

Avaliações Bioquímicas Séricas e Hepáticas do Extrato de Yacon (*Polymnia sonchifolia*) Poepp. & Endl.

Fernandes, A.A.H.¹; Bordon, J.G.²; Batistella, R. F.²; Nascimento, S.M.²; Silva, M.S.²; Alves, M.J.Q.F.³.

¹Depto. Química e Bioquímica/IB – UNESP - Botucatu, SP, ²Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, ³Depto. de Fisiologia/IB – UNESP - Botucatu, SP

RESUMO: Yacon, planta medicinal, é conhecida por acumular grande quantidade de frutano (oligossacarídeo) em suas raízes tuberosas. O presente trabalho teve como objetivo verificar a ação do yacon sobre alguns parâmetros bioquímicos de interesse clínico em ratos submetidos à administração de extratos aquosos de raiz e de folhas da planta yacon. Utilizaram-se 24 ratos, machos, wistar, pesando em média 300g. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: G₁= grupo controle água; G₂= grupo tratado (n=8) – receberam extrato aquoso de raiz (0,17g/100g); G₃= grupo tratado (n=8) – receberam extrato aquoso de folhas (25 mg/100g). Após o período experimental (30 dias) os animais foram sacrificados e obteve-se o soro através da centrifugação do sangue, no qual determinaram-se os parâmetros bioquímicos. O extrato do tecido hepático foi obtido em tampão fosfato (0,01M) pH 7,0 para a atividade da alanina aminotransferase (ALT). Através dos resultados obtidos verificou-se que o extrato aquoso de raiz aumentou (p<0,05) a concentração sérica de glicose (206,72±91,27 mg/dL). O nível sérico de uréia elevou-se (p<0,05) nos animais dos grupos G₂ e G₃, enquanto que a creatinina decresceu. A administração dos extratos aquosos aumentou a atividade sérica da alanina aminotransferase (p<0,05) (59,81±6,32 mg/dL), porém reduziu-se no tecido hepático (G₂=84,72±22,07 U/g; G₃=59,04±19,95 U/g). Os extratos aquosos tanto de raiz como de folhas da planta yacon alteraram os níveis séricos e hepáticos dos parâmetros bioquímicos analisados.

Palavras-chave: Asteraceae, frutanos, terapias alternativas, metabolismo, fígado, proteínas séricas.

ABSTRACT: Serum and hepatic biochemical evaluations of yacon (*Polymnia sonchifolia*) extract.

Yacon is a medicinal plant, the tuberous roots of which have been thought to contain a large amount of fructan (oligosaccharides). Purpose -The aim of paper was to study the effect of aqueous extracts of yacon on biochemical parameters of clinical importance in rats. The animals (male, wistar, weighing approximately 300g) were divided in 3 groups: G₁(n=8)= water control; G₂(n=8)= aqueous extract of roots (0,17g/100g/day); G₃(n=8)= aqueous extract of leaves (25mg/100g/day). The serum samples were obtained after 30 days, and the biochemical parameters were measured. The livers were removed and homogenized in 0,01M phosphate buffer pH 7,0 and then the supernatant fractions were used for enzyme assay. Significantly increased serum glucose was observed in G₂ (206,72±91,27 mg/dL). The groups G₂ and G₃ rats had higher (p<0,05) urea concentration, while creatinin level decreased (p<0,05). The serum albumin concentration showed a tendency to remain in G₂ (2,44±0,45 g/dL) and G₃ (2,84±0,50 g/dL). Aqueous extracts administration markedly decreased (p<0,05) the activities of ALT in the liver and greatly increased these enzymatic activities in blood. The serum alkaline phosphatase activity increased (p<0,05) in rats receiving the aqueous extract of root (192,75±20,95 U/dL), while aqueous extract of leaves reduced it (129,57±19,93 U/dL). The results indicated that the extract of yacon promoted changes of the biochemical parameters.

Key words: Asteraceae, medicinal plants, fructans, therapies alternatives, metabolism, liver, serum protein

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos há grande interesse pela utilização de produtos naturais. Essa utilização é feita tanto com a finalidade alimentícia quanto terapêutica, ocorrendo esta última, seja por questões sócio-econômicas, culturais ou como busca de terapias complementares ou substitutivas (Almeida & Agra, 1986; Moerman, 1991). No Brasil, apesar do uso de plantas ser comum e muitas vezes a única alternativa terapêutica para grande parte da população, o estudo desse tipo de terapia está se destacando tanto na comunidade científica como na médica,

tornando-se, muitas vezes, a solução para alguns distúrbios orgânicos (Brito, 1994).

A *Polymnia sonchifolia*, popularmente conhecida como yacon, é uma planta da família Compositae, originária da região andina do Equador, Colômbia e Peru, tem como característica principal acumular grande quantidade de oligossacarídeos, principalmente o frutano, em suas raízes tuberosas (Goto *et al.*, 1995).

Jackson *et al.* (1999) analisando o efeito da ingestão diária de frutano (5g) sobre as concentrações plasmáticas de lipídios, insulina e de glicose em humanos, concluíram que o frutano reduziu significativamente as concentrações

plasmáticas de triacilgliceróis.

Por outro lado, Yamashita *et al.* (1984) observaram que o frutano diminuiu a concentração de glicose sérica em indivíduos com diabetes dependentes de insulina.

Dietas contendo oligofrutano (10g/100g) reduziram a triacilglicerolemia em ratos, provavelmente por aumentar o catabolismo das lipoproteínas VLDL ou por reduzir a sua secreção pelo fígado, como resultado da diminuição da atividade das enzimas lipogênicas (Delzenne & Kok, 1999). Estudos realizados com pacientes apresentando hiperlipidemia, mostraram queda significativa no nível sérico de colesterol total e da VLDL-colesterol, quando tratados com dieta rica em frutano (Davidson & Maki, 1999).

Levrat *et al.* (1993) e Kok *et al.* (1998) relataram que a inulina regulou o nível sérico de colesterol em ratos com dietas altamente calóricas. Os autores atribuíram maior *turnover* e alterações na síntese de ácidos biliares.

Segundo Jackson *et al.* (1999) existem algumas hipóteses que explicam a ação do frutano sobre o metabolismo de lipídios. Uma delas é a alteração nos níveis de glicose e/ou de insulina, que diminuem a atividade das enzimas lipogênicas, uma vez que a transcrição gênica destas enzimas é potencializada pela insulina. A produção de propionato, a partir do frutano, inibe a síntese de ácidos graxos, e conseqüentemente o nível de triacilgliceróis decresce. Verificou-se também que o processo da gliconeogênese diminui na presença do propionato.

Em termos dietéticos, o frutano apresenta baixo valor energético em relação aos outros carboidratos, isto torna-se relevante para pacientes tanto com diabetes *mellitus* não dependente de insulina como àqueles com obesidade excessiva (Thiébaud *et al.*, 1984; Vanes *et al.*, 1986; Grimble *et al.*, 1988; Mc Burney *et al.*, 1987).

Verificou-se que a inulina diminuiu tanto o nível de amônia quanto de uréia no plasma. Estes efeitos relacionam-se com o desenvolvimento da biomassa bacteriana e a fixação de N pelas bactérias associadas à acidificação do meio (Jenkins *et al.*, 1999).

A concentração de uréia no sangue é conseqüência de sua taxa de produção durante o catabolismo de aminoácidos e sua excreção pelos rins. Segundo Sforcin (1996) a determinação do nível sérico de uréia é importante como indicador do comprometimento hepático e renal.

Em várias formas de toxicidade hepática, os níveis séricos de numerosas enzimas citossólicas, mitocondriais e associadas à membrana mostram-se aumentadas. A atividade das aminotransferases e da fosfatase alcalina torna-se elevada sempre que o processo patológico afeta a integridade das células

hepáticas e musculares, aumentando assim a permeabilidade da membrana às enzimas (Burtis & Ashwood, 1998).

Diante disso, o presente estudo tem como objetivo verificar o efeito dos extratos aquosos de raízes e de folhas de yacon sobre alguns parâmetros bioquímicos séricos e hepáticos de interesse clínico, em ratos.

MATERIAL E MÉTODO

1-Instalação do experimento e animais experimentais

O experimento foi instalado no biotério do Departamento de Química e Bioquímica –IB-UNESP/Campus de Botucatu. Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), raça wistar, machos com idade aproximada de 60 dias, pesando em média 250g.

2- Preparo do extrato aquoso

A planta *Polymnia sonchifolia* L., conhecida popularmente como yacon, foi cultivada no município de Capão Bonito, Estado de São Paulo e coletada no mês de maio de 2000. A partir das folhas e das raízes tuberosas da planta yacon preparou-se os extratos aquosos. Após identificação do material depositado no herbário BOTU sob o número de registro 23408, as folhas foram desidratadas em estufa aerada à temperatura de 50° C durante 24 horas. Em seguida, o material seco foi triturado, sendo o pó obtido (1,2mg/mL) colocado em água na temperatura de 100° C, procedendo à extração por infusão. O extrato assim obtido foi oferecido aos animais na água de beber, na concentração de 25 mg/100g de peso corporal, diariamente.

O extrato aquoso das raízes tuberosas foi preparado na concentração de 0,17g de matéria fresca/100g de peso corporal (Almeida & Agra, 1986). As amostras das raízes foram homogeneizadas e oferecidas aos animais na água de beber, diariamente.

3- Formação dos grupos

Os animais foram escolhidos aleatoriamente e divididos em 3 grupos:

G₁-Grupo controle não tratado (n=8) – receberam água e ração *ad libitum*;

G₂-Grupo tratado (n=8) – receberam extrato aquoso de raízes e ração *ad libitum*;

G₃-Grupo tratado (n=8) – receberam do extrato aquoso de folhas e ração *ad libitum*.

No final do período experimental (30 dias), os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (0,1 mL/100g i.p.), e sacrificados por fratura cervical e decapitação. O soro foi obtido através da centrifugação do sangue a 4300 x g por 15 minutos.

As amostras de tecido hepático (100 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,01M; pH 7,0) e centrifugadas (12.000 x g por 30 minutos, à -4° C). No sobrenadante determinou-se a concentração de proteínas solúveis e a atividade da alanina aminotransferase (ALT). As determinações séricas e hepáticas foram realizadas nas seguintes preconizações:

Proteínas totais (g/dL): foram determinadas empregando o método do Biureto;

Glicose (mg/dL): utilizou-se o método enzimático (glicose oxidase) colorimétrico segundo TRINDER. O método consiste na oxidação da glicose pela ação da glicose oxidase a ácido glicônico com formação de H₂O₂. Em presença de uma peroxidase, a água oxigenada é cindida em H₂O e O₂ (Moura, 1992);

Colesterol total (mg/dL): foi determinado segundo Leffler & Mac Doygald (1963);

Uréia (mg/dL): através do método enzimático com urease (Fawcett & Scoth, 1960);

Atividades da Alanina aminotransferase (ALT-E.C.2.6.1.2 - U/g de proteínas solúveis hepáticas e U/mL de soro): foi determinada utilizando o método UV otimizado (340 nm), medindo-se o consumo de NADH, que será proporcional à atividade da enzima presente na amostra;

Creatinina (mg/dL): através do método Kaplan & Pesce (1989), na presença do ácido pícrico, obtém-se um cromógeno, o qual é medido

colorimetricamente (510 nm).

Fosfatase Alcalina (U/mL): através da hidrólise do p-nitro fenilfosfato, segundo Hausamen *et al.* (1967).

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 8 repetições. As médias de tratamento foram comparadas através do Teste de Tukey a 5% de probabilidade, segundo ZAR (1996).

RESULTADO E DISCUSSÃO

A Tabela 1 demonstra que os animais tratados com extrato aquoso de raiz (G₂) apresentaram aumento (p<0,05) nos níveis séricos de glicose em relação ao grupo controle (G₁). O grupo que recebeu extrato aquoso de folhas (G₃) não diferiu significativamente dos demais grupos. Foi demonstrado queda significativa na concentração sérica de insulina e de glicose em ratos tratados com oligofrutose (Delzenne & Kok *et al.*, 1999). Entretanto, muito pouco se conhece sobre o efeito da inulina nas concentrações séricas destes parâmetros em humanos. Em alguns estudos observou-se redução considerável na glicose sérica de pacientes diabéticos independentes (Yamashita *et al.*, 1984) e em pacientes com hiperlipidemia (Hidaka *et al.*, 1991), em resposta a oligofrutose.

TABELA 1 – Valores médios obtidos para os parâmetros bioquímicos séricos e hepático.

Parâmetros Bioquímicos	Grupos		
	G ₁	G ₂	G ₃
Glicose (mg/dL)	127,85±30,96 a	206,72±91,27 b	157,78±25,55 ab
Proteínas Totais (g/dL)	6,53±2,57 a	5,24±1,00 a	5,23±1,39 a
Albumina (g/dL)	3,21±0,44 a	2,44±0,45 b	2,85±0,5 ab
ALT (U/g)	107,13±12,04 a	84,72±22,07 b	59,04±19,95 c
ALT (U/mL)	36,63±3,49 a	59,81±6,32 b	57,54±4,59 b
Fosfatase alcalina (U/mL)	138,80±18,43 a	192,80±20,95 b	129,50±10,62 a
Colesterol (mg/dL)	55,29±8,20 a	58,47±8,30 a	39,56±12,53 a
Uréia (mg/dL)	42,87±10,85 a	53,64±14,11 ab	61,03±14,73 b
Creatinina (mg/dL)	1,79±0,28 a	1,32±0,43 b	0,62±0,3 c

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5 % (p<0,05).

Os animais dos grupos que receberam extrato aquoso de yacon (G₂ e G₃) não apresentaram diferenças significativas para os níveis de proteínas séricas totais, em relação ao grupo controle (G₁). A determinação da taxa de proteínas totais no plasma, principalmente a albumina, assume extraordinária importância clínica, e suas variações podem trazer informações sobre o funcionamento hepático, pois este é responsável pela formação da maioria das proteínas do plasma, com exceção das imunoglobulinas e hormônios protéicos (Burtis &

Ashwood, 1998). Além disso, a concentração protéica total é responsável pela pressão coloidosmótica do plasma e as variações observadas nas diversas frações podem refletir doenças específicas, tais como lesões hepáticas (Devlin, 1998).

Quanto à concentração de albumina no sangue, verifica-se que os extratos administrados reduziram este parâmetro, porém com significância somente para os animais pertencentes a G₂ (Tabela 1).

Os resultados obtidos para a atividade da

alanina aminotransferase (ALT) no tecido hepático, mostram que os animais dos grupos G₂ e G₃ apresentaram queda significativa na sua atividade catalítica em relação ao controle, sendo esta diminuição mais acentuada ($p < 0,05$) no grupo que recebeu extrato aquoso de folhas (G₃). A atividade das aminotransferases, especialmente a ALT, no tecido hepático doente reduz-se consideravelmente. Esta diminuição nos padrões das aminotransferases no tecido reflete-se no aumento ($p < 0,05$) dos padrões das atividades enzimáticas observadas no soro dos animais tratados com os extratos aquosos de yacon (Tabela 1).

Estas situações podem auxiliar no diagnóstico de possível lesão tecidual hepática (Burtis & Ashwood, 1998), uma vez que o aumento na permeabilidade da membrana plasmática torna-se muitas vezes elevada, permitindo o extravasamento excessivo da enzima do meio intracelular para o plasma sanguíneo. Desta forma, pode-se inferir que os extratos aquosos de yacon induziram danos hepáticos, permitindo a passagem da aminotransferase para plasma sanguíneo.

A atividade sérica da fosfatase alcalina aumentou somente nos animais que receberam extrato aquoso de raiz (G₂) em relação aos demais grupos.

Os animais que receberam extrato aquoso de yacon (G₂ e G₃) não apresentaram variações significativas nos níveis séricos de colesterol em relação ao controle (G₁). Em pesquisas realizadas por Canzi *et al.* (1995), Luo *et al.* (1996), Pederson *et al.* (1997), Davidson & Maki (1999) em humanos, concluíram que o frutano reduziu significativamente a concentração plasmática de triacilgliceróis e de colesterol. A hipotrigliceridemia ocorre, possivelmente, em função do decréscimo na sua síntese hepática e não ao aumento do catabolismo das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (Roberfroid & Delzenne, 1998).

Através da Tabela 1 observa-se que o nível sérico de uréia aumentou ($p < 0,05$) nos animais que receberam extrato aquoso de folhas de yacon (G₃) em relação aos demais grupos. Na literatura constatou-se situação oposta, na qual observou-se que os ratos tratados com dieta suplementada com inulina e oligofrutose tiveram diminuição na uremia (Wang & Gibson, 1993).

Durante o crescimento das bactérias intestinais há necessidade de uma fonte de nitrogênio para síntese protéica, acelerando a passagem da uréia sérica para a parte distal do íleo e intestino grosso (Tetens *et al.*, 1996; Younes *et al.*, 1997). Desta forma, a uréia sanguínea estaria disponível como fonte de nitrogênio para as bactérias intestinais. Portanto o aumento observado pode ser atribuído possivelmente ao

elevado metabolismo de nitrogênio protéico.

Através da Tabela 1, referente às variações séricas de creatinina, observa-se que os grupos G₂ (extrato de raiz) e G₃ (extrato de folhas) apresentaram diminuição ($p < 0,05$) nos níveis séricos de creatinina, comparativamente ao grupo controle (G₁). A creatinina é eliminada do plasma pela filtração glomerular e não é reabsorvida nos túbulos em grau significativo, portanto é excretada pela urina. Quando a creatinina encontra-se elevada no sangue pode-se indicar insuficiência renal. A diminuição dos níveis séricos de creatinina pode estar relacionada a um aumento na taxa de filtração glomerular (Younes *et al.*, 1995). Embora o nível de uréia esteja elevado nos animais tratados (G₂ e G₃), pode-se eliminar a possibilidade de insuficiência renal, mesmo observando baixa creatinina no sangue dos animais dos grupos G₂ e G₃.

CONCLUSÃO

Os extratos aquosos tanto de raízes como de folhas de yacon reduziram os níveis séricos de albumina e de creatinina, mas elevaram os níveis de uréia, bem como a atividade da alanina aminotransferase e da fosfatase alcalina no soro. A atividade da alanina aminotransferase no tecido hepático diminuiu com a administração dos extratos aquosos. As concentrações séricas de glicose, colesterol e de proteínas totais não se alteraram.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALMEIDA, R.N., AGRA, M.F. Levantamento bibliográfico na flora medicinal de uso no tratamento da diabete e alguns resultados experimentais. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.67, p. 105-10, 1986.
- BRITO, A.R.M.S., ANTÔNIO, M.A., NOGUEIRA, D.C.F. A pesquisa farmacológica de plantas medicinais no Brasil (1949-1994). In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATU, 1, 1994, Botucatu, Anais... Botucatu, 1994.
- BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R. *Fundamentos de Química Clínica*. 4. ed. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, 1998.
- CANZI, E., BRIGHENTI, F.B., CASIRAGHI, M.C., DEL PUPO, E., FERRARI, A. Prolonged consumption of inulin in ready-to-eat break-fast cereals: effects on intestinal ecosystem, bowel habits and lipid metabolism. In: WORKSHOP DIETARY FIBRE AND FERMENTATION IN THE COLON, 1995, Luxembour. Anais...Luxembour: Office for Official Publications of the European Communities, 1995.
- DAVIDSON, M.H., MAKI, K.C. Effects of dietary inulin on serum lipids. *Journal of Nutrition*, v.129, p. 1474-7, 1999.

- DELZENNE, N.M., KOK, N.N. Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1467-70, 1999.
- DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica: com correlações clínicas**. 4ª ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1998. 1007p.
- FAWCETT, J.K., SCOTH, J.E. A rapid and precise method for the determination of urea. **Journal of Clinical Pathology**, v.13, p. 156-9, 1960.
- GOTO, K., FUKAI, K., HIKIDA, J., et al. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.59, p. 2346-7, 1995.
- GRIMBLE, G.H., PATIL, D.H., SILK, D.B.A. A lactiol in inabsorbed disaccharide on human colon. **Gut**, v.29, p. 1666-71, 1988.
- HAUSAMEN, T.U., HELGER, W.R., GROSS, W. Optimal conditions for the determination of serum alkaline phosphatase by a new kinetic method. **Clinica Chimica Acta**, v.15, p. 241-5, 1967.
- HIDAKA, H., HIRAYAMA, M., TOKUNAGA, T, et al. The effects of undigestible fructooligosaccharides on intestinal microflora and various physiological functions human health. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.270, p. 105-17, 1991.
- JACKSON, K.B., TAYLOR, G.R.J., CLOHESSY, A.M. et al. The effect of the daily intake of inulin on fasting lipid, insulin and glucose concentrations in middle-aged men and woman. **British Journal Nutrition**, v.82, p. 23-30, 1999.
- JENKINS, D.J.A., KENDALL, C.W.C., VUKSAN, V. Inulin, oligofructose and intestinal function. **Journal of Nutrition**, v.129, p. 1431-3, 1999.
- KAPLAN, L.A., PESCE, A.J. **Clinical chemistry: theory, analysis and correlation**. 2ª ed. St. Louis: Mosby, 1989. 1149p.
- KOK, N.N., MORGAN, L.M., WILLIAMS, C.M. Insulin, glucagon-like peptide 1, glucose dependent insulinotropic polypeptide and insulin-like growth factor 1 as putative mediators of the hypolipidemic effect of oligofructose in rats. **Journal of Nutrition**, v.128, p.1099-103, 1998.
- LEFFLER, H.H., MAC DOY GARD, H. Estimation of cholesterol in serum. **American Journal of Clinical Pathology**, v.39, p. 311-5, 1964.
- LEVRAT, M.A., RÉMÉSY, C., DEMIGNÉ, C. Influence of inulin on urea and ammonia in the rat cecum: consequences on nitrogen excretion. **Journal of Nutrition Biochem.**, v.4, p. 351-6, 1993.
- LUO, J., RIZKALLA, S.W., ALAMOWITCH, C. Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.63, p. 939-45, 1996.
- MC BURNEY, M.I., THOMPSON, L.U., JENKES, D. Colonic fermentation of some breads and its implication in energy availability in man. **Nutrition Research**, v.7, p. 1229-41, 1987.
- MOERMAN, D.E. The medical flora of native nooth American: an analysis. **J. Ethnopharmacology**, v. 31, p. 1-42, 1991.
- MOURA, R.A. **Técnicas de Laboratório**, 2.ed. Atheneu Editora, São Paulo, 1982.
- PEDERSON, A., SANDSTRÖM, B., VAN AMELSVOORT, J.M.M. The effect of ingestion of inulin on blood lipids and gastrointestinal symptoms in healthy females. **British Journal Nutrition**, v.78, p. 215-22, 1997.
- ROBERFROID, M.B., DELZENNE, N.M. Dietary fructans. **Annual Review of Nutrition**, v.18, p. 117-43, 1998.
- SFORCIN, J.M. Efeito da sazonalidade sobre as propriedades imunomoduladora e antibacteriana da própolis e perfil bioquímico de ratos. 1996. 63p. Tese (Doutorado – Nutrição e Produção Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- TETENS, I.G., LIVESEY, G., EGGUM, B.O. Effect of the type and level of dietary fiber supplements on nitrogen retention and excretion patterns. **British Journal of Nutrition**, v. 75, p. 461-9, 1996.
- THIÉBAUD, D., JACOT, E., SCHWITZ, H., et al. Comparative study of isomalt and sucrose by means of continuous indirect calorimetry. **Metabolism**, v.33, p. 805-35, 1984.
- VANES, A.J.H., GROOT, A., VOGT, J.E. Balances of volunteers on diets supplemented with either lactiol or saccharose. **British Journal of Nutrition**, v.56, p. 545-54, 1986.
- WANG, X.; GIBSON, G.R. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **Journal Applied Bacteriology**, v.75, p. 373-80, 1993.
- YAMASHITA, K., KAWAI, K., ITAKURA, M. Effects of fructo-oligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. **Nutrition Research**, v.4, p. 961-6, 1984.
- YOUNES, H., GARLEB, K., BEHR, S. et al. Fermentable fibers or oligosaccharides reduce urinary nitrogen excretion by increasing urea disposal in the rat cecum. **Journal Nutrition**, v.125, p. 1010-6, 1995.
- YOUNES, H., RÉMÉSY, C., BEHR, S. et al. Fermentable carbohydrate in urea lowering effect in normal and nephrectomised rats. **American Journal Physiology**, v.25, p. 515-21, 1997.
- ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. Prentice-Hall New Jersey. 718p. 1996.