material foi incluído em parafina a temperatura entre 58 e 60 °C. A inclusão foi realizada em dois banhos sucessivos, com duração de 2 horas cada um. Após a inclusão, os órgãos foram emblocados em parafina. Com auxílio de um micrótomo, os blocos foram fatiados, resultando em cortes de 6 micrometros de espessura. A etapa posterior à microtomia, foi a desparafinização com xilol, seguida da hidratação com banhos sequenciais de álcool etílico em concentrações decrescentes, de 100%, 90%, 80% e 70% e finalmente em água destilada, sendo que cada banho teve a duração de 5 minutos. Os corantes utilizados nas lâminas deste trabalho foram hematoxilina e a eosina, sendo que o material ficou exposto à hematoxilina por 1 minuto, e à eosina por 30 segundos. Após a coloração do material, procedeu-se a montagem das lâminas com Permount®.

Na sequência, procedeu-se à análise das lâminas por microscopia de luz. A avaliação da arquitetura tecidual buscava averiguar a integridade do órgão ou a presença de alterações, em especial de degeneração gordurosa hepática (esteatose).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

A análise estatística foi realizada a partir da análise de variância (ANOVA: fator duplo sem repetição) dos valores obtidos nas diferentes concentrações de nano fibrilas. O valor de $p < 0,05$ entre os grupos experimentais foi considerado como existência de diferença estatisticamente significativa. Um valor de $p > 0,05$ indicou que os dados obtidos eram homogêneos, ou seja, as repetições eram reproduzíveis.

Foi utilizado igualmente, como pós teste, o teste de Tukey. Esse teste visa detectar a diferença mínima entre as médias necessária para que exista diferença estatisticamente significativa entre os grupos (VIEIRA, 1980).

Utilizou-se para a análise estatística o software GraphPad Prism version 5.01.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRILAS DE CELULOSE

A análise macroscópica do material produzido revela uma suspensão com consistência gelatinosa e aspecto leitoso, conforme apresentado na FIGURA 28.



FIGURA 28 – Aspecto de gel da suspensão de nanofibrilas.

Fonte: A autora (2013).

5.1.1. Análise das dimensões das Nanofibrilas de Celulose por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e de Varredura (MEV)

As FIGURAS 29 e 30 apresentam as nanofibrilas produzidas a partir da celulose proveniente da bainha da pupunha após processamento para MEV para MET, respectivamente.

A primeira abordagem para a caracterização microscópica das nanofibrilas foi uma análise em MEV. No entanto, como pode ser observado na FIGURA 29, as fibrilas encontravam-se todas fusionadas, polimerizadas, impedindo sua visualização individual. Esta configuração, devida provavelmente à alta energia de superfície do material, frustrou o objetivo do ensaio que era a quantificação da espessura da fibra.

Buscou-se, então, fracionar a amostra por sonicação, seguida de análise por MET. A imagem apresentada na FIGURA 30 revela ter sido adequado o tratamento, propiciando a visualização isolada de algumas nanofibrilas.

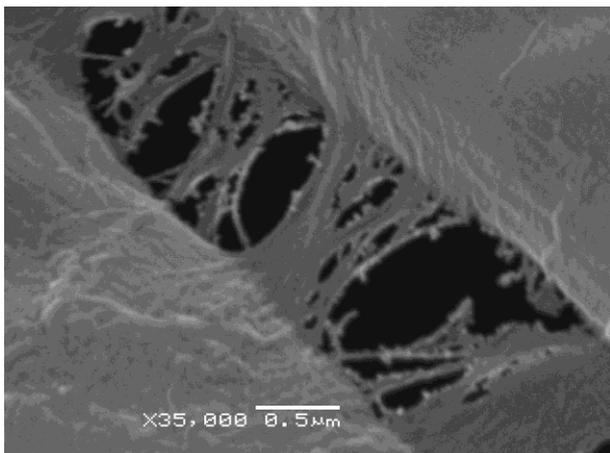


FIGURA 29 – Imagem obtida por MEV aumento de 35.000 X.

Fonte: A autora (2013).

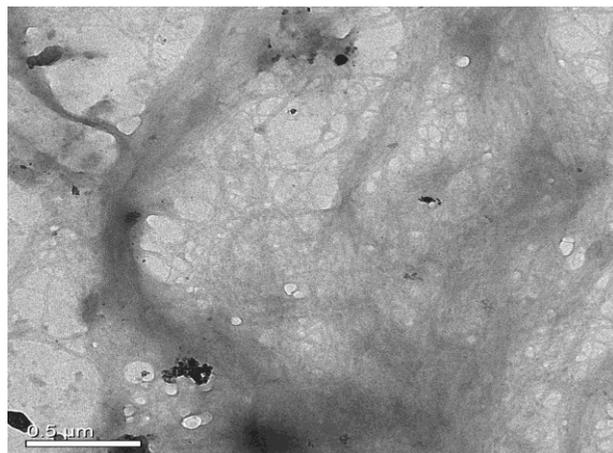


FIGURA 30 – Imagem obtida por MET aumento de 50.000 X.

Fonte: A autora (2013).

Para o dimensionamento das fibrilas em estudo empregou-se o *software* Paint.net™ versão 3.5.10. Após análises das imagens de MET pode-se constatar que a maioria das nanofibrilas, passíveis de serem visualizadas individualmente no aumento de 50.000 X, apresentam diâmetros na faixa de nanômetros (10^{-9} m).

A homogeneidade das amostras sonicadas, embora majoritária, não foi absoluta. Algumas das fibrilas observadas permaneceram agregadas, apresentando diâmetros superiores ao nível nanométrico desejado.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOFIBRILAS DE CELULOSE

Após o branqueamento e passagem pelo moinho, as amostras foram submetidas à análise de sua composição centesimal, segundo metodologia padrão para análise de alimentos (BRASIL, 2005), e os resultados estão apresentados na TABELA 2. O constituinte presente em maior quantidade foi a água livre (na forma de umidade). Tal resultado era previsível, já que para o preparo do material adotou-se a consistência de 0,01% de amostra (bainha de pupunha branqueada e processada).

Os dados de composição centesimal das nanofibrilas mostraram-se coerentes com aqueles esperados após o processamento. A etapa de branqueamento teve a finalidade de remover grande parte dos compostos presentes na bainha de pupunha, inclusive carboidratos simples e a lignina residual.

Não é de interesse a manutenção da lignina na solução a ser produzida, por ser quimicamente heterogênea e seu caráter amorfo dificultar a organização em

fibrilas. Desta forma, resiste ao tratamento principalmente a celulose, o material de interesse do presente trabalho.

O clorito, utilizado no branqueamento do resíduo da bainha de pupunha, tem um custo de 0,8 US\$/ kg de amostra branqueada, ou seja, esse branqueamento pode estar gerando ônus, portanto, para trabalhos futuros, sugere-se tentar produzir a solução de nanofibrilas sem a etapa de branqueamento, e verificar possíveis implicações no organismo.

O segundo constituinte presente em maior quantidade é o representado pelas fibras, com um valor total de 2,2126 g/100g e diferenciadas em solúveis e insolúveis, conforme mostram os valores da tabela.

Em estudos anteriores, foi verificado que o resíduo de pupunha utilizado para tal experimento, sem estar na forma de suspensão 0,01%, possui 59,3 g/ 100 g de fibras insolúveis e 3,7 g/100g de fibras solúveis, considerando um teor de umidade de 2,9 g/100 g (HELM, 2013). Sendo assim, após branqueamento e desfibrilação em moinho até suspensão de nanofibrilas, a relação entre fibras solúveis e insolúveis não foi mantida, verificando-se que esse processo disponibilizou maiores quantidades de fibras solúveis.

Os valores de lipídeos não foram detectados pela metodologia padrão utilizada, e, juntamente com os valores de minerais (na forma de cinzas) e proteínas (que foram encontrados em quantidades muito baixas) não se apresentaram em concentrações significativas. Portanto, foram desconsideradas nos cálculos quando a solução de nanofibrilas foi adicionadas às rações.

TABELA 2 – Composição centesimal das nanofibrilas produzidas, em base úmida.

Parâmetro (g/100 g)	(média ± DP)
Umidade	97,79 ± 0,034
Cinzas	0,06 ± 0,003
Fibras Solúveis	0,54 ± 0,012
Fibras Insolúveis	1,67 ± 0,003
Proteína	0,11 ± 0,015
Lipídeos	N.D.

N.D. Valores inferiores à sensibilidade da técnica

Fonte: A autora (2013).

5.3 TESTE DE TOXICIDADE DAS NANOFIBRILAS FRENTE À *ARTEMIA SALINA*

Uma avaliação preliminar da toxicidade das nanofibrilas de pupunha foi efetuada frente à *Artemia salina*. A utilização deste microcrustáceo como indicador de toxicidade possibilitou a realização do experimento rapidamente, sem grandes dificuldades de manipulação, além do baixo custo econômico e a facilidade de ser encontrada comercialmente.

O teste de toxicidade analisou o efeito de diferentes concentrações de nanofibrilas nos tempos de 24, 48 e 72 horas, Os resultados do referido ensaio podem ser analisados na FIGURA 31.

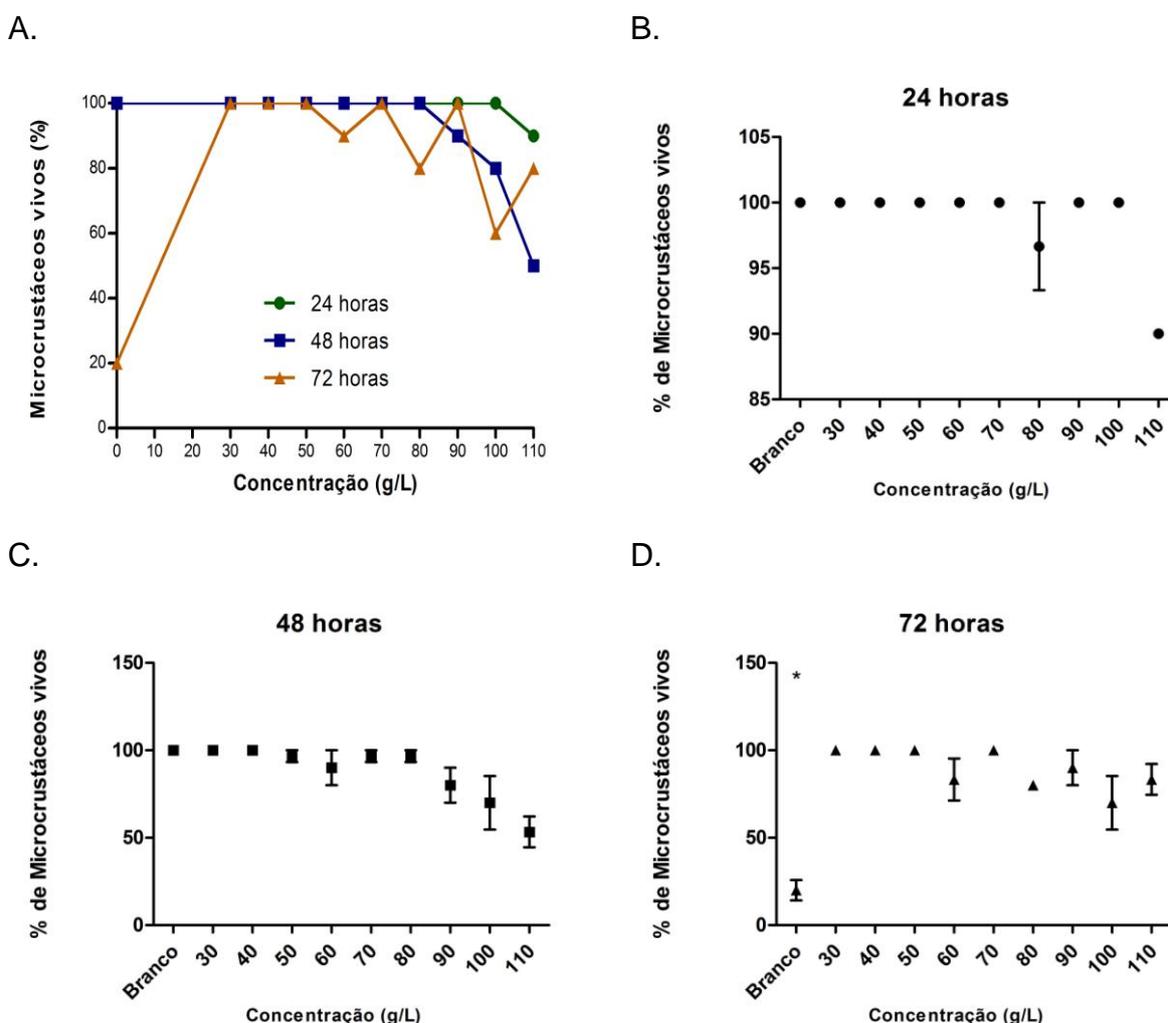


FIGURA 31 – Gráfico mostrando toxicidade das nanofibrilas frente a *Artemia salina* .

A. 24, 48 e 72 horas, em diferentes concentrações; B.% de microcrustáceos vivos em 24 horas; C.% de microcrustáceos vivos em 48 horas; D.% de microcrustáceos vivos em 72 horas.

* Valores com variação $p < 0,05$ segundo teste ANOVA e pós teste Tukey.

Fonte: A autora (2013).

Com relação à análise do efeito das nanofibrilas por 24 horas (FIGURA 31 A), percebeu-se que praticamente todos os animais permaneceram vivos em todas as concentrações, exceto na última, onde apenas 90% dos animais permaneceram vivos. Quando analisado estatisticamente (FIGURA 31 B), resultou em um valor de $p < 0.0001$ somente quando comparada a concentração de 110g/L com as demais, mostrando que somente esta apresenta diferença significativa. Neste caso, provavelmente, a grande densidade do meio (110 g/L da solução com 0,01% de consistência) acabou mascarando os resultados, dificultando a leitura da quantidade de animais presentes.

Considerando esta limitação técnica, em oportunidades posteriores, seriam interessantes repetições de testes de toxicidade com outros modelos experimentais, para verificar se maiores concentrações de nanofibrilas poderiam afetar os organismos.

Na leitura de 48 horas, houve um aumento gradativo de mortes a partir da concentração de 80 g/L, justificando a tendência decrescente no gráfico a partir desta concentração (FIGURA 31 A). A análise estatística dos dados, no entanto, não revelou diferenças significativas com o aumento da concentração, mostrando variação significativa com p de 0,0022 apenas para a concentração de 110 g/L, quando comparadas com as demais (FIGURA 31 C).

Na leitura de 72 horas, porém, embora possa ser observada uma tendência a um maior número de mortes, os resultados foram erráticos, não guardando relação direta do aumento da concentração do gel de nanofibrilas com o número de animais mortos (FIGURA 31 D). Segundo criadores do animal, a densidade ideal para o desenvolvimento desses microcrustáceos é 1.030 g/cm³, e a mistura da solução de nanofibrilas de celulose aumentou sensivelmente essa densidade conforme observação experimental.

Um ensaio em branco foi efetuado, para cada tempo (FIGURA 31 B, C e D). Nos tempos 24 e 48 horas, todos os animais colocados no tubo sem a solução em estudo sobreviveram. No tempo de 72 horas, 83,33% dos animais morreram e esse resultado mostrou-se significativamente diferente dos valores encontrados nas diferentes concentrações.

Esses resultados indicam que em pequenas concentrações, como as de 30, 40 e até 50 g/L da solução, o material produzido não apresenta efeitos tóxicos sobre o microcrustáceo, e sim, provavelmente, serve como fonte de nutrientes, garantindo

sua sobrevivência. Porém, se adicionado em grandes concentrações, acaba provocando um aumento drástico na densidade do meio, que possivelmente deve interferir nos movimentos básicos e, por consequência, no metabolismo do animal.

Estudos utilizando *Artemia salina* em testes toxicológicos têm sido realizados por pesquisadores do mundo todo para análise de efluentes, resíduo de mineração de carvão (BENASSI, 2004), estudo fitoquímico com fungos (SIQUEIRA *et al.*, 2001) e também em substâncias tóxicas na alimentação (RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Vários desses e outros estudos comprovam a ação tóxica ou não de várias substâncias naturais ao crustáceo *Artemia sp.*.

No entanto, conforme verificado nos ensaios acima as nanofibrilas de pupunha, quando ofertadas em baixas concentrações, trouxeram benefícios ao animal, servindo como fonte de recursos.

Os resultados do teste de toxicidade frente à *Artemia salina* serviram de base para os ensaios biológicos com ratos, relatados a seguir.

5.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM *RATTUS NORVEGICUS ALBINUS*

5.4.1 Composição das Rações

A composição das rações ministradas aos ratos (ração controle e acrescida de diferentes concentrações de nanofibrilas) foi analisada por métodos experimentais e os resultados estão arrolados na TABELA 3.

As rações foram avaliadas no intuito de verificar se, após o preparo, encontravam-se com valores próximos aos valores sugeridos por Reeves *et al.* (1993).

Conforme pode ser observado na TABELA 3, a composição das rações não apresentou expressivas diferenças aparentes com o aumento da quantidade de solução de nanofibrilas.

Para uma melhor compreensão dos valores apresentados, os dados foram tratados com teste de significância ANOVA e os resultados estão apresentados na FIGURA 32.

TABELA 3 – Composição centesimal das rações, em base seca.

	Controle	AIN +7%	AIN +14%	AIN + 21%
Umidade (g/100g)	8,81 ± 0,13	12,71 ± 0,21	18,05 ± 0,32	25,63 ± 0,49
Cinzas (g/100g)	3,16 ± 0,21	2,57 ± 0,10	2,86 ± 0,03	2,52 ± 0,28
Fibras (g/100g)	10,85 ± 0,25	10,01 ± 0,82	13,74 ± 0,23	11,51 ± 0,81
Proteínas (g/100g)	6,47 ± 0,12	6,88 ± 0,07	6,66 ± 0,06	6,95 ± 0,13
Lipídeos (g/100g)	1,09 ± 0,03	2,79 ± 0,19	3,51 ± 0,03	3,67 ± 0,06
Acidez	19,36 ± 0,12	15,74 ± 0,23	15,72 ± 0,22	14,33 ± 0,48
pH	6,16 ± 0,03	6,21 ± 0,02	6,26 ± 0,03	6,17 ± 0,04
Carboidratos (g/100g)	78,43	77,75	73,23	75,35
VCT (kcal/100g)	349,37	363,65	351,18	362,24

Valores referentes a média das triplicatas com desvio padrão.

Fonte: A autora (2013).

A umidade foi o único componente que sofreu um aumento gradativo mostrando-se significativamente diferente na comparação entre os diferentes grupos (FIGURA 32 A), conforme discutido anteriormente no item 5.2.

Com relação ao teor de cinzas, diferenças significativas foram observadas apenas na comparação da ração controle com a ração acrescida de 21% de solução de nanofibrilas (FIGURA 32 B). O teor de cinzas é o resíduo inorgânico presente no alimento, ou seja, é a porção mineral que não foi perdida por volatilização e que afeta as propriedades físico-química dos alimentos.

O teor de proteínas manteve-se praticamente constante, apresentando diferenças significativas apenas quando comparado a ração controle com as rações adicionadas de 7 e 21% de solução de nanofibrilas (FIGURA 32 C).

O teor de acidez apresentou pequena variação, sendo significativamente menor apenas para a ração com adição de 7% de solução de nanofibrilas, em relação à ração controle (FIGURA 32 E).

Quanto ao pH (FIGURA 32 F) os valores não apresentaram variações expressivas entre a ração controle e as demais. Diferenças significativas foram encontradas somente com adição de 14% com relação à ração controle e quando comparada com a ração com adição de 21% de solução de nanofibrilas.

Os teores de pH e acidez, além de influenciarem o sabor, e conseqüentemente a palatabilidade da ração para o animal, estão relacionados ainda com a estabilidade do alimento.

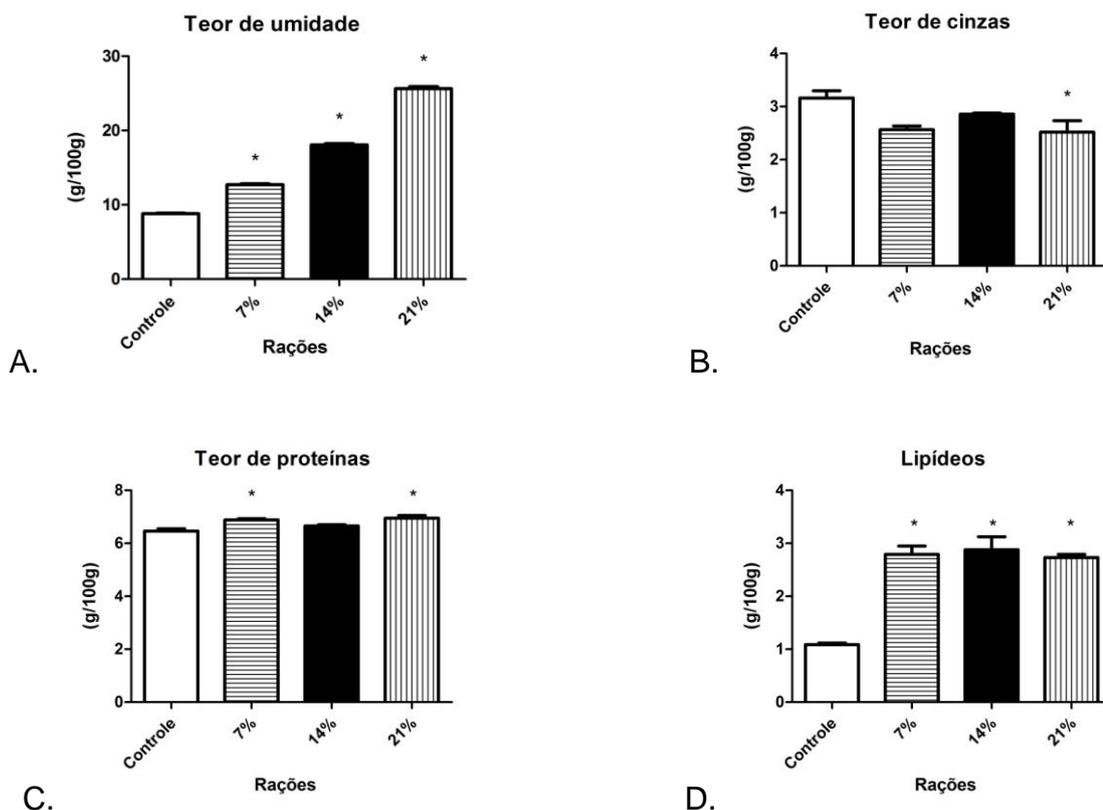
Como pode ser visto na FIGURA 32 D, o valor de lipídeos apresentou um acréscimo significativo ao comparar-se a ração controle com todas as demais

rações. Sugere-se em oportunidades futuras, refazer tais procedimentos.

O teor de fibras, por sua vez, mostrou valores muito próximos entre si, e quando analisados estatisticamente, apenas a ração com adição de 14% de solução de nanofibrilas apresentou variação significativa quando comparada às demais rações (FIGURA 32 G).

Esperava-se um leve acréscimo com o aumento da adição da solução de nanofibrilas na ração, porém, esse aumento não chegou a ser detectado pela metodologia padrão utilizada para tal análise. Deve ser destacado que o teor de fibras preconizado pela norma AIN – 93 M é de 5 g/100 g, valor inferior ao encontrado nas amostras de rações produzidas no estudo. Os valores encontrados foram no mínimo 50% maiores, com 10,85; 10,01; 13,74 e 11,51 g/100 g para os grupos controle, 1, 2 e 3, respectivamente.

Considerando a obediência aos mesmos procedimentos no preparo das rações, razoável seria que todos os parâmetros supracitados, exceto fibras, não apresentassem variação, já que as quatro diferentes rações foram produzidas com as mesmas quantidades dos componentes em sua formulação.



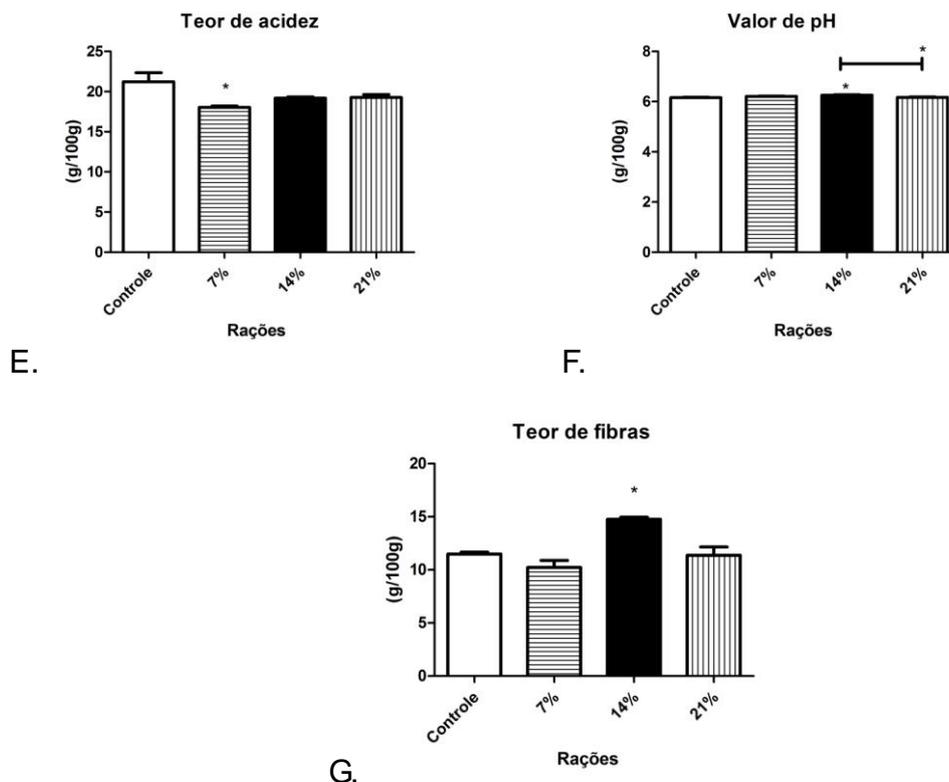


FIGURA 32 – Análise estatística dos resultados das análises de composição centesimal DAS quatro diferentes rações utilizados no exPerimento. A. Umidade; B. Cinzas; C. Proteínas; D. Lipídeos; E. Acidez; F. pH; G. Fibras.

* Valores com variação $p < 0,05$ segundo teste ANOVA e pós teste Tukey.

Fonte: A autora (2013).

5.4.2 Análise de massa corpórea

Todos os grupos avaliados tiveram um incremento em sua massa corpórea com o decorrer do experimento (28 dias), como pode ser observado na FIGURA 33.

O grupo controle teve um ganho total de massa de, aproximadamente, 10% ao longo do experimento. O grupo 1 (alimentados com ração padrão AIN 93, acrescida de 7% de suspensão de nanofibrilas), teve um aumento de peso médio de 9,03%, representando cerca de 35 g. O grupo 2 (ração padrão AIN 93, acrescida de 14% de suspensão de nanofibrilas) apresentou um aumento em massa médio de aproximadamente 40 g, representando um acréscimo de cerca de 9% do início ao final do experimento. Finalmente, o grupo 3 (ração padrão AIN 93, acrescida com 21% da suspensão de nanofibrilas) teve um aumento de massa global de 39,12 g, equivalente a um acréscimo total próximo de 9%.

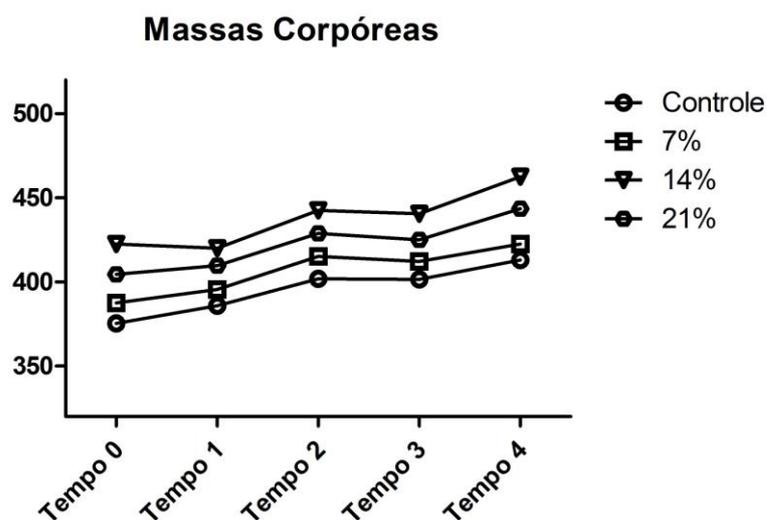


FIGURA 33 – Resultados da análise de massa corpórea nos diferentes grupos no decorrer do experimento.

Fonte: A autora (2013).

Analisando estes dados estatisticamente, com análise por regressão linear, pode-se perceber um r^2 de 0,9388, 0,882, 0,8495 e 0,8942 para os grupos controle, 1, 2 e 3 respectivamente. Esses valores de r^2 mostram que houve um aumento linear nas massas quando estes grupos foram analisados separadamente.

O valor de p para os grupos foram de 0,0065, 0,0164, 0,0260 e 0,0151, todos eles menores que 0,05, mostrando que há diferença significativa para os valores no decorrer do tempo em um mesmo grupo.

Esses dados indicam que os animais estavam saudáveis e se alimentando normalmente, não rejeitando a ração, tanto o grupo controle, quanto os demais grupos, corroborando a observação experimental de ausência de manifestações anormais como vômitos e/ ou diarreia.

Quando esses valores foram analisados de forma a averiguar se havia relações de interação entre os diferentes tempos e grupos, utilizando teste ANOVA, o valor de p foi de 1,0, não revelou variações significativas de interação entre as duas variáveis analisadas. No caso de existir uma interação significativa, deve-se evitar a interpretação dos efeitos em separado. Por esta razão, interpretou-se, apenas, o efeito da interação, evitando-se para evitar chegar a conclusões errôneas.

5.4.3 Análises bioquímicas

Foram analisados os parâmetros bioquímicos de glicemia e perfil lipídico dos animais sob ensaio.

5.4.3.1 Determinação da glicemia

A taxa de glicemia é fundamental para verificação dos processos homeostáticos do metabolismo. Essas taxas foram determinadas nos diferentes grupos de animais, ao longo do experimento, e os resultados estão apresentados na FIGURA 34.

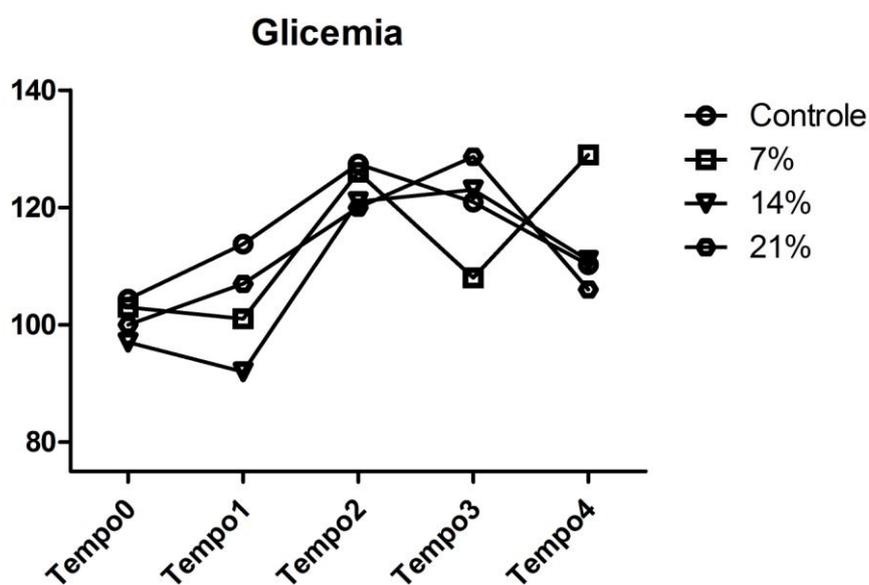


FIGURA 34 – Resultados da análise de glicemia nos diferentes grupos no decorrer do experimento.

Fonte: A autora (2013).

Para o grupo controle, os animais apresentaram valores de glicemia pós prandial de 107,37 mg/dL no início do experimento (tempo 0), e ao término do mesmo (tempo 4: 28 dias) esse valor chegou a 110,25 mg/dL, um aumento correspondente a 2,88 mg/dL. A diferença total entre o início e o final do experimento para o grupo controle foi de aproximadamente 5%.

O grupo 1, alimentado com ração padrão com a adição de 7% de solução de nanofibrilas, iniciou o ensaio com a taxa glicêmica de 103,37 mg/dL, e ao final

apresentou uma taxa 129,0 mg/dL, valor aproximadamente 25% maior do que no início dos experimentos.

O segundo grupo, alimentado com 14% de solução de nanofibrilas adicionadas a ração padrão, foi o que começou os ensaios com os valores mais baixos de glicose, 97 mg/dL, e atingiram, ao final, uma média de 111,12 mg/dL, representando um aumento total de 14,55%.

O terceiro e último grupo, que foi alimentado com ração padrão acrescentada de 21% de solução de nanofibrilas de celulose, iniciou o experimento com uma média de 100 mg/dL, apresentando valores médios finais de 106,00 mg/dL. A diferença dos valores de glicemia total para esse grupo ficou em 6%.

A análise estatística desses dados mostrou que o valor encontrado para p foi de 0,3828 (maior que 0,05). Portanto não foi encontrada diferença significativa entre os resultados, quando feita análise de interação entre glicose e tempos analisados, com o uso do ensaio ANOVA.

Os mesmos dados foram analisados por regressão linear e os valores não mostraram uma linearidade, com r^2 de 0,1098, 0,5022, 0,4481 e 0,2075 para os grupos controle, 1, 2 e 3 respectivamente.

O valor de p para os grupos foram de 0,5859, 0,1803, 0,2165 e 0,4407, todos eles maiores que 0,05, mostrando que não há diferença significativa para os valores no decorrer do tempo em um mesmo grupo.

Embora não tenha sido possível encontrar um padrão de linearidade nos grupos de estudo com o aumento do tempo e os valores encontrados não concordarem com aqueles reportados pelo Centro de Bioterismo da FMUSP (MELO *et al.*, 2012), que mostram taxas glicêmicas em ratos entre 150,7 e 207,5 mg/dL, todos os valores encontrados corroboram dados de Guimarães e Mazaro (2004), de 116,1 mg/dL e se aproximam aos dados registrados por Dantas *et al.* (2006), de 108,0 mg/dL.

Tais resultados demonstram que o suplemento fornecido para os animais em estudo, não afetou a taxa glicêmica, atestando a adequada manutenção da homeostase dos animais em experimentação.

As diferenças verificadas entre valores encontrados na literatura e os registrados no presente trabalho podem ter decorrido da variação experimental, do stress sofrido pelos animais durante o período de confinamento ou das condições do próprio biotério.

5.4.3.2 Perfil lipídico

Foram determinados os valores de triglicerídeos e de colesterol total dos animais em experimentação e os dados estão expressos na FIGURA 35.

Conforme indica a FIGURA 35 A, os níveis de triglicerídeos encontrados para os animais do grupo controle foram de $87 \pm 18,65$ mg/dL. Para os animais do grupo 1 o valor registrado foi de $100 \pm 16,24$ mg/dL, do grupo 2 foi de $98,42 \pm 12,12$ mg/dL e para os animais do grupo 3, onde foi disponibilizada a maior fração da solução de nanofibrilas, foi de $117 \pm 23,74$ mg/dL. Destes valores, nenhum deles apresentou diferenças significativas, quando comparados aos outros grupos.

Os valores de triacilgliceróis para todos os grupos, exceto o terceiro, foram inferiores às referências do Centro de Bioterismo da FMUSP (MELO *et al.*, 2012), que são de 110-174,8 mg/dL.

Por outro lado, todos os grupos tiveram valores próximos aos encontrados em estudos de Guimarães e Mazaro, (2004), que registraram taxas de 83,7 mg/dL, e também próximos aos resultados de Dantas (2006), com 82,0 mg/dL.

Sugere-se para trabalhos futuros um aumento do n amostral, que neste caso foi de 8 animais por grupo, a fim de diminuir o desvio padrão dos valores encontrados.

Os valores de colesterol total encontrados para os animais após o término do experimento estão apresentados na FIGURA 35 B. Foram de $77,1 \pm 17,06$ mg/dL para o grupo controle, $62,5 \pm 9,66$ mg/dL para o grupo 1 (7% de solução de nanofibrila acrescentada na ração padrão), $64,4 \pm 7,87$ mg/dL para o grupo 2, (14% de solução de nanofibrilas) e $69,9 \pm 13,93$ mg/dL para o grupo 3 (alimentados com a ração padrão AIN 93, acrescida com 21% da suspensão de nanofibrilas. Nenhum dos grupos apresentou variações estatisticamente significativas (FIGURA 33 B).

Todos os valores de colesterol total determinados são inferiores ao de 83,7 mg/dL relatado por Guimarães e Mazaro (2004), e aos valores entre 98,9 e 110,2, mg/dL provenientes de estudos do Centro de Bioterismo da FMUS (2008), para animais sadios não submetidos a nenhum tratamento.

Segundo a associação americana de dieta (ADA, 2002) e também Botelho *et al.* (2002), o consumo adequado de fibras alimentares tem como benefício, entre muitos outros, a redução do colesterol, o que não foi observado de forma

significativa nos dados encontrados.

Cabe ressaltar que os parâmetros bioquímicos plasmáticos podem apresentar variações de acordo com sexo, linhagem, genótipo, além de serem influenciados pela idade, dieta, manuseio e ambiente, entre outros fatores.

Não obstante, esses resultados sugerem fortemente que a quantidade de fibras utilizado no experimento não foi suficiente para causar efeitos bioquímicos relevantes no metabolismo animal.

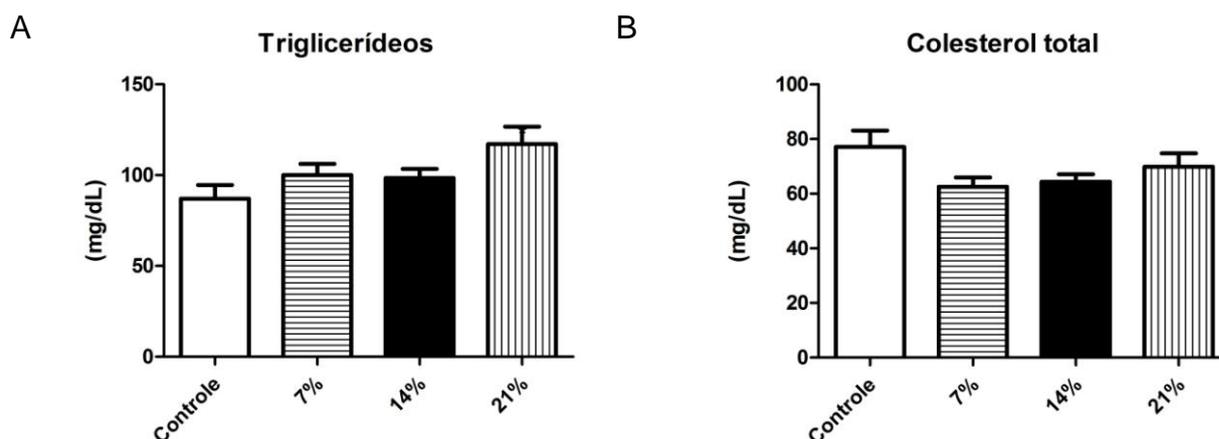


FIGURA 35 – Gráfico das análises bioquímicas realizadas. a. Triglicerídeos; b. Colesterol Total.

Fonte: A autora (2013).

5.4.4 Análises dos minerais excretados

A capacidade de retenção de água da fibra pode influenciar na digestão e absorção de minerais (FERREIRA, 2009). Por essa razão foi proposta a análise dos minerais zinco e cálcio, que são os mais citados em literatura como afetados em processos que envolvem digestibilidade de animais. Porém, foram realizadas também análises de outros minerais, que podiam estar sendo perdidos na evacuação.

Todos esses elementos, embora alguns deles representem quantitativamente uma pequena fração do total do conteúdo mineral do corpo humano, apresentam papel importante em várias vias metabólicas.

A TABELA 4 mostra os valores de composição mineral nas fezes dos ratos nos diferentes grupos.

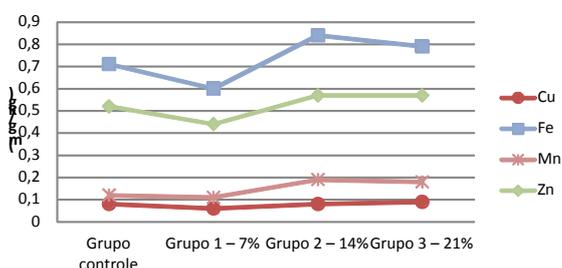
TABELA 4 – Composição dos minerais nas fezes dos ratos nos diferentes grupos.

	P (mg/g)	K (mg/g)	Na (mg/g)	Ca (mg/g)	Mg (mg/g)	Cu (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Zn (mg/kg)	N (mg/g)
Grupo controle	0,56	0,96	0,66	43,90	2,68	0,08	0,12	0,71	0,52	7,91
Grupo 1 – 7%	0,59	0,94	0,61	40,98	2,31	0,06	0,11	0,63	0,45	9,65
Grupo 2 – 14%	0,58	0,61	0,64	41,27	3,45	0,08	0,19	0,80	0,56	9,99
Grupo 3 – 21%	0,57	1,15	0,87	39,02	3,33	0,09	0,18	0,79	0,54	9,41

Fonte: A autora (2013).

Esses valores estão ilustrados na FIGURA 36.

Teor de Minerais (micronutrientes)

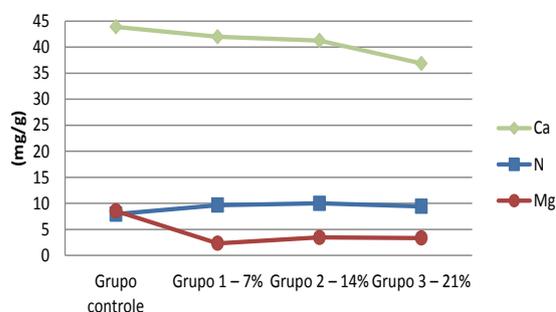


A.

B.

C.

Teor de Minerais (Ca, Mg e N)



Teor de Minerais (P, K e Na)

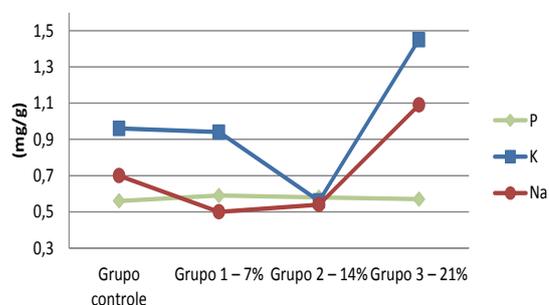


FIGURA 36 – Gráficos com a composição dos minerais encontrados nas fezes dos ratos nos diferentes grupos. A. micronutrientes. B. Cálcio, Magnésio e Nitrogênio. C Fósforo, Sódio e potássio.

Fonte: A autora (2013).

E, na FIGURA 37 estão os dados sobre tais nutrientes avaliados após as análises de variância ANOVA e pós teste de Tukey.

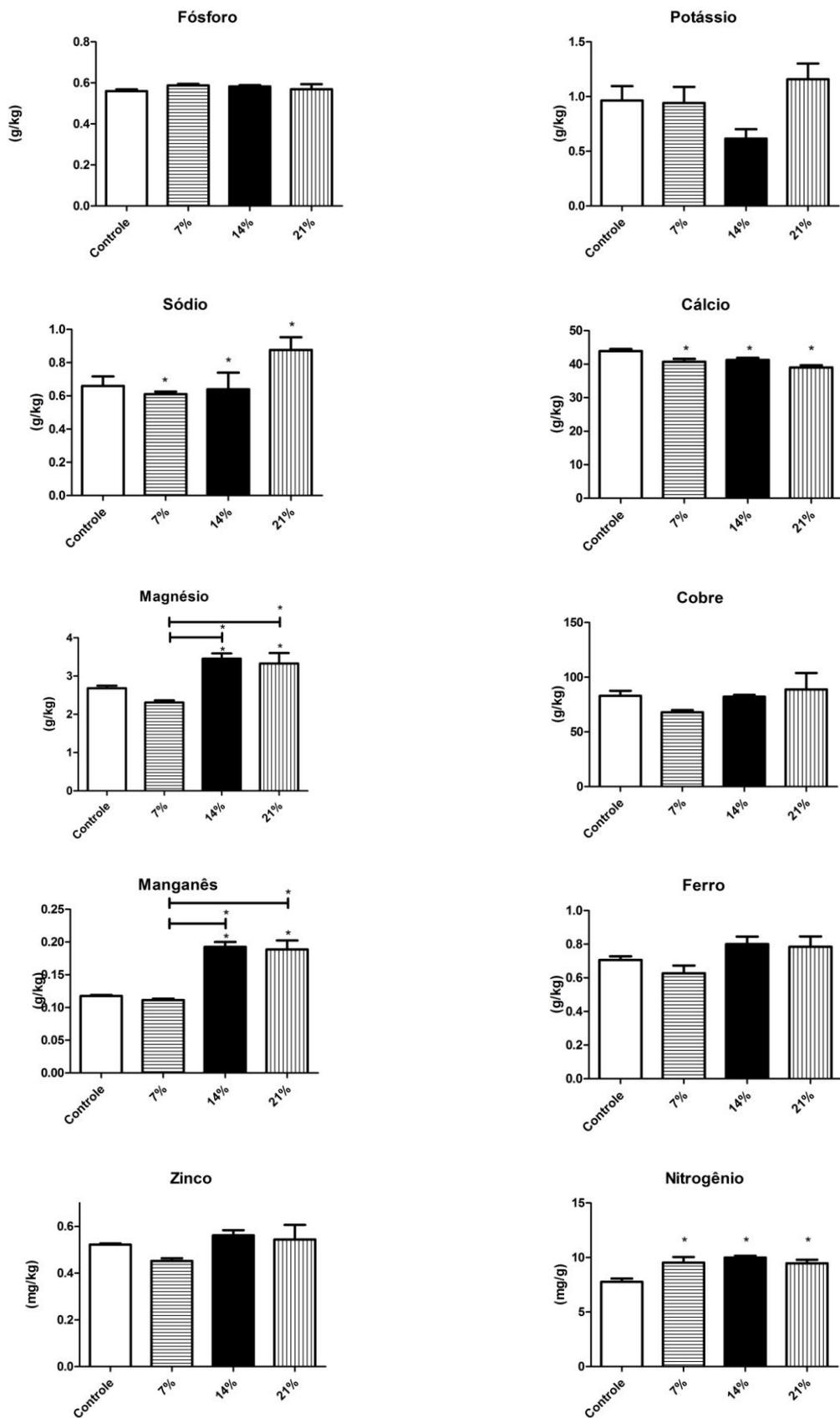


FIGURA 37 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DE MINERAIS EXCRETADOS.
 * VALORES COM VARIAÇÃO $P < 0,05$ SEGUNDO TESTE ANOVA E PÓS TESTE TUKEY.
 Fonte: A autora (2013).

O fósforo é um mineral abundante no organismo animal e atua na constituição do esqueleto, constituição do tecido muscular, absorção, deposição e utilização das gorduras, entre outras funções do metabolismo (ANDRIGUETTO *et al.*, 1990). A FIGURA 37 G demonstra que este mineral não mostrou diferenças significativas, quando os dados foram submetidos a testes de variações ANOVA nas quatro condições, com um aumento máximo de 5,35% do grupo controle para o grupo 1 (7%).

O potássio por sua vez, na análise de variância ANOVA também mostrou um p maior que 0,5 revelando a inexistência de variação significativa para este elemento. Cabe salientar que o potássio tem como funções: regulação da pressão osmótica e balanço da água; condução dos impulsos nervosos; contração muscular, sendo o principal cátion de fluido intracelular (LOPES, 1998, citado por DANTAS, 2010). Portanto, uma perda drástica desse nutriente estaria relacionada com a perda de manutenção de homeostasia em um organismo.

O sódio é necessário nas funções vitais como pressão osmótica, no equilíbrio ácido-básico e no controle do metabolismo da água. (LOPES, 1998, citado por DANTAS, 2010). A análise de variância ANOVA mostrou um valor de p de 0,0006, (menor que 0,5), mostrando variação significativa para este mineral. O teste de Tukey confirmou a diferença significativa encontrada entre o grupo controle e os demais grupos.

O cálcio possui um papel decisivo em uma variedade de processos bioquímicos e fisiológicos, como, por exemplo, estabilizador de membranas celulares, além de estar relacionado com a formação do tecido de sustentação dos animais (GRUDTNER *et al.*, 1997, *apud* COBAYASHI, 2004). Análise de variância ANOVA mostrou valor de p de 0,0025, mostrando diferença significativa para este nutriente somente quando da comparação do grupo controle com os demais. Sendo assim, embora essa diferença não tenha sido linear com o aumento da concentração de nanofibrilas, verificou-se retenção do cálcio no organismo dos animais, possivelmente devido a presença das mesmas na ração.

O magnésio atua na regulação da atividade de mais de 300 reações enzimáticas, além disso, intervém, na replicação dos ácidos nucléicos, na excitabilidade neural e na transmissão nervosa, agindo sobre as trocas iônicas da membrana celular (HERNANDES, 2010). Os dados, quando analisados por ANOVA

resultaram em um valor de p menor que 0,0001, sendo essas variações significativas do Grupo Controle para o Grupo 2 e 3 (com 14 e 21% de suspensão como suplemento), e também quando comparados os valores do Grupo 1 com o 2 e o 3. Esses dados mostram que uma pequena adição de nanofibrilas produz efeitos apreciáveis, porém, nas maiores concentrações, as variações foram significativas sugerindo que as nanofibrilas possam ter sido responsáveis pelo aumento da liberação desse mineral.

O cobre é um mineral com importância biológica, funcional e estrutural relacionada com as funções metabólicas de enzimas cobre-dependentes. Essas catalisam reações fisiológicas importantes relacionadas com a fosforilação oxidativa, inativação de radicais livres, biossíntese de colágeno e elastina, formação de melanina, coagulação sanguínea, metabolismo de ferro e síntese de catecolaminas (DANKS, 1988, citado por PEDROSA et al., 1999). No presente trabalho, os teores de cobre nas fezes dos animais foram de 0,08 g/kg no grupo controle, sofrendo apenas ligeira variação entre os demais grupos. A análise de variância ANOVA não mostrou diferenças significativas entre os grupos, sendo o p encontrado n valor de 0,31, superior a 0,05. Sendo assim a ração acrescida de nanofibrilas não afetou as taxas normais de absorção do cobre.

O manganês atua em três áreas principais do metabolismo de glicosaminoglicanas, carboidratos e de lipídeos. Também desempenha papel importante no sistema nervoso central (QUINTAL *et al.*, 1991). Os valores deste nutriente encontrados para o grupo controle foi de 0,12 g/kg, e 0,11 g/kg no grupo 1. Houve um aumento substancial para 0,19 g/kg no grupo 2 e o grupo 3 finalizou o experimento com 0,18 g/kg, 50% a mais do que no grupo controle. O valor de p encontrado pelo teste ANOVA foi menor que 0,0001, mostrando variações significativas. Segundo pós-teste de Tukey, as variações foram significativas do grupo controle para o grupo 2 e 3 e também do grupo 1 para os grupos 2 e 3, o que indica, que embora não haja uma linearidade, o manganês possivelmente é afetado pelas nanofibrilas, quando acrescentadas em maiores concentrações.

O ferro é um componente essencial da hemoglobina, mioglobina, citocromo e outros sistemas enzimáticos, estando envolvido no transporte de oxigênio para células (TEIXEIRA, 2001 *apud* DANTAS, NEGRÃO, 2010). O valor encontrado para o ferro teve um acréscimo de 11% do grupo controle para o grupo 3, passando de 0,71 g/kg a 0,79 g/kg. Porém, segundo análise de variância ANOVA, este elemento

não mostrou variação significativa com valor de p de 0,0546, mostrando que a absorção do ferro não foi alterada com a ingestão das nanofibrilas.

O zinco é um componente essencial de mais de 40 metaloenzimas, sendo fundamental para o crescimento e desenvolvimento. Sua função também é notada em proteínas, além de estar envolvido com o metabolismo do ácido nucléico (AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, 1979, citada por QUINTAL *et al.* 1991). Este mineral teve um aumento total de 9,61% do controle para a maior concentração de nanofibrilas adicionadas, e quando analisado estatisticamente, teve um valor de p de 0,1429, não mostrando diferenças significativas entre os grupos. Desta forma, a absorção do zinco não foi afetada pelas diferentes concentrações de nanofibrilas adicionadas na ração.

Quanto ao nitrogênio, o grupo controle teve um valor de 7,91, o grupo 1, (7%) de 9,65, o grupo 2 (14%) de 9,99 e o grupo 3 (21%), de 9,41 mg/g. A análise de variância ANOVA mostrou um valor de p de 0,0004, valor muito menor que 0,5, mostrando variação significativa para este elemento. As diferenças foram encontradas pela análise de Tukey quando o controle foi comparado com os demais grupos. Entre os grupos tratados, não houve diferenças significativas, significando que embora o nitrogênio tenha sido afetado pelas nanofibrilas, não foi uma relação linear. Segundo Tomas e Curtis (1986), a absorção de nitrogênio é afetada quando são ingeridas dietas com alto teor de fibra alimentar, o que não foi o caso no experimento em questão, porém a quantidade já foi suficiente para visualizar uma pequena alteração.

Ainda para Tomas e Curtis (1986), a absorção dos elementos zinco, ferro, magnésio e cálcio é afetada pelas fibras alimentares. Segundo esses autores, a associação das fibras com ácidos fílicos e compostos polifenólicos também podem estar contribuindo para deficiência desses nutrientes. Entretanto, de acordo com as FIGURAS 32 e 33, embora alguns dos minerais tenham apresentado diferenças significativas entre os grupos, em nenhum dos casos houve um incremento linear na perda de nutrientes. Esses resultados, embora contrariem os resultados de Tomas e Curtis (1986), corroboram pesquisadores citados por Schweizer e Edwards (1992), defensores de que as fibras alimentares não promovem efeitos nutricionais significativos na absorção dos minerais. Para esses autores, outras substâncias de natureza não fibrosa, mas que permanecem associadas às fibras alimentares é que estariam relacionadas com as perdas para as fezes dos nutrientes da ingestão.

Schweizer e Edwards (1992) ainda citam que os efeitos das fibras no aproveitamento ou não de nutrientes são dependentes da composição química, estrutura, viscosidade e a granulometria das partículas. A ingestão de fibras solúveis como gomas e pectinas, retarda e diminui a absorção de nutrientes, enquanto que fontes insolúveis, como o farelo de trigo, produzem pouco efeito na absorção de nutrientes no intestino delgado. Este é o caso do produto avaliado, um gel de celulose e, portanto, composto por fibras insolúveis.

5.4.5 Análises Histológicas dos fígados

A FIGURA 38 mostra cortes histológicos de fígado observados em microscopia de luz transmitida, sob aumento de 100X (à esquerda) e 400X (à direita). A FIGURA 37 A corresponde ao grupo controle e as demais 37 B, 37 C e 37 D, respectivamente, aos grupos tratados com 7%, 14% e 21% de solução de nanofibrilas.

No controle (FIGURA 38 A) podem-se observar cortes transversais de lóbulos hepáticos como descrito na revisão bibliográfica. No aumento maior, observa-se, entre eles, o espaço porta e os cordões de hepatócitos em direção à veia centro lobular. Na veia centro lobular, alguns eritrócitos podem ser visualizados, juntamente com células endoteliais que constituem sua parede. São igualmente visíveis capilares sinusóides entre os cordões de hepatócitos, confluindo para a veia centro lobular.

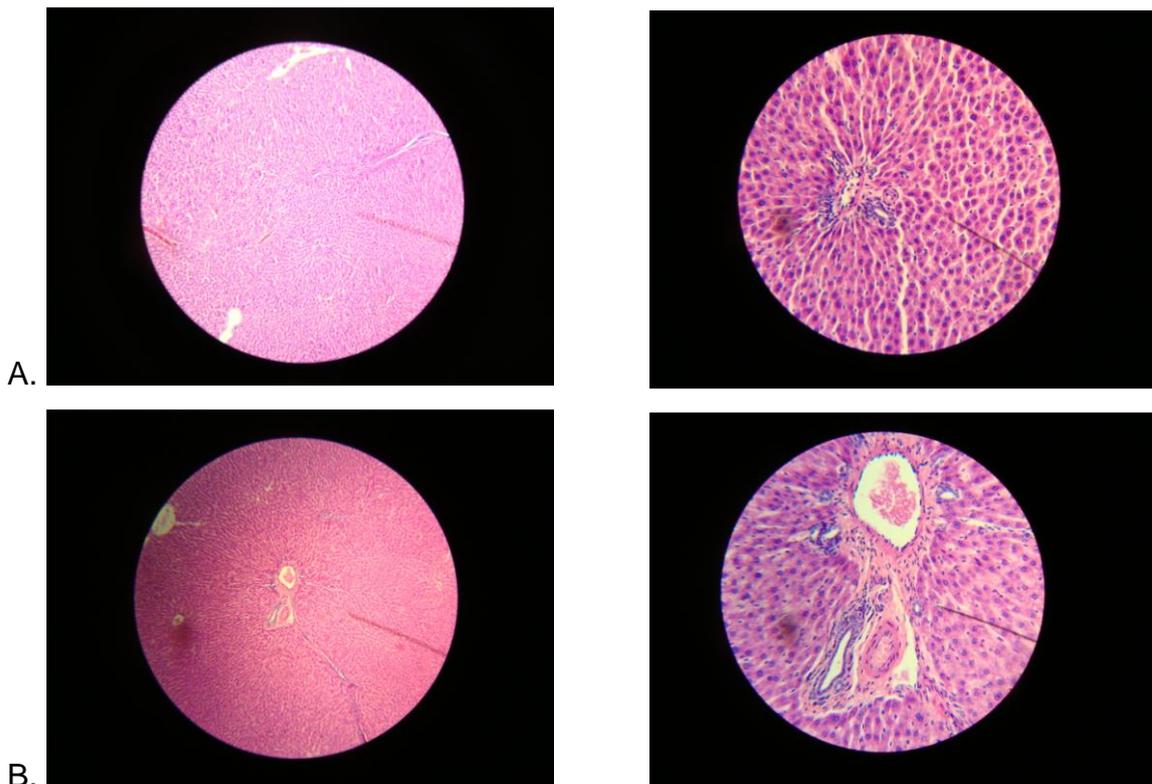
Os fígados dos animais tratados apresentam aspecto morfológico normal (FIGURAS 38 B, C e D). Nenhum tipo de alteração estrutural no órgão decorrente da alimentação com as concentrações crescentes de nanofibrilas pode ser observada ao nível da microscopia óptica.

Exemplos de alterações no parênquima hepático, que poderiam estar presentes, no caso de efeitos deletérios das nanofibrilas de celulose seriam, entre outras: a presença de hepatócitos vacuolizados, indicando um aumento do armazenamento de triglicérides em seus interiores, ou com alterações nos limites citoplasmáticos, dificultando uma perfeita visualização, ou ainda, a cromatina nos núcleos dos mesmos poderia estar mais condensada. Igualmente seria uma sinal de anormalidade um aumento na quantidade de macrófagos presentes na periferia dos sinusóides.

Nas imagens das lâminas do fígado dos animais que se alimentaram com rações suplementadas com as nanofibrilas, nas concentrações de 7, 14 e 21% nenhuma destas características alteradas foi visualizada em comparação com o controle, mostrando que nestas condições, as nanofibrilas não causaram danos hepáticos perceptíveis nos animais.

Nas regiões periféricas dos cortes, independente da condição experimental na qual se encontravam, foram observados alguns hepatócitos com o citoplasma túrgido, indicando a presença de vacuolizações. Como esta condição foi encontrada tanto nas lâminas dos animais controle como nas dos animais tratados, em todas as concentrações de nanofibrilas ensaiadas, supõe-se que sejam artefatos resultantes do preparo das lâminas, e sugere-se para os próximos experimentos utilizar outros fixadores, como ALFAC e BOUIN.

Para trabalhos posteriores, sugere-se uma avaliação com maiores teores de nanofibrilas adicionados à ração, assim como a avaliação do efeito desses materiais em outros órgãos, como, por exemplo, o estômago e intestino para averiguação de anormalidades.



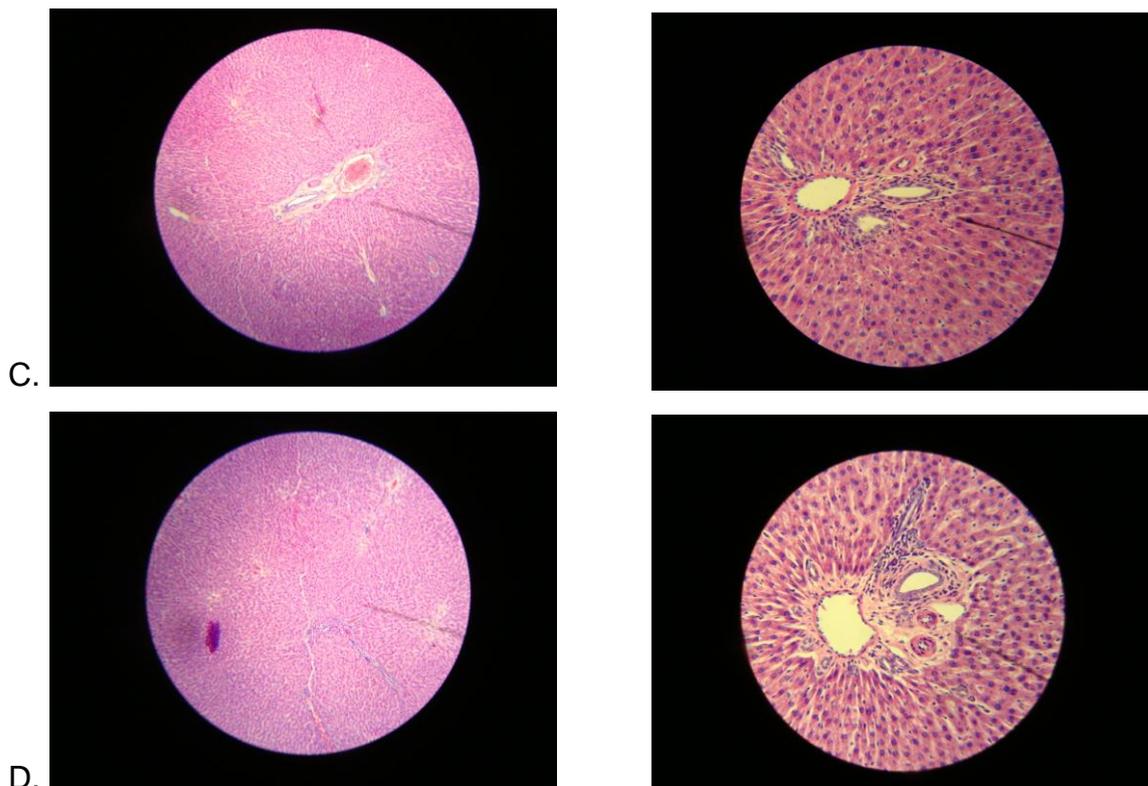


FIGURA 38 – ANÁLISES HISTOLÓGICAS DO FÍGADO NOS DIFERENTES GRUPOS. AUMENTO DE 100X NA IMAGEM DA DIREITA E 400X NA IMAGEM DA ESQUERDA. A. Grupo controle; B. Grupo 1 (com adição de 7% de solução de nanofirbilas); C. Grupo 2 (com adição de 14% de solução de nanofirbilas); D. Grupo 3 (com adição de 21% de solução de nanofirbilas).

Fonte: A autora (2013).

6 CONCLUSÕES

A suspensão de nanofibrilas produzida apresentou aspecto de gel e a análise por MET confirmou que as fibrilas de celulose apresentavam dimensões nanométricas. Após caracterização físico-química deste material, a umidade foi o principal componente, seguido das fibras. Outros componentes, como minerais, lipídeos e proteínas, encontravam-se em quantidades residuais.

A suspensão de nanofibrilas não apresentou toxicidade para a *Artemia salina* em concentrações de até 50 g/L, servindo inclusive como fonte de nutrientes.

A composição química das rações a serem administradas aos ratos foi analisada, não sendo detectado acréscimo significativo do teor de fibras com o aumento da adição da solução de nanofibrilas na ração.

As massas corporais dos ratos, avaliadas durante todo o experimento, sofreram incremento com o decorrer do tempo.

A glicemia sanguínea não sofreu alterações significativas com o tratamento em análise, indicando a manutenção de homeostase dos animais em experimentação.

O perfil lipídico não mostrou aumento estatisticamente significativo da concentração sérica de triglicerídeos com o aumento do percentual de nanofibrilas na ração, nem alteração significativa nos níveis de colesterol total.

Não houve uma perda fisiologicamente relevante de nutrientes minerais com o incremento da porcentagem de nanofibrilas adicionadas.

A dieta suplementada com as nanofibrilas não causou danos hepáticos, detectáveis à microscopia óptica, nos animais em experimentação.

As quantidades de fibras utilizadas no presente trabalho não causaram efeitos deletérios no metabolismo animal, indicando que em pequenas concentrações a bainha de pupunha branqueada e processada poderia ser utilizada como suplementação alimentar.

Estudos futuros se fazem necessários para a avaliação do efeito de maiores teores de nanofibrilas nas rações animais seguidas de análises bioquímicas mais apuradas, como colesterol HDL, LDL e HDL e estudos histológicos de outros órgãos importantes para avaliação toxicológica, como o estômago e os intestinos dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUNBIADE, S.O.; LONGE, O.G. African yam bean hull chemical composition and its effects on rat's mineral retention, serum biochemical components and enzymatic activities. **Nahrung**, v.42, p.89-93, 1998.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Nutrition Principles and Recommendations in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, supl.1, p.36-46, jan. 2004.

AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. **Guideline for essential trace elements for parenteral use**. JAMA 241:2.051,1979. *In*: QUINTAL, V. S.; LOTUFO, J.P.B.; BETTA, S.L. **Importância dos oligoelementos na nutrição perinatal**. Revisões e ensaios. Instituto da Criança. São Paulo (SP), 1991. Disponível em: <<http://www.pediatriaopaulo.usp.br/upload/pdf/100.pdf>>. Acesso em 09/02/2013.

ANALISA. **Kit diagnóstico para Colesterol**. ANALISA, Minas Gerais, 2010.

ANALISA. **Kit diagnóstico para Triglicerídeos**. ANALISA, Minas Gerais, 2010.

ANDERSON, J.W. Tratamento Nutricional do Diabetes Mellitus. *In*: Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C., **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9. ed. São Paulo: Manole; 2003. p. 1473 – 1475.

ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J.S.; SOUZA, G.A.; FILHO, A.B. **Nutrição animal Vol. 1: As bases e os fundamentos da nutrição animal. Os alimentos**. 4. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 395 p.

ASSIS, L.M.; ZAVAREDE, E.R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brasilian Journal of food technology**. Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, abr./jun. 2012.

AZEVEDO, H. M. C., **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2. Ed. Editora técnica, Brasília, DF: Embrapa, 2012.326p.

BAROSA, J.; FERREIRA, A.; FONSECA, B. SOUSA, I. Teste de toxicidade do íon cobre para *Artemia salina*. **Manual de Biologia Marinha e Pescas da Faculdade de Ciências do Mar e de Ambiente**, nov.2003.

BELLETTINI, S. Situação dos palmitos cultivados no litoral: pupunha e palmeira real. *In: ENCONTRO PARANAENSE SOBRE PALMITOS CULTIVADOS*, Anais 2004.

BELO, G. M. S., **Suplementação de fibra solúvel (goma aguar parcialmente hidrolisada) no tratamento da constipação intestinal funcional em pacientes hospitalizados**. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2003.

BENASSI, J. C., **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de percolado de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana**. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. *In: TEIXEIRA, J.P., Avaliação dos efeitos tóxicos e genotóxicos do inseticida imidacloprido em *Artemia salina* e *Allium cepa* L.* 2008. 52f. Monografia (Especialização) – Universidade do Extremo Sul catarinense – UNESC.

BERGAMASCHINE, A.F.; BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P., Degradabilidade ruminal “In situ” da Sapota (*Quararibea cordata*), do Macarujá (*Passiflora sp.*) e da Pupunha (*Bactris gasipaes*). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.3, p.76-83, 2005.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual saunders: clínica de pequenos animais**. 1. ed., Rio de Janeiro: Ed. Roca, 1998. 1530 p.

BISTNER, S. I.; FORD, R. B.; RAFFE, M. R.. **Manual de procedimentos veterinários & tratamento emergencial**. 7. ed., Rio de Janeiro: Ed. Roca, 2002.707 p.

BLASCO, C.; PICÓ, Y. Determining nanomaterials in food. **Trends in Analytical**

Chemistry, Oxford, v. 30, n. 1, p. 84-99, 2011.

BOMBO, A. J. **Obtenção e caracterização nutricional de snacks de milho (*zea mays L.*) e linhaça (*Linum usitatissimum L.*)**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

BOTELHO. L., *et al.* Caracterização de fibras alimentares da casca e cilindro central do abacaxi 'Smooth Cayenne'. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.26, n.2, p.362-367, mar./abr., 2002 .

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico Químicos para análise de alimento**/ Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. - Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Legislação. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003. **Dispõe sobre o regulamento técnico de rotulagem nutricional de alimentos embalados**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 17 dez. 2003.

CALLAMARI, C. V. , **Fígado: como avaliar esse órgão tão importante**. Artigo técnico, 2011. Disponível em: <<http://www.provet.com.br/artigo/veterinarios/figado-como-avaliar-esse-orgao-tao-importante/28/>>. Acesso em: 10/03/2013.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A.. **Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach**. Química Nova, vol.23, n. 1.São Paulo,2001.

CHIMOFF, Harvey. Dossie: Fibras Alimentares. **Food Ingredients**. n. 3 p. 42 - 65., Brasil. 2008.

COOK, J.D.; NOBLE, N.L.; MORCK, T.A.; LYNCH, L.R.; PETERSBURG, S.J. Effect of fibre on nonheme iron absorption. **Journal of Gastroenterology**, v.85, p.1354-1358, 1983.

CORMACK, D. H. **Histologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 570 p

DANKS, D.M. Copper deficiency in humans. **Annual Nutrition Reviews**, Palo Alto, v.8, p. 235-237, 1988. *In*: PEDROSA, L.F.C.; COZZOLINO, S. M. F. Alterações metabólicas e funcionais do cobre em Diabetes Mellitus. **Rev. Nutr.**, Campinas, 12(3): 213-224, set./dez., 1999.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A.; **Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá**, Estado do Paraná. *Revista Acta Sci Health Sci*. 28(2):165-170 (2006).

DONATTO, F. F.; PALLANCH, A.; CAVAGLIERI, C. R. Fibras Dietéticas: efeitos terapêuticos e no exercício. **Saúde em Revista**. Piracicaba, SP. v. 8, n. 20, p. 65-71. ago. 2006.

FARINA, M. Z.; SOARES, T. E.; CHILOMER, S. K.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K. Análise da aplicação de resíduos do corte de palmito pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) em compósitos de matriz poliéster com diferentes proporções. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v.7, n. 2, 2012.

FERREIRA, W.M. Os componentes da parede celular vegetal na nutrição de não-ruminantes. *In*: MORGADO, E.; GALZERANO, L. Fibra na nutrição de animais com fermentação no intestino grosso. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**. Veterinaria Organización . Málaga, España. v. 10, n. 7, p. 1-13, 2009.

FIOCRUZ, **Manual de Utilização de animais**. Rio de Janeiro, 2008.

FONSECA, A. L. **A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubi silvestris* (Crustacea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Piscis, Poeciledae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluente industriais**. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento). Escola de

engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Paulo. 1991.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice**. Londres: Chapman and Hall, 1994. 247 p.

GRUDTNER, V. S.; WEINGRILL, P.; FERNANDES, AL.. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. **Rev. Bras. Reumatol.** 1997 Mai/Jun; 37(3):143-151. *In*: COBAYASHI, F. ; Cálcio: Seu Papel na Nutrição e Saúde. Vol. V - nº 2, 2004.

GUERREIRO, L. F.; **Palmito de Pupunha**. Estudo de Mercado 01/02, Agencia de Fomento do Estado da Bahia, mar. 2002.

GUIMARÃES, M. A.; MAZÁRO, R. **Princípios éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação**. São Paulo: UNIFESP (2004).

HELM, C. V.. **Caracterização da composição química, proteínas de reserva e perfil de aminoácidos de cultivares de cevada nua**. Tese. (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2004.

HELM, C. V.; RAUPP, D. S.; SANTOS, A. F. Development of peach palm fibrous flour from the waste generated by the heart of palm agribusiness. **Acta Scientiarum Technology**, 2013. (*no prelo*).

HENRIQUES, G. S. , SCORSIN, N. T., CASSIM, A. L. O. , SIMEONE, M. L. F.,. Avaliação da influência dietética de uma ração à base de mix de fibras sobre a glicemia e o perfil metabólico de lipídios em ratos wistar. **Rev. Med. Res.** v. 10, n. 258, p. 58-66. abr/jun. 2008.

HERNANDES, F. I. L. **Suplementação mineral para gado de corte, novas estratégias**. Viçosa MG: Aprenda Fácil, 2001, 164 p. *In*: DANTAS, C.C.O.; NEGRÃO, F.M.; **Funções e sintomas de deficiência dos minerais essenciais utilizados para suplementação dos bovinos de corte**. UNICiências, v.14, n.2, 2010.

HOET, P. H. M.; BRÜSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O. V. Nanoparticles - known and unknown health risks. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 2, n. 12, p. 1-15, 2004.

ISHIMOTO, F. Y.; HARADA, A. I.; BRANCO, I. G.; CONCEIÇÃO, W. A. S.; COUTINHO, M.R.. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. Var. *Flavicarpa* deg.) para produção de biscoitos. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.9 n. 2, jul/dez. 2007.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

KLASSEN, C.O., WATKINS, J.B. **Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos de Casarett e doulls's**. 5º ed. Editora McGraw-Hill de Portugal, Ltda.2001.

KOVUR, S. R. (2003). **Lignin Carbohydrate Complexes**. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre de Ciências em Química na Universidade de Maine .In: REMEDIOS,M. C., **Lenhina e o seu contributo na área alimentar** Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar. UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA, Monte de Taparica, 2010.

LOPES, HENRIQUE OTÁVIO DA SILVA; **Suplementação de baixo custo para bovinos, mineral e alimentar**, Brasília, Embrapa Cerrado, 1998, 107 p. In: DANTAS, C.C.O.; NEGRÃO, F.M.; **Funções e sintomas de deficiência dos minerais essenciais utilizados para suplementação dos bovinos de corte**. UNICiências, v.14, n.2, 2010.

MELO, M. G. D.; DORIA, G. A. A; SERAFINI, M. R. ARAUJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, 2012.

MEYER B. N. , FERRIGNI N. R., PUTNAM L. B., JACOBSEN L. B. , NICHOLS D. E., MCLAUGHLIN J. L., Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant

constituents. *J Med Plant Res.* 1982; 45:31-4. *In:* Nascimento, J. E.; Melo, A. F. M.; Lima e Silva, T. C.; Veras Filho, J.; Santos, E. M.; Albuquerque, U. P.; Amorim, E. L. C.; **Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae).** *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 29, n.2, p. 143-148, 2008.

MIRA, G. S.; GRAF, H.; CANDIDO, L. M. B.. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta- glucanas no tratamento do diabetes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** vol. 45, n. 1, jan./mar., 2009.

MORAES, J. E. Nutrientes e formas de utilização do resíduo agroindustrial do palmito de pupunha para alimentação animal no Vale do Ribeira. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 8, n. 2, Jul-Dez 2011

MORARU, C.; PANCHAPAKESAN, C.; HUANG, Q.; TAKHISTOV, P.; LIU, S.; KOKINI, J. Nanotechnology: A new frontier in food science. **Food Technology**, Chicago, v. 57, n. 12, p. 24-29, 2003.

MORGADO, E.; GALZERANO, L. Fibra na nutrição de animais com fermentação no intestino grosso. REDVET. **Revista Electrónica de Veterinaria.** Veterinaria Organización. Málaga, España. v.. 10, n. 7, p. 1-13, julio. 2009.

MORSBACH, N.; RODRIGUES, A. S.; **Pupunha para palmito** , Cultivo no Paraná . Instituto agronomico do Paraná - Londrina – PR , Circular N° 103 , 1998.

NURO, D.; BRITO, L. I.; CHAVES, R.I; BRITO, R.I.; SOUZA-LEMOS, C., Comparação das dosagens bioquímicas de glicose, colesterol e triglicerídeos de atletas de futebol e homens sedentários. **Revista Eletrônica Novo Enfoque** v. 11, n. 11, p. 43 – 50. 2010.

OLREE, K., *et al.*. Enteral formulations. *In:* **The ASPEN nutrition support practice manual.** p. 41 – 49, Silver Spring (MD). 1998.

QUINTAL, V. S.; LOTUFO, J. P. B.; BETTA, S. L. Importância dos oligoelementos na

nutrição perinatal. **Revisões e ensaios**. Instituto da Criança. São Paulo (SP), 1991. Disponível em: <<http://www.pediatriaosaopaulo.usp.br/upload/pdf/100.pdf>>. Acesso em 09/02/2013.

RAUPP, D. S.; CREMASCO, A. C. V.; CALDI, A. M.; MARQUES, S. H. P; BANZATTO, D. A., Dragging in faeces of nutrient intake together with refined apple pomace. Publ. **UEPG Biol. Health Sci.**, Ponta Grossa, 10 (3/4): 77-83, set./dez. 2004.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, 123:1939-1951, 1993.

REIS, M. S.; FANTINI, A. C.; NODARI, R. O.; REIS, A.; GUERRA, M. P. MANTOVANI, A. Management and conservaion of natural populations in atlantic rain forest: the case study of palm heart (*Euterpe edulis* Martius). **Biotropica** n. 32, p. 894-902, 2000.

RIBEIRO, C. A. O.; FILHO, H. S. R; GROTZNER, S. R., **Técnicas e métodos para utilização em microscopia**. São Paulo: Santos, 2012. 422 p.

RIOS, F. J. B. **Digestibilidade in vitro e toxicidade de lectinas vegetais para náuplios de *Artemia sp.***, Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 1995.

RIQUE, A. B. R., SOARES, E. A. , MEIRELLES, C. M.. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Rev. Bras. Med. Esporte**. v. 8, n.6, p.244-54. 2002;

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin and oligofrutose: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, n.2, p. 103-148. 1993.

RODRIGUEZ, A. G.; TEIXEIRA, O.M.; SALLES F.G.; VITL, J.P. PEIXOTO, D. S.; Bioensaio com *Artemia salina* para detecção de toxinas em alimentos vegetais. **Estudos**, Goiânia, v. 36, n. 5/6, p. 795-808, maio/jun. 2009.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S. T., LEITÃO, R. C. **Valorização de resíduos da agroindústria. II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA** , Foz do Iguaçu, PR, 2011.

SCHWEIZER, T. F.; EDWARDS, C. A., **Dietary fibre: a component of food; nutritional function in health and disease**. London: Springer-Verlag, 1992. 354p.

SHATKIN, J. A. **Nanotechnology: Health and Environmental Risks**.New York: CRC Press - Taylor and Francis Group, 2008. 167 p.

SILVA, M. R.; SILVA, M. S. ; MARTINS, K. A.; BORGES, S. Utilização tecnológica dos frutos de Jatobá-do-cerrado e de Jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 21(2): 176-182, maio-ago. 2001.

SIQUEIRA, J. M. de, *et al.* Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, Sociedade Brasileira de Química. v.24, n.2, p. 185 – 187, 2001.

SOUTO, F. J. B. **Influencias de parâmetros ambientais sobre *Artemia sp* (Branchiopoda: Artemiidae) em uma salina artesanal do estado do Rio Grande do Norte**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia). Universidade Federal da Paraíba, 1991.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**. Oxford, v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.

SPOSITO, A. C.; CARAMELI, B.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI.; M. C. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.**

vol.88 suppl.1 São Paulo. apr. 2007.

TEIXEIRA, J. C. **Nutrição de ruminantes**, Ed. LAVRAS: UFLA/FAEPE, 2001, 183 p.
In: DANTAS, C.C.O.; NEGRÃO, F.M.; **Funções e sintomas de deficiência dos minerais essenciais utilizados para suplementação dos bovinos de corte**. UNICiências, v.14, n.2, 2010.

TOMAS, R.B.; CURTIS, D.J. Dietary fiber: effect on mineral bioavailability. **Food Technology**, v.2, p.111-116, 1986.

VEIGA, L. F. & VITAL, N. **Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia sp.*** *In*: NASCIMENTO, I. A; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (eds.), **Métodos em Ecotoxicologia Marinha**. Aplicações no Brasil. Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, p. 111-112, 2002.

VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Ed. Campos, 1980.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, J. Functional Materials in Food Nanotechnology. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 9, p. 107-116, 2006.