



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAROLINE MARIA CALLIARI

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE  
BIOPOLÍMERO DE *AGROBACTERIUM RADIOBACTER* K84  
COMO SUBSTITUTO DE GORDURA**

---

Londrina  
2009

**CAROLINE MARIA CALLIARI**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE  
BIOPOLÍMERO DE *AGROBACTERIUM RADIOBACTER* K84  
COMO SUBSTITUTO DE GORDURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Raúl J. H. Castro Gómez

Londrina  
2009

**CAROLINE MARIA CALLIARI**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE  
BIOPOLÍMERO DE *AGROBACTERIUM RADIOBACTER* K84  
COMO SUBSTITUTO DE GORDURA**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Raúl J. H. Castro Gómez (Orientador)  
Universidade Estadual de Londrina  
Centro de Ciências Agrárias

---

Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha  
(Membro)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Campus Pato Branco  
Depart. de Química/Centro de Ciências Exatas

---

Profa. Dra. Andréa Diniz (Membro)  
Universidade Estadual de Londrina  
Centro de Ciências da Saúde

---

Prof. Dr. Emerson José Venâncio (Membro)  
Universidade Estadual de Londrina  
Centro de Ciências Biológicas

---

Profa. Dra. Suely Obara Doi (Membro)  
Universidade Estadual de Londrina  
Centro de Ciências Exatas

Londrina, 27 de fevereiro de 2009.

*Dedico este trabalho a Clara Calliari Dias,  
meu pequeno grande amor, que me apresentou  
à emoção inenarrável de ser tia-avó!*

*“Tio do tio também é parente...”*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus e ao Universo.*

Ao professor Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez, pelo estilo de orientação que promove o desenvolvimento pessoal e profissional. Por cultivar o bom humor, ser acessível, compreensivo e apoiador.

Professora Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares, pela orientação no experimento de toxicidade celular.

Professoras Dra. Sueli Ogatta e Dra. Lucy Megumi Yamaushi Lioni, pela cedência de espaço no laboratório e orientação para a realização do estudo de toxicidade em camundongos.

A Carolina Paniz, pelo auxílio nas análises hematológicas.

Ao Professor Dr. Emerson José Venâncio, pelo incentivo, orientação, treinamento e auxílio no estudo de toxicidade e pelas observações pertinentes no Exame de Qualificação.

Ao Pedro Dionízio Filho, pelo auxílio na preparação das lâminas histológicas e na análise microestrutural do produto cárneo à base de frango. Pela presença tranqüila.

A Milka Selestina Primo e ao Professor Ms. Rodrigo Juliano de Oliveira pela realização do experimento de antimutagenicidade do biopolímero.

A professora Dra. Marta de Toledo Benassi, pelo auxílio no delineamento e interpretação dos resultados da avaliação sensorial. Pelo auxílio na realização das análises de cor. Sobretudo pela presença extremamente agradável.

A Elizabete Regina Marangoni Marana, pela realização das análises em eletroforese.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial ao Nelson Heitor Fusinato, exemplo de competência e gentileza; e a Alessandra, pelo apoio técnico e pessoal. A Sandra Rezende, super-secretária, pela paciência, eficiência e simpatia. A Sra. Marília pelo apoio logístico.

Aos alunos e ex-alunos do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos: Ms. Alexandre Azevedo, Ms. Ana Augusta Xavier, Ms. Joice Sifuentes dos Santos, Dra. Neusa Seibel, Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, Dra.

Elisabete Hashimoto, Ms. Marcos Giovane Celli, Ms. Eliza Lazzari Klarke, Ms. Rafaela Ferrari, Ms. Alessandra Braga, Ms. Kerley Casaril, Ms. Dani Luce Doro, Amanda Gambale Borges, Fabrício Amorim Monteiro, Ms. Gisele Nobre, Ms. Cristina Filgueiras, Dr. Evandro Bona, Dr. Hevenilton José Matiazi, Dra. Simone Fuji, Ms. Elvis Perboni Martins, Ms. Camilla Guioti de Pádua, Dr. Cláudio Takeo Ueno, Dra. Lyssa Sakanaka. O fato de não serem todos nominados, não diminui a sua importância na minha vida e na minha formação. Obrigada pelas discussões científicas, pelos momentos de descontração e por termos um ambiente de trabalho agradável! Na sua caminhada científica, lembre que o seu trabalho não é a sua vida e sim, parte dela. E mesmo quando não houver o menor indício disso, você terá sim uma dissertação/tese para apresentar no final do curso. Seja condescendente com você, não se dedique nem se preocupe mais que o necessário.

A Ms. Marciane Magnani pela colaboração no sacrifício e coleta dos órgãos dos camundongos, na preparação das lâminas histológicas, nas determinações de propriedades emulsificantes e na avaliação sensorial. Pelo empréstimo da Câmera digital para obtenção de imagens para a tese. Pela participação na redação do artigo de toxicidade. Por pensar junto. Pela presença amiga, pelo abraço, apoio constante e, principalmente, por me dizer que se pode ir mais longe, depois de pensar que não se pode mais. Obrigada por me apresentar à linda família!

A Ms. Ariane Gaspar Costa, pela colaboração no sacrifício e coleta dos órgãos dos camundongos. Pela amizade e por tornar mais agradável a rotina no laboratório.

A Ms. Luciane Yuri Yoshiara, pela assessoria técnica com o computador e a impressora. Pelo empréstimo da Câmera digital para obtenção de imagens para a tese, pelo auxílio na preparação de cortes histológicos. Pela amizade e apoio constantes e por me dizer, com incrível convicção que “tudo vai dar certo”. Obrigada pela disponibilidade em me ajudar em assuntos profissionais e pessoais!

A Ms. Leticia Murate pela colaboração no preparo das lâminas histológicas e pela amizade.

Ao Thiago Montagner, pelo auxílio no taqueamento e pelos doces(!).

A Ms. Luciana Lobato, por me oferecer seu computador quando o meu deixou de funcionar, há 4 dias de entregar a tese impressa. Obrigada pela amizade e pela presença edificante em minha vida!

A Agnes – por contribuir com o meu trabalho durante o seu estágio realizado com extrema competência. Obrigada pela amizade.

Ao Ms. Rafael Dias - com quem aprendo desde economia até relações pessoais.

Aos amigos Éder Alexandre Cipriano da Silva e Peterson Dias, pelo auxílio na apresentação das imagens, pelo incentivo constante e pela amizade.

A minha família, meu porto seguro! Em especial na realização deste trabalho, agradeço a mana Káryn, por ler a tese e contribuir com suas considerações, mana Káira pelas idéias para a formulação do produto cárneo, pelo empréstimo do molde de ravióli e do moedor de carne. A sobrinha Rakelly, por se interessar pelo assunto da tese e acrescentar seus pontos de vista jornalísticos. A mana Karla, pelo equilíbrio, interesse e por ser meu ponto de apoio e motivação, por me auxiliar a viver melhor e com mais tranquilidade essa fase final do doutorado. Mano Gian, pela presença musical e por me ajudar na pesquisa de dados mercadológicos para o exame de qualificação. Mana Tuca por me lembrar de fazer “uma coisa de cada vez”. Enfim, a todos vocês, meus amores, por serem pessoas admiráveis, pelo amor, apoio, carinho e incentivo constantes! *“Eu sou o que vocês são, não solta da minha mão...”*

A CAPES pela concessão da bolsa.

*"Que lonjuras caminhei  
Quantos joelhos sangrei  
Quantos tombos levantei  
Mas não vou olhar pra trás  
Pra não ver se deixei cair  
A coragem que me falta pra seguir  
E andar e sangrar.  
Meus joelhos vão findar  
Mas o amor que eu plantei  
Vai brotar igual flor  
Igual pedra de corredor  
E a coragem se fará.  
Vou até o fim, de coração aberto  
Por certo não vou ficar calado  
Vou buscar meu Norte, seja longe, seja perto  
Por certo não vou ficar parado"*

*Lonjuras - Gian Calliari*

CALLIARI, Caroline Maria. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 como substituto de gordura.** 2009. 115f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

Biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 é um novo metabólito solúvel obtido neste trabalho por fermentação e proposto como ingrediente alimentar. O processo resultou em 10 g.L<sup>-1</sup> de um biopolímero bruto composto de 40% de minerais (P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, Mn, Na, Fe, Cr, Co, Ni, Pb, Cd, Mo), 35% de carboidrato (glicose) e 15% de proteína. A toxicidade *in vitro* do biopolímero foi avaliada a 2,5, 5,0 e 10,0 mg/mL em cultivo de células LLC MK<sub>2</sub> (rim de macaco *Rhesus*) pelo teste MTT, resultando em uma concentração citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) de 9,32 mg/mL. Em estudo de toxicidade oral durante 30 dias, camundongos Swiss receberam por gavagem soluções de biopolímero nas doses de 25, 75, 250 e 750 mg/kg/dia e não apresentaram sinais de efeitos prejudiciais nas análises hematológicas e histopatológicas, resultando em uma dose sem efeito adverso observado (NOAEL – *no observed adversed effect level*) de 750 mg/kg/dia. Quanto às propriedades tecnológicas, o biopolímero apresentou capacidade de formar soluções viscosas a frio, habilidade de formar gel, 83% de absorção de água, 69% de solubilidade, 191% de absorção de óleo e 56% de atividade emulsificante. Como substituto parcial e total da gordura em produto cárneo à base de frango (sistema alimentar modelo), o biopolímero teve efeito na manutenção da textura semelhante à da formulação com gordura, porém, quanto maior a quantidade de gordura na formulação, maior foi a aceitação, em função do sabor, avaliada pelo teste utilizando escala hedônica híbrida. Pela avaliação em microscópio óptico foi possível observar o efeito emulsificante e estabilizante do biopolímero nas formulações de produto cárneo à base de frango. A composição, as propriedades tecnológicas e a ausência de efeito nocivo do biopolímero produzido pela *Agrobacterium radiobacter* k84 apontam para inúmeras possibilidades de aplicação na área de alimentos, farmacêutica e de cosméticos.

**Palavras-chave:** *Agrobacterium radiobacter* k84. Biopolímero. Toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Caracterização. Propriedades tecnológicas. Substituto de gordura.

CALLIARI, Caroline Maria. **Production, characterization and application of *Agrobacterium radiobacter* k84 biopolymer as fat substitute.** 2009. 115p. Thesis (Food Science Doctoring) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## ABSTRACT

*Agrobacterium radiobacter* k84 biopolymer is a novel soluble metabolite obtained in this work by fermentation and proposed as a food ingredient. The process resulted in 10 g.L<sup>-1</sup> of a crude biopolymer composed of 40% minerals (P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, Mn, Na, Fe, Cr, Co, Ni, Pb, Cd, Mo), 35% carbohydrates (glucose) and 15% proteins. *In vitro* biopolymer toxicity was evaluated using 2.5, 5.0 e 10.0 mg/mL in LLC MK<sub>2</sub> (*Rhesus* monkey kidney) cell culture by the MTT test, resulting in cytotoxic concentration 50% (CC<sub>50</sub>) of 9.32 mg/mL. In a 30-day oral toxicity study, Swiss mice administered with biopolymer solutions by gavage at the doses of 25, 75, 250 e 750 mg/kg/day, presented no signs of harmful effects from hematological and histopathological analyses and the no observed adverse effect level (NOAEL) was 750 mg/kg/day. Concerning the technological properties, the biopolymer presented ability to form viscous solutions at room temperature, gelling activity, 83% water absorption, 69% solubility, 191% oil absorption and 56% emulsifying activity. As a partial and total fat substitute in chicken product (model system), the biopolymer had effect on texture being similar to the formulation with fat, but, as higher the fat amount in the formulation, higher the acceptation due to the taste, evaluated by hybrid hedonic scale test. Evaluation by light microscopy, showed emulsifying and stabilizing effects on the chicken product formulations with the biopolymer. *Agrobacterium radiobacter* k84 biopolymer composition, technological properties and absence of harmful effects make possible its applications in food, pharmaceutical and cosmetic products.

**Keywords:** *Agrobacterium radiobacter* k84. Biopolymer. *In vitro* and *in vivo* toxicity. Characterization. Technological properties. Fat substitute.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	–	Formulação dos produtos cárneos à base de frango.....	47
<b>Tabela 2</b>	–	Composição mineral de 1 grama do biopolímero de <i>Agrobacterium radiobacter</i> k84, Ingestão Dietética Recomendada (IDR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) dos minerais.....	55
<b>Tabela 3</b>	–	Viscosidade das soluções de biopolímero de <i>Agrobacterium radiobacter</i> k84 ( <i>Spindle</i> n° 18, 20 rpm, 25°C).....	60
<b>Tabela 4</b>	–	Peso corporal (média semanal, em gramas) dos camundongos Swiss tratados por gavagem com o biopolímero de <i>Agrobacterium radiobacter</i> k84, durante 30 dias .....	65
<b>Tabela 5</b>	–	Parâmetros hematológicos dos camundongos Swiss tratados por gavagem com o biopolímero de <i>Agrobacterium radiobacter</i> k84, durante 30 dias.....	65
<b>Tabela 6</b>	–	Contagem diferencial de células sangüíneas dos camundongos Swiss tratados por gavagem com o biopolímero de <i>Agrobacterium radiobacter</i> k84, durante 30 dias .....	66
<b>Tabela 7</b>	–	Principais componentes das formulações de produto cárneo à base de frango.....	70
<b>Tabela 8</b>	–	Parâmetros físicos e químicos das formulações de produto cárneo à base de frango .....	71
<b>Tabela 9</b>	–	Efeito da formulação na cor dos produtos cárneos à base de frango, crus e grelhados .....	76
<b>Tabela 10</b>	–	Freqüência da intenção de compra para cada formulação de produto cárneo à base de frango.....	76

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Etapas de produção do biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 .....38
- Figura 2** – Ficha utilizada para avaliação sensorial dos produtos cárneos à base de frango .....52
- Figura 3** – Imagens do biopolímero produzido pela *Agrobacterium radiobacter* k84: (a) observado a olho nu; (b) observado em microscópio eletrônico de varredura com aumento de 300 x.....54
- Figura 4** – Perfil eletroforético do biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 em poliacrilamida (SDS-PAGE), corado com nitrato de prata 1 = Padrão de peso molecular (Invitrogen®) – 10-220 kDa 2 = Biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 (50 µg de proteína/mL).....58
- Figura 5** – Efeito citotóxico do biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 em células LLC MK<sub>2</sub>, determinado pelo teste MTT. Resultados são médias de triplicatas ± o desvio padrão .....63
- Figura 6** – Consumo alimentar semanal médio (g) por grupo de camundongos Swiss tratados por gavagem com o biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84, durante 30 dias .....64
- Figura 7** – Micrografias da região centro lobular dos fígados dos camundongos Swiss tratados por gavagem com o biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84, durante 30 dias: (a) controle; (b) 25 mg/kg/dia; (c) 75 mg/kg/dia; (d) 250 mg/kg/dia; (e) 750 mg/kg/dia. Coloração H-E. Aumento de 40 x, em microscópio óptico .....66
- Figura 8** – Micrografias dos rins dos camundongos Swiss tratados por gavagem com o biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 durante 30 dias: (a)(f) controle; (b)(g) 25 mg/kg/dia; (c)(h) 75 mg/kg/dia; (d)(i) 250 mg/kg/dia; (e)(j) 750 mg/kg/dia. Coloração H-E. Aumento de 40 x, em microscópio óptico .....67

- Figura 9** – Aparência das formulações de produto cárneo à base de frango, cruas e grelhadas: (a)(d) F0 = formulação com 10% de gordura; (b)(e) F5 = formulação com 5% de gordura e 5% de biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84; (c)(f) F10 = formulação com 10% de biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 .....70
- Figura 10** – Micrografias das formulações grelhadas de produto cárneo à base de frango: (a) F0 = formulação com 10% de gordura; (b) F5 = formulação com 5% de gordura e 5% de biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84; (c) F10 = formulação com 10% de biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84. Coloração H-E. Aumento de 100 x, em microscópio óptico .....72
- Figura 11** – Frequência das notas para o atributo maciez dos produtos cárneos à base de frango, segundo a escala do ideal.....77
- Figura 12** – Frequência das notas para o atributo sabor de frango dos produtos cárneos à base de frango, segundo a escala do ideal .....77

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
3.1 BIOPOLÍMEROS MICROBIANOS .....	19
3.2 <i>Agrobacterium radiobacter</i> .....	20
3.3 MINERAIS .....	21
3.3.1 Macroelementos .....	22
3.3.2 Microelementos .....	23
3.4 CARBOIDRATOS .....	25
3.4.1 Fibra Alimentar .....	25
3.5 PROTEÍNAS .....	26
3.6 ESTUDOS DE TOXICIDADE .....	27
3.7 SUBSTITUTOS DE GORDURA .....	29
3.8 EMULSIFICANTES .....	30
3.9 EMULSÕES CÂRNEAS .....	32
3.10 MICROESTRUTURA .....	33
3.10.1 Microestrutura de produtos cárneos .....	34
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
4.1 PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO DE <i>Agrobacterium radiobacter</i> k84 .....	36
4.1.1 Manutenção do microrganismo .....	36
4.1.2 Caldo de cultivo .....	36
4.1.3 Preparo do pré-inóculo .....	37
4.1.4 Preparo do inóculo .....	37
4.1.5 Produção do biopolímero .....	38
4.1.6 Viabilidade bacteriana da biomassa .....	39
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO .....	39
4.2.1 Análise Microestrutural .....	39

4.2.2 Principais componentes .....	39
4.2.3 Atividade de água.....	40
4.2.4 pH.....	40
4.2.5 Composição Mineral.....	40
4.2.6 Carboidratos.....	41
4.2.6.1 Monossacarídeos .....	41
4.2.6.2 Fibra alimentar .....	41
4.2.7 Proteínas .....	41
4.2.7.1 Proteína solúvel.....	41
4.2.7.2 Peso molecular da fração protéica .....	42
4.3 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS .....	42
4.3.1 Índice de absorção de água (IAA) e índice de solubilidade em água (ISA)..	42
4.3.2 Índice de absorção de óleo (IAO).....	43
4.3.3 Viscosidade .....	43
4.3.4 Formação de gel .....	43
4.3.5 Propriedades emulsificantes .....	44
4.3.5.1 Atividade emulsificante.....	44
4.3.5.2 Estabilidade da emulsão .....	44
4.4 ESTUDO DE TOXICIDADE .....	44
4.4.1 Citotoxicidade.....	44
4.4.2 Toxicidade oral .....	45
4.4.2.1 Análise hematológica .....	46
4.4.2.2 Análise histológica.....	46
4.5 APLICAÇÃO COMO SUBSTITUTO DE GORDURA EM PRODUTO CÁRNEO À BASE DE FRANGO .....	47
4.5.1 Formulação de produto cárneo à base de frango.....	47
4.5.2 Principais componentes .....	48
4.5.3 Parâmetros físicos e químicos das formulações .....	48
4.5.3.1 pH.....	48
4.5.3.2 Atividade de água.....	48
4.5.3.3 Capacidade de retenção de água (CRA).....	49
4.5.3.4 Rendimento de cocção.....	49
4.5.3.5 Análise de textura.....	49
4.5.4 Análise microestrutural.....	50

4.5.5 Análise de cor.....	50
4.5.6 Avaliação Sensorial.....	50
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
5.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO PELA <i>AGROBACTERIUM</i> <i>RADIOBACTER K84</i> .....	53
5.1.1 Microestrutura.....	54
5.1.2 Composição Mineral.....	55
5.1.3 Carboidratos.....	56
5.1.4 Proteínas.....	57
5.2 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS.....	58
5.2.1 Índice de solubilidade em água (ISA).....	59
5.2.2 Índice de absorção de água (IAA) e de óleo (IAO).....	59
5.2.3 Viscosidade.....	60
5.2.4 Formação de gel.....	61
5.2.5 Propriedades emulsificantes.....	62
5.3 ESTUDO DE TOXICIDADE.....	62
5.3.1 Citotoxicidade.....	63
5.3.2 Toxicidade oral.....	64
5.3.2.1 Parâmetros hematológicos.....	65
5.3.2.2 Parâmetros histológicos.....	66
5.4 APLICAÇÃO COMO SUBSTITUTO DE GORDURA EM PRODUTO CÁRNEO À BASE DE FRANGO (SISTEMA ALIMENTAR MODELO).....	69
5.4.1 Principais componentes.....	70
5.4.2 Parâmetros físicos e químicos das formulações de produto cárneo à base de frango.....	71
5.4.3 Análise microestrutural.....	72
5.4.4 Análise de cor.....	75
5.4.5 Avaliação sensorial.....	76
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

<b>ANEXO .....</b>	<b>96</b>
ANEXO A – Artigo apresentado no Exame de Qualificação de doutorado e submetido à publicação no periódico Food and Chemical Toxicology.....	97

## 1 INTRODUÇÃO

Biopolímeros de origem microbiana são constituídos essencialmente por polissacarídeos, com estrutura e função similares às de gomas de origem vegetal e de algas, utilizadas na indústria de alimentos pela sua funcionalidade como espessantes, emulsificantes, estabilizantes, geleificantes e mimetizadores de gordura (SUTHERLAND, 2001).

Por não apresentarem dependência de sazonalidade e devido à possibilidade de controle das condições de produção, além de benefícios à saúde, os biopolímeros microbianos têm apresentado crescente participação no mercado mundial, competindo com as gomas vegetais e de algas, mais tradicionalmente conhecidas (FURTADO, 2004).

A propriedade desses metabólitos de microrganismos de mimetizar os efeitos da gordura nos alimentos vem ao encontro da necessidade da indústria de produzir alimentos com reduzido teor de gordura diante da crescente conscientização sobre os efeitos do consumo de altos níveis de gordura, ácidos graxos saturados e colesterol, tais como obesidade, doenças cardio-vasculares, alguns tipos de câncer, entre outras complicações (COLMENERO, 2000).

Naturalmente, anterior à aplicação, os novos ingredientes precisam ser caracterizados quanto à composição, funcionalidade tecnológica e efeitos ao organismo. Nesse contexto, este trabalho é o resultado da pesquisa sobre a produção de um biopolímero por *Agrobacterium radiobacter* k84 utilizando melão de cana-de-açúcar como fonte de carbono, caracterização das frações constituintes e das propriedades tecnológicas do produto obtido, avaliação quanto à toxicidade e aplicação como substituto de gordura em produto cárneo à base de frango.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Obter biopolímero produzido por *Agrobacterium radiobacter* k84, caracterizar, verificar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* e aplicar o biopolímero como substituto de gordura em produto cárneo à base de frango.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter biopolímero produzido por *Agrobacterium radiobacter* k84 utilizando melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

- Caracterizar a microestrutura e as frações constituintes do biopolímero.

- Determinar as propriedades tecnológicas do biopolímero.

- Avaliar o biopolímero quanto à toxicidade *in vitro* em células LLC MK<sub>2</sub> (rim de macaco *Rhesus*) e quanto à toxicidade oral em camundongos Swiss.

- Avaliar a aplicação do biopolímero como substituto parcial e total da gordura em produto a base de carne de frango, pela análise de características: físico-químicas, de cor, de textura, sensoriais e microestruturais.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BIOPOLÍMEROS MICROBIANOS

Biopolímeros, também conhecidos como polímeros biológicos, são macromoléculas derivadas de fontes naturais (WNEK, 2008). Exemplos de biopolímeros de interesse em alimentos são os polissacarídeos e os polipeptídeos (SCIARINI et al., 2008; WNEK, 2008).

Metabólitos microbianos para aplicação como ingredientes em alimentos não são produzidos no Brasil, porém são utilizados em grande escala, numa ampla variedade de produtos nacionais (FURTADO, 2004), o que representa um nicho de mercado a ser explorado no país.

A participação no mercado de novos ingredientes microbianos depende de aplicações inéditas ou de propriedades biológicas ímpares. Novos polissacarídeos sintetizados por microrganismos inócuos podem ser aplicados em alimentos, além de haver a possibilidade de aplicação em cosméticos e produtos de higiene (SUTHERLAND, 1998).

Os microrganismos oferecem uma alternativa interessante para a obtenção de polissacarídeos devido à possibilidade e necessidade de controle das condições de produção, a produção de uma variedade de glicanos com propriedades únicas (TRIVENI; SCHAMALA; RASTOGI, 2001) e a independência de fatores inerentes à colheita, condições climáticas ou poluição marinha, atrelados aos produtos de plantas e de algas (SUTHERLAND, 1992).

Pesquisadores que trabalham no desenvolvimento de produtos criam alimentos inovadores em resposta à demanda dos consumidores por ingredientes mais naturais e saudáveis e, nesse campo, a ampla possibilidade de aplicações tecnológicas das gomas microbianas, associada aos benefícios nutricionais e à saúde pode oferecer alternativas interessantes (JEZEQUEL, 1998).

A utilização de diferentes fontes de carbono na produção de biopolímeros microbianos, mantendo inalterados os outros componentes do meio de cultivo e as condições de processamento, origina produtos de diferentes

características na estrutura química, o que influencia nas propriedades e consequentemente nas aplicações possíveis (SUTHERLAND, 2001).

Em produtos biotecnológicos obtidos por fermentação, entre 38 e 73% do custo total de produção provém das matérias-primas, especialmente a fonte de carbono (SCHMIDELL, 2001). Diante disso, uma alternativa é a aplicação de subprodutos agroindustriais nos processos biotecnológicos para a produção de ingredientes para alimentos. Uma vez que o rendimento de produção dos biopolímeros microbianos geralmente é baixo, uma forma de viabilizar economicamente esses processos é utilizar fontes alternativas dos componentes utilizados no caldo de cultivo, como por exemplo, o melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. O melaço de cana-de-açúcar é uma alternativa de custo mais baixo que a glicose purificada utilizada na produção de biopolímeros comerciais a partir do cultivo de *Agrobacterium*, com a vantagem da alta concentração de sacarose e da variedade de sais minerais, necessários à produção industrial de metabólitos (OLIVEIRA et al., 2007).

### **3.2 *Agrobacterium radiobacter***

*Agrobacterium radiobacter*, primeiramente identificada como *Alcaligenes faecalis* variedade *myxogenes*, é uma bactéria tipicamente encontrada no solo, próximo de raízes de plantas. Apresenta colônias brancas, redondas, bem definidas e com aspecto de cera. Pertencente à família *Rhizobiaceae*, é Gram negativa, aeróbia, não patogênica, não forma esporos e apresenta crescimento ótimo a 25 - 30°C e pH 6 – 9 (BERGEY, 1974).

A variedade k84, cepa mutante da *A. radiobacter*, foi registrada em 1979 como agente de prevenção da doença da galha da coroa em algumas frutas, nozes e em plantas ornamentais, com renovação de registro em 1995, sendo utilizada comercialmente para essa aplicação (EPA, 2005). Cultivada em condições específicas, a *A. radiobacter* k84 produz agrocina, um composto tóxico à *Agrobacterium tumefaciens*, causadora da galha da coroa, comum também em pessegueiros (PENALVER et al., 1994; STOCKWELL; MOORE; LOPER, 1993). Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA -

*Environmental Protection Agency*) não há relatos de efeitos adversos ao ambiente e a espécies vivas relacionados à *A. radiobacter* K84 (EPA, 2005).

Quando em meio contendo carboidrato assimilável, o crescimento da *A. radiobacter* é acompanhado da produção de exopolissacarídeos, como a curdlana e a succinoglucana (BERGEY, 1974; DUSSAP; DE VITA; PONS, 1991; HARADA; MISAKI; SAITO, 1968).

A goma curdlana foi descoberta em 1966 e aprovada como aditivo alimentar em 1996 (PSZCZOLA, 1997). A empresa Takeda Chemicals Industries Ltd. comercializa a curdlana, uma glucana  $\beta$ -1,3 insolúvel como geleificante, espessante, estabilizante, emulsificante e substituto de gordura (FUNAMI et al., 1999a; JEZEQUEL, 1998; NAKAO et al., 1991; PZCZOLA, 1997). A goma curdlana apresenta ainda benefícios à saúde, comuns às  $\beta$ -glucanas (HAVLIK et al., 2005). Succinoglucana é um heteropolissacarídeo solúvel (DUSSAP; DE VITA; PONS, 1991) que já foi produzido industrialmente pela Shell (ZEVENHUIZEN, 1997) com interesse nas aplicações como estabilizante de emulsões e espessante. Há inúmeras pesquisas visando à obtenção de biopolímeros a partir da fermentação da *A. radiobacter* variando a fonte de carbono e as condições de processamento (LEE et al., 1997a, 1997b; PORTILHO et al., 2006; SUTHERLAND, 1998; TRIVENI; SCHAMALA; RASTOGI, 2001).

A aplicação da *A. radiobacter* k84 no controle da galha da coroa aponta para o aproveitamento da biomassa obtida como subproduto da obtenção de metabólitos de interesse comercial.

A fermentação de substratos pela *A. radiobacter* apresenta potencialidades no desenvolvimento de ingredientes alimentares (SUTHERLAND, 2001) e efetivamente muito mais pode ser feito, considerando fontes renováveis como alternativas aos produtos da indústria química (CUNHA et al., 2004).

### **3.3 MINERAIS**

Cerca de 5% do peso corpóreo constitui-se de minerais, dos quais metade é cálcio e um quarto é fósforo (CZAJKA-NARRINS, 1998). Os minerais correspondem de 0,2 a 0,3% do total de nutrientes ingeridos na dieta e apresentam

tal importância que, sem eles, o organismo não é capaz de utilizar os 99,7% de nutrientes restantes (NABRZYSKI, 2002). Em condições normais o organismo humano excreta diariamente de 20 a 30 mg de minerais, que necessitam de reposição imediata pela alimentação para a regulação do equilíbrio orgânico (FRANCO, 1996).

Os minerais fazem parte de hormônios, enzimas e outros compostos que regulam funções bioquímicas no organismo. Minerais dissolvidos nos fluidos corporais são responsáveis por impulsos nervosos, contração muscular, balanço hídrico e ácido-básico, além de ter importante papel em manter a respiração, frequência cardíaca e pressão sangüínea nos limites normais. A deficiência de minerais na dieta pode levar a doenças, geralmente reversíveis após a suplementação (CZAJKA-NARRINS, 1998; NABRZYSKI, 2002).

Indivíduos que seguem dietas de baixa caloria, idosos, mulheres grávidas, vegetarianos, pessoas que usam medicamentos diuréticos e habitantes de áreas cujo solo é deficiente em certos minerais são os grupos com maior risco de apresentar deficiência. A ingestão de minerais abaixo do ideal pode ser devida também aos efeitos do excessivo refinamento e processamento dos alimentos (NABRZYSKI, 2002).

Alguns minerais são reconhecidos como essenciais, mesmo em quantidades sutis e ainda não claramente determinadas. A deficiência de um mineral necessário em quantidades mínimas pode representar prejuízo igual ou superior à falta de um mineral requerido em quantidades superiores (CZAJKA-NARRINS, 1998). Os macroelementos são requeridos na dieta em quantidades superiores a 100 mg por dia. No caso dos microelementos, a necessidade diária é de miligramas ou microgramas (NABRZYSKI, 2002).

### **3.3.1 Macroelementos**

Fósforo (P): formação de ossos e dentes. Componente do metabolismo energético (ATP e ADP), componente da síntese protéica do DNA e RNA, transporte de lipídios, balanço ácido-básico, formação de enzimas (ESCHLEMAN, 1984; HENDLER, 1990). Deficiência: é rara, pois o conteúdo de

fosfato em plantas e animais é superior às recomendações e sua absorção é bastante eficiente (50-90%). A deficiência em fósforo pode acarretar aumento de cálcio no plasma e na urina (SILVA; COZZOLINO, 2005a).

Potássio (K): regulação da pressão osmótica, balanço hídrico e ácido-básico, estimulação nervosa, contração muscular, síntese protéica, formação de glicogênio (ESCHLEMAN, 1984; HENDLER, 1990).

Cálcio (Ca): formação de ossos e dentes, coagulação sangüínea, permeabilidade celular, estimulação nervosa, contração muscular, ativação enzimática. Deficiência: crescimento atrofiado, raquitismo, osteomalácia, osteoporose, tétano (ESCHLEMAN, 1984; HENDLER, 1990).

Magnésio (Mg): componente de ossos e dentes, ativação enzimática, estimulação nervosa, contração muscular. Deficiência: crescimento atrofiado, raquitismo, ocorrência de tremores que resultam em ataques de convulsão. A deficiência é observada em casos de alcoolismo ou doença renal (ESCHLEMAN, 1984; HENDLER, 1990).

Sódio (Na): regulação da pressão osmótica, balanço hídrico e ácido-básico, estimulação nervosa, contração muscular, permeabilidade celular. Deficiência: casos raros de náuseas, vômito, vertigem, exaustão e câibras (ESCHLEMAN, 1984; HENDLER, 1990).

### **3.3.2 Microelementos**

Ferro (Fe): formação da hemoglobina e mioglobina, componente essencial de enzimas. Deficiência: anemia, diminuição do transporte de oxigênio e imunidade celular, fraqueza muscular (ESCHLEMAN, 1984; HENDLER, 1990).

Cobre (Cu): necessário à utilização do ferro e à formação da hemoglobina, constituinte da citocromo-oxidase, participa do desenvolvimento ósseo e de tecidos elásticos. Deficiência: anemia, neutropenia, leucopenia, desmineralização do esqueleto (ESCHLEMAN, 1984; HENDLER, 1990).

Zinco (Zn): constituinte de sistemas enzimáticos, transporte do dióxido de carbono, utilização da vitamina A. Deficiência: dificuldade de cicatrização,

diminuição da sensibilidade gustativa, retardo do crescimento e do desenvolvimento sexual, nanismo (ESCHLEMAN, 1984; HENDLER, 1990).

Manganês (Mn): co-fator de diversas enzimas, atividade antioxidante no processo de envelhecimento, importante para o funcionamento normal do cérebro, reprodução e estrutura óssea (ESCHLEMAN, 1984; HENDLER, 1990). Deficiência: em animais, apresentou prejuízo no crescimento e na função reprodutora, queda na tolerância à glicose, alterações no metabolismo de carboidratos e lipídios, hipocolesterolemia e interferência no desenvolvimento normal do esqueleto (SILVA; COZZOLINO, 2005b).

Cromo (Cr): aumenta a tolerância à glicose e atua no metabolismo lipídico, eficaz na diminuição de risco e no tratamento de diabetes. Deficiência: retardo no crescimento, intolerância à glicose, elevação do colesterol sanguíneo (ESCHLEMAN, 1984; HENDLER, 1990).

Cobalto (Co): co-fator da vitamina B<sub>12</sub>, contribui para a imunidade. Deficiência: ocorre raramente, pode levar à anemia perniciosa, com manifestações hematológicas e neurológicas devido à falta de vitamina B<sub>12</sub> (ESCHLEMAN, 1984; HENDLER, 1990).

Níquel (Ni): co-fator ou componente estrutural de metaloenzimas específicas. Deficiência: diminuição da atividade de enzimas hepáticas, como a glicose-6-fosfato (FRANCO, 1996).

Molibdênio (Mo): co-fator essencial de enzimas envolvidas em reações de oxidação e redução. Deficiência: aumento da metionina plasmática e hipo-uricemia severa, taquicardia, náusea e vômitos, letargia, desorientação, coma e cefaléia (ESCHLEMAN, 1984; HENDLER, 1990).

Em suma, os minerais são necessários à manutenção do metabolismo celular normal e às funções dos tecidos, participando de uma infinidade de processos bioquímicos e fisiológicos importantes para a saúde. A influência dos minerais em reações bioquímicas nos sistemas vivos viabiliza também o uso intencional em alimentos, como agentes antimicrobianos, seqüestrantes, antioxidantes, realçadores de sabor, agentes tamponantes e ainda como suplementos alimentares (NABRZYSKI, 2002).

### 3.4 CARBOIDRATOS

Os carboidratos são proporcionalmente a maior fonte de calorias disponíveis aos seres humanos, mesmo antes do nascimento. Tanto para a gestante como para o feto, a demanda cerebral de glicose é significativamente alta, assim, a meta é fornecer carboidratos digeríveis a fim de manter o suprimento adequado de glicose ao sistema nervoso central. Quanto às necessidades diárias, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda a ingestão de 300 g de carboidrato, considerando uma dieta de 2000 kcal (ANVISA, 2003a).

Os polissacarídeos são o grupo mais importante e representativo entre os ingredientes alimentares com ação estabilizante, emulsificante, espessante e geleificante, sendo as gomas microbianas (xantana, gelana e curdlana) exemplos de polissacarídeos que desempenham tais funções (RUITER; VORAGEN, 2002). As interações intra e intermoleculares e interações com outros componentes (outros polissacarídeos, proteínas, lipídios e minerais) são a base das propriedades funcionais apresentadas pelos polissacarídeos (RUITER; VORAGEN, 2002; SIKORSKI, 2002).

#### 3.4.1 Fibra alimentar

A ANVISA (Resolução RDC n.40 de 21/03/2001) definiu fibra alimentar como “[...] qualquer material comestível que não seja hidrolisado pelas enzimas endógenas do trato digestivo de humanos e determinado segundo os métodos publicados pela AOAC em sua edição mais atual” (FILISSETTI; LOBO, 2005).

Outra definição para fibra alimentar foi descrita, também em 2001, pela Associação Americana de Químicos de Cereais (AACC – *American Association of Cereal Chemists*): “A fibra da dieta é a parte comestível das plantas ou carboidratos análogos que são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado de humanos com fermentação completa ou parcial no intestino grosso. A fibra da dieta inclui polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias

associadas à planta. A fibra da dieta promove efeitos fisiológicos benéficos, incluindo laxação, e/ou atenuação do colesterol do sangue e/ou atenuação da glicose do sangue” (FILISSETTI; LOBO, 2005).

Considerando que os componentes da fibra alimentar estimulam o crescimento de bactérias benéficas, especialmente bifidobactérias e lactobacilos, podem ser incluídos na categoria de alimentos funcionais definidos como prebióticos, ou seja, ingredientes alimentares que não são digeridos e que afetam positivamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de uma ou de um número limitado de bactérias do cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Além da não digestibilidade, os efeitos e aspectos inerentes aos prebióticos são o baixo valor calórico (<2,15kcal), aumento do volume de fezes, modulação da microbiota colônica por estimulação das bactérias benéficas (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Eubacterium spp*) e inibição de bactérias indesejáveis (*Clostridium* e *Bacterioides*). O consumo desses carboidratos está relacionado à diminuição de risco de infecções intestinais e de câncer coloretal, redução do nível de colesterol, melhora na absorção de nutrientes e modulação da resposta imune (HOLZAPFEL; SHILLINGER, 2002).

Estudos com ratos indicam que os prebióticos estimulam a absorção e retenção de minerais, principalmente Mg, Ca e Fe. Em humanos tem sido observado o efeito positivo dos prebióticos na absorção do cálcio, principalmente em circunstâncias de maior necessidade fisiológica desse mineral, como a adolescência e a pós-menopausa (FILISSETTI; LOBO, 2005).

### **3.5 PROTEÍNAS**

As proteínas da dieta estão envolvidas na síntese de proteínas dos tecidos, nos processos anabólicos, fornecendo os aminoácidos necessários à construção e manutenção dos tecidos orgânicos. Como fonte de energia, equivalem aos carboidratos, fornecendo 4 kcal/g. Desempenham papel estrutural em todos os tecidos do organismo e na formação de enzimas, hormônios e secreções. Como anticorpos, estão envolvidas nas funções do sistema imunológico. Contribuem para

a homeostase pela manutenção de relações osmóticas entre os líquidos corpóreos e, por serem capazes de se combinar com ácidos ou bases, mantêm o equilíbrio ácido-base do sangue e tecidos. A deficiência de proteína pode ocasionar edema, perda de tecidos corpóreos, fígado gorduroso, dermatose, resposta imunológica diminuída, fraqueza e perda de vigor (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998b). Ainda, Waitzberg e Logollo (2000) afirmam que a falta de aminoácidos pode levar à perda de peso, diminuição do crescimento, balanço nitrogenado negativo e sintomas clínicos. Já qualquer aminoácido que não seja utilizado pelo organismo é degradado.

Consideradas como elemento fundamental em todos os processos fisiológicos e bioquímicos do organismo, as proteínas atuam, sobretudo, na reparação e manutenção dos tecidos e no processo de crescimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a necessidade diária média de proteínas é de 0,79 g/kg de peso corpóreo/dia, sendo que para indivíduos praticantes de atividade física regular, a recomendação varia de 1 a 2,4 g/kg/dia (LABUZA; EDMAN JUNIOR, 1984; TIRAPEGUI; CASTRO; ROSSI; 2005). De acordo com a ANVISA, a ingestão diária recomendada de proteínas é de 75 g, considerando uma dieta de 2000 calorias (ANVISA, 2003a).

Quanto à funcionalidade tecnológica, as proteínas podem ser utilizadas como emulsificantes (TOREN et al., 2003), estabilizantes de emulsões, surfactantes (DAMODARAN, 1994), geleificantes (SIKORSKI, 2002) e substitutos de gordura (KRUMELL, 1998).

### **3.6 ESTUDOS DE TOXICIDADE**

Toxicidade é a capacidade de uma substância produzir algum efeito adverso ou dano (JONES, 2002) e um dos princípios da toxicologia refere-se à relação entre a concentração da substância em análise e a resposta do organismo, princípio este expresso há séculos por Paracelsus: “A dose correta diferencia o veneno do remédio” (OGA; SIQUEIRA, 2003), ou seja, mesmo componentes essenciais a um organismo podem ser consumidos em níveis tóxicos (JONES, 2002).

Em alimentos, a segurança absoluta é inatingível, portanto, se busca a segurança relativa, que é a probabilidade de não ocorrência de dano quando o alimento é consumido da maneira usual (JONES, 2002).

Apesar de todos os progressos técnicos que permitem esclarecer os processos tóxicos a níveis cada vez mais profundos, não se pode negligenciar a observação do animal intacto e dos tecidos *in vivo* para não superestimar resultados obtidos em condições geralmente artificiais. Ainda que não haja um animal que responda às substâncias da mesma maneira que o homem, a maioria dos efeitos de uma substância no organismo de um animal de laboratório se manifesta também no homem e vice-versa (REPETTO, 1997). Entretanto, mesmo que sejam utilizados os melhores métodos de avaliação da toxicidade, a extrapolação e interpretação adequadas são necessárias para inferir o risco a humanos a partir de dados obtidos de experimentos com animais (JONES, 2002).

Ao final do teste de toxicidade *in vivo*, deve-se avaliar a morfologia dos órgãos e a histologia de alguns órgãos alvo, que variam conforme a ação da substância, via de administração e o objetivo do estudo. Em geral, fígado e rim são bons indicadores no caso de administração oral, já que suas células são imediatamente expostas aos compostos. O fígado é considerado um bom órgão indicador de toxicidade por ser o primeiro órgão alvo no organismo, recebendo através da veia porta o que é absorvido pelo sistema alimentar. Além disso, os hepatócitos realizam o metabolismo de compostos exógenos (TIMBRELL, 2002). Os rins são bons indicadores porque, como filtradores do sangue, entram em contato com grande parte das substâncias absorvidas e representam a rota mais importante de excreção da maioria dos compostos (REPETTO, 1997; TIMBRELL, 2002).

A dose sem efeito adverso observado (NOAEL - *no observed adverse effect level*) é o maior nível de ingestão ou dose oral experimental de um nutriente que não resultou em efeito adverso observado nos indivíduos estudados e é verificado para uma circunstância específica na identificação de dano e na avaliação da dose-resposta (COZZOLINO, 2005).

Após testar de várias maneiras e indicar que um composto pode ser consumido com segurança, a NOAEL é dividida por um fator de segurança para determinar a ingestão diária aceitável (ADI - *acceptable daily intake*), expressa em miligramas da substância teste por quilograma de peso corporal por dia. O fator de segurança é arbitrário e pode variar de acordo com o material e as circunstâncias.

Geralmente é utilizado o fator 100, o qual foi estabelecido considerando que a sensibilidade média dos humanos a um composto seja 10 vezes maior que a do animal experimental mais sensível. Ao utilizar o fator 100 (10 x 10), se estaria garantindo que o indivíduo mais sensível poderia ingerir a quantidade equivalente a ADI de forma segura (NESTMANN; LYNCHA, 2007; VETTORAZZI, 1977).

### 3.7 SUBSTITUTOS DE GORDURA

A substituição da gordura se baseia na habilidade de um outro composto em estabilizar água em uma estrutura cremosa, conferindo palatabilidade similar à da gordura. Devido ao alto valor calórico, há uma tendência crescente à substituição das gorduras e óleos por componentes não calóricos que possam conferir a mesma funcionalidade tecnológica e sensorial (RUITER; VORAGEN, 2002). Os substitutos de gordura normalmente são compostos estruturalmente diferentes das gorduras, com funcionalidade similar, porém com valor calórico inferior. Esses ingredientes podem ser carboidratos ou proteínas, com valor energético que varia de 0 a 5 kcal/g (KRUMELL, 1998).

Exemplos de substitutos de gordura utilizados em alimentos são a goma xantana (FOEGEDING; RAMSEY, 1986), produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris* (SOUW; DEMAINE, 1979), a polidextrose, polímero de dextrose obtida pela hidrólise do amido, além do grupo dos frutooligossacarídeos (FOS), polímeros de frutose contendo uma glicose terminal, extraídos da alcachofra. A inulina, extraída da chicória faz parte do grupo dos FOS e também é utilizada como substituto de gordura (DEIS, 1994).

A presença da gordura e a maneira como está dispersa no alimento têm relação estreita com as propriedades de fluxo do alimento na boca (extensibilidade, recobrimento da língua, viscosidade e a sensação ao engolir) e por isso afetam diretamente o sabor e a palatabilidade (FLINT, 1996; RUITER; VORAGEN, 2002).

Os aspectos de interesse em relação ao desenvolvimento de produtos e às estratégias de redução do conteúdo de gordura compreendem fatores sensoriais, nutricionais, tecnológicos, aceitação, fatores legais e de custos, os quais

são essenciais para elucidar a concepção de um produto (COLMENERO, 2000). Na substituição parcial ou total da gordura, o desafio é manter indicadores de qualidade como a maciez, portanto, a indústria de produtos cárneos tem buscado ingredientes para solucionar problemas relativos à textura e à retenção de umidade (BARBUT, 2006).

De todos os setores, a indústria de carne e derivados tem sido a mais afetada pela publicidade negativa a respeito das implicações da carne e derivados em algumas doenças e a demanda por alimentos tomados como não saudáveis ou que tenham pouca contribuição para uma dieta balanceada tem diminuído sensivelmente. Em resposta a essa problemática, os resultados de pesquisas científicas acerca dos benefícios de diversos ingredientes alimentares para a diminuição de risco ou tratamento de doenças específicas apontam para o desenvolvimento de produtos cárneos mais saudáveis, não somente pela diminuição na quantidade ou modificação do tipo de gordura, mas também incorporando uma ampla variedade de ingredientes que apresentem benefícios à saúde a fim de resultar em alimentos funcionais (COLMENERO, 2000).

É essencial que se siga metodologia adequada à avaliação das características dos produtos formulados para determinar as propriedades e a aceitabilidade, verificando a conveniência da redução de gordura. Isso fornece informação sobre modificações que seriam pertinentes no desenvolvimento de produtos cárneos com reduzido teor de gordura. A avaliação das formulações se baseia no comportamento reológico, pH, distribuição da gordura na matriz protéica e demais propriedades influenciadas pela natureza do sistema alimentar cárneo e pelos processos de elaboração necessários à produção de diferentes produtos cárneos com baixo teor de gordura (COLMENERO, 2000).

### **3.8 Emulsificantes**

Emulsões são sistemas bifásicos de líquidos imiscíveis onde uma fase está macroscopicamente dispersa na outra na forma de gotículas. A fase dispersa também é chamada de fase interna e a fase que forma o meio no qual as gotículas estão suspensas é a fase contínua ou externa. Emulsões estáveis são

obtidas prevenindo a aproximação das gotículas, o que é possível pela adição de um emulsificante ou pelo aumento da viscosidade da fase contínua (AGUILERA; STANLEY, 1990).

Emulsificantes são compostos anfifílicos (contêm resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos) que se concentram na interface água/óleo, ocasionando diminuição significativa na tensão interfacial, redução da energia requerida para formar emulsões e a formação de filmes estáveis ao redor dos glóbulos de gordura, os quais previnem a coalescência (DAGORN-SCAVINER; GUEGUEN; LEFEBVRE, 1987; KLEMASZEWSKI; HAQUE; KINSELLA, 1989; RUITER; VORAGEN, 2002; SIKORSKI, 2002).

Bioemulsificantes são compostos de origem microbiana que incluem polissacarídeos, proteínas ou misturas complexas destes biopolímeros, capazes de estabilizar emulsões (TOREN et al., 2003). As gomas xantana, gelana e curdlana são exemplos de bioemulsificantes utilizados na indústria de alimentos (RUITER; VORAGEN, 2002) e a manoproteína, uma glicoproteína de levedura, é um composto amplamente estudado pelas propriedades emulsificantes (BARRIGA et al., 1999; TORABIZADEH; SHOJAOSADATI; TEHRANI, 1996). A biodegradabilidade é uma característica importante desses compostos, por evitar problemas de toxicidade e acúmulo em ambientes, o que aumenta o potencial de aplicação industrial nos setores alimentício, farmacêutico e ambiental (AMARAL et al., 2006; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

A goma arábica apresenta propriedades emulsificantes (SHEPHERD et al., 1995), assim como as gomas em geral, (RUITER; VORAGEN, 2002). Um exemplo de proteína amplamente utilizada em alimentos pelas propriedades emulsificantes é a lecitina de soja (SHEPHERD et al., 1995).

Entre as variáveis que afetam as propriedades físicas da emulsão estão a proporção de cada fase, o tamanho e a distribuição das gotículas e a presença e localização de agentes surfactantes (AGUILERA; STANLEY, 1990). O pH do meio afeta as propriedades emulsificantes alterando a solubilidade e a hidrofobicidade superficial das proteínas e a carga da camada protetora ao redor dos glóbulos de gordura. Os íons alteram as interações eletrostáticas, a conformação e a solubilidade das proteínas (SIKORSKI, 2002).

A capacidade de emulsificação das proteínas se dá pelo balanço das características hidrofílicas e lipofílicas, determinado pelo índice de absorção

água/óleo (IAAO), relacionado à capacidade da proteína em reduzir a tensão interfacial entre água e óleo (ELIZADE et al., 1988, ELIZALDE; PILOSOFF; BARTOLOMAI, 1991; KANTEREWIKS, 1987).

### **3.9 EMULSÕES CÁRNEAS**

Produtos cárneos cominuídos (reestruturados) são sistemas alimentares onde uma emulsão do tipo óleo em água (O/A) está aprisionada em um gel formado por proteínas insolúveis e fibras musculares. A gordura é a fase dispersa na emulsão, presente na forma de gotículas envoltas por um filme protéico interfacial, composto de proteínas miofibrilares extraídas pelo sal, as quais também contribuem para a formação da matriz do gel (AGUILERA; STANLEY, 1990). Emulsões cárneas não são consideradas emulsões verdadeiras e sim suspensões coloidais complexas, não totalmente homogêneas. (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2006). A massa ou emulsão cárnea é produzida pela cominuição da carne com o sal e outros ingredientes, formando uma dispersão constituída de água, gordura e proteína (BATER; MAURER, 1991). De acordo com a teoria da emulsão, durante a trituração, a água e as proteínas cárneas solúveis no sal atuam como a fase contínua, envolvendo os glóbulos de gordura em um sistema bifásico que é estabilizado pelo tratamento térmico (PARKS; CARPENTER, 1987).

Um importante parâmetro econômico para a indústria processadora de carnes é a emulsão estável, da qual a gordura não se separa durante o cozimento. O pH, a porcentagem de proteínas, a viscosidade da massa e a formação da matriz geleificada são alguns dos fatores que influenciam na estabilidade da emulsão cárnea (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2006). A estabilidade da matriz da emulsão é também relativa à firmeza e distribuição uniforme das gotículas de gordura (AGUILERA; STANLEY, 1990; JONES; MANDIGO, 1982), à espessura do filme protéico interfacial e à integridade e densidade da matriz da emulsão como fase contínua, além da habilidade em manter essa integridade durante a aplicação de temperatura na cocção. Essas características parecem estar diretamente relacionadas à habilidade da emulsão ou massa cárnea em reter gordura e água (IVEY; WEEB; JONES, 1970; JONES; MANDIGO, 1982). Propriedades como a

absorção de água e a geleificação podem ser mais importantes que a emulsificação na estabilidade de sistemas cárneos cominuídos (COMER; ALLAN-WOJITAS, 1988).

A estabilidade da emulsão formada influi positivamente no rendimento de cocção (SMITH et al., 1973) e na manutenção da textura, atributo mais importante de qualidade da carne (AGUILERA; STANLEY, 1990).

Diferentes fontes protéicas de origem não-cárnea são amplamente utilizadas na elaboração de produtos emulsionados com a finalidade de melhorar as propriedades funcionais e a estabilidade, bem como aumentar a qualidade nutricional. Ingredientes não protéicos também são utilizados para auxiliar na estabilização dessa classe de produtos, sendo a maioria carboidratos, que reagem com proteínas cárneas e/ou não-cárneas através de interações proteína-carboidrato, reforçando a cimentação do gel da matriz e auxiliando na estabilização do sistema (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2006).

### **3.10 MICROESTRUTURA**

A análise estrutural é necessária para caracterizar, controlar e aprimorar as propriedades dos alimentos pela formulação de uma abordagem racional do processamento (AGUILERA; STANLEY, 1990), considerando que o conhecimento da microestrutura é primordial para a compreensão do comportamento de sistemas alimentares, por estar relacionada à nutrição, estabilidade química e microbiológica, textura, propriedades físicas e sensoriais. Técnicas de microscopia são necessárias para atingir o objetivo maior, que é correlacionar a estrutura com a estabilidade e a funcionalidade (AGUILERA, 2005; AGUILERA; STANLEY; BAKER, 2000).

No estudo de materiais em pó, a caracterização da funcionalidade requer a apreciação das propriedades do material, da arquitetura e da microestrutura das partículas (THIES, 2001), pois as características microestruturais como a forma e o tamanho de partícula influenciam em propriedades de solubilidade, absorção e viscosidade (HROMÁDKOVÁ et al., 2003; PAPPAS; RAO; SMIT, 1987). Pela análise de produtos em pó, por microscopia eletrônica de varredura, é possível definir o estado do composto como amorfo ou cristalino, o que auxilia na elucidação das

propriedades, uma vez que essas duas formas apresentam diferenças de estabilidade, solubilidade em água e higroscopicidade (GOMBAS et al., 2003). Em uma substância sólida amorfa as partículas estão distribuídas de maneira irregular, o que resulta em alta solubilidade em água, enquanto materiais cristalinos apresentam-se em estado altamente ordenado e apresentam solubilidade mais baixa (CANO-CHAUCA et al., 2005).

Em alimentos processados, a funcionalidade, as propriedades texturais e a percepção sensorial na boca resultam de intervenções em nível microestrutural, que envolve dimensões de 0,01 a 100  $\mu\text{m}$  (AGUILERA, 2000), em que poucos elementos estruturais dos alimentos são reconhecidos a olho nu (AGUILERA, 2005).

O microscópio é cada vez mais utilizado para o estudo da influência dos ingredientes e das condições de processamento na estrutura dos alimentos. Ao observar no microscópio óptico a distribuição e o estado físico dos componentes, particularmente amido e gordura, é possível explicar, por exemplo, porque alimentos com composição química similar apresentam texturas diferentes. No desenvolvimento de produtos com reduzido teor de gordura as técnicas de microscopia permitem a comprovação da presença da gordura e das substâncias utilizadas para substituí-la total ou parcialmente (FLINT, 1996).

### **3.10.1 Microestrutura de produtos cárneos**

A qualidade dos produtos cárneos está intimamente relacionada à microestrutura (LARREA et al., 2007). Para otimizar o uso de ingredientes não cárneos e estabelecer sua funcionalidade, é importante entender a interação entre a carne e esses ingredientes (BARBUT, 2006) e, para tanto, uma das metodologias eficazes é a análise microestrutural.

A estrutura finamente dividida das emulsões cárneas permite a preparação de cortes para análise microscópica nos quais é possível observar a proteína, a gordura e o amido (FLINT, 1996). A microestrutura das redes de gel de proteína em carnes processadas auxilia na explicação das características dos produtos (textura, propriedades de retenção de água e de gordura), na avaliação do

efeito dos níveis de gordura e outros ingredientes não cárneos e ainda na localização desses componentes, como a distribuição da gordura na matriz protéica (COLMENERO, 2000).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo está dividido em subtítulos, de acordo com o tema do experimento realizado e o material utilizado em cada etapa do trabalho está descrito junto à metodologia correspondente.

### 4.1 PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO DE *AGROBACTERIUM RADIOBACTER* K84

O melaço de cana-de-açúcar (50% de carboidratos totais) utilizado como fonte de carbono para a produção do biopolímero pela *Agrobacterium radiobacter* k84 foi gentilmente fornecido pela Cooperativa Agropecuária Rolândia Ltda (COROL), Rolândia, Paraná. A cepa de *A. radiobacter* k84 foi cedida pelo Laboratório de Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná.

#### 4.1.1 Manutenção do microrganismo

A bactéria *A. radiobacter* k84 foi mantida em meio inclinado composto de 1,0% de manitol, 0,02% de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,02% de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), 0,01% de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), 0,25% de extrato de levedura e 1,5% de ágar.

#### 4.1.2 Caldo de cultivo

O caldo de cultivo preparado com melaço de cana-de-açúcar 4°BRIX (2% de carboidratos), 1,2% de extrato de levedura (CUNHA, 2002) e traços de sais minerais (Quadro 1). A concentração de melaço de cana-de-açúcar no caldo descrito

foi definida em experimento prévio, onde foram testadas as concentrações de 1,5 e 4°BRIX, em função da massa de biopolímero produzida.

Sais Minerais	Quantidade (g.L <sup>-1</sup> )
Fosfato de potássio monobásico [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	1,74
Fosfato de potássio dibásico [K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ]	0,49
Sulfato de sódio [Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	1,63
Cloreto de magnésio hexahidratado [MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O]	0,25
Cloreto férrico hexahidratado [FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O]	0,024
Cloreto de cálcio dihidratado [CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O]	0,015
Cloreto de manganês tetahidratado [MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O]	0,01
Ácido cítrico [C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ]	0,21

**Quadro 1** – Sais minerais utilizados no meio de cultivo para a produção de biopolímero por *Agrobacterium radiobacter* k84

Fonte: (PHILLIPS; LAWFORD, 1983)

#### 4.1.3 Preparo do pré-inóculo

Anteriormente ao preparo do pré-inóculo, a *A. radiobacter* k84 foi ativada. Para tanto, uma alçada foi inoculada em um novo meio de manutenção (item 4.1.1) inclinado e a incubação se deu a 28°C, durante 48 horas. Para o preparo do pré-inóculo, o caldo de cultivo foi inoculado com uma alçada da bactéria (imediatamente após o período de ativação) e mantido em incubadora com agitação (TE421, Tecnal) a 28°C e 150 rpm, durante 48 horas.

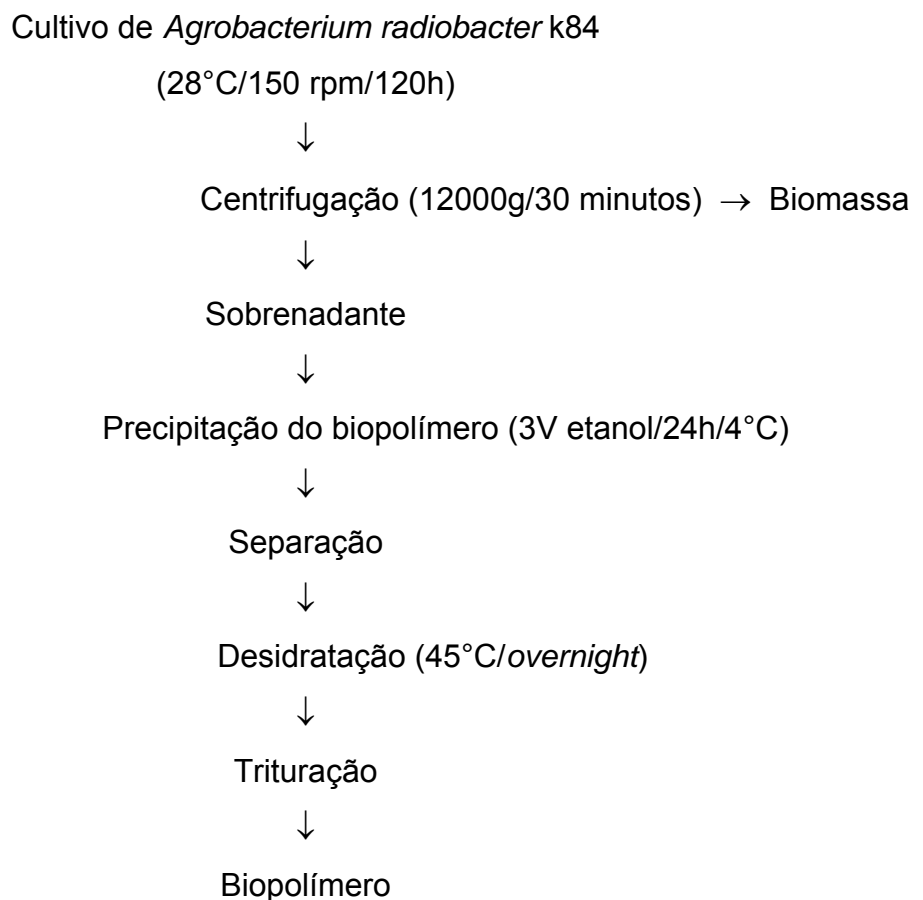
#### 4.1.4 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado pela adição de 10% (v/v) de pré-inóculo ao caldo de cultivo, que foi incubado a 28°C e 150 rpm, durante 24 horas.

#### 4.1.5 Produção do biopolímero

As etapas de produção do biopolímero estão descritas em fluxograma (Figura 1) e detalhadas a seguir. O biopolímero foi produzido a partir do caldo de cultivo em frascos de vidro com capacidade para 3 L, contendo 2 L do caldo adicionado de 10% (v/v) de inóculo e mantido a 28°C e 150 rpm, durante 120 horas. Após esse período, a biomassa foi separada por centrifugação (Eppendorf, Modelo 5804R) a 12000 x g por 30 minutos a 4°C (LEE et al., 1997b) e o biopolímero precipitado do sobrenadante com etanol absoluto frio (3:1, v/v) durante 24 horas a 4°C. O precipitado foi separado utilizando filtro de viscosse (Perfex<sup>®</sup>) colocado sobre peneira de nylon. A biomassa e o biopolímero foram desidratados a 45°C, *overnight*, pesados e triturados até 60 mesh.

O etanol utilizado na etapa de separação foi recuperado em evaporador rotativo (TE 210, Tecnal) a 78°C sob vácuo.



**Figura 1** – Etapas de produção do biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84

#### 4.1.6 Viabilidade bacteriana da biomassa

A biomassa em pó, obtida da produção de biopolímero pela *A. radiobacter* k84, foi avaliada quanto ao crescimento bacteriano. Em 1 mL de água peptonada estéril, adicionou-se 0,01 g de biomassa. Uma alçada da solução de biomassa foi semeada pela técnica de esgotamento do inóculo em superfície, em placa de petri contendo o meio específico para *A. radiobacter* k84 (item 4.1.1). As placas (análise em triplicata) foram incubadas a 28°C durante 48 horas.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO

#### 4.2.1 Análise Microestrutural

Uma fina camada do biopolímero em pó foi colocada sobre a fita de carbono aderida ao *stub*. A deposição com ouro foi realizada com corrente de 40 mA, sob vácuo ( $10^{-1}$  mbar) em metalizador BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater e a amostra analisada por microscopia eletrônica de varredura em equipamento Philips Quanta 200 (FEI) sob tensão de 20 kV, com distância de trabalho de 10,2 mm.

Esta análise foi realizada no Laboratório de Microscopia e Microanálise da UEL.

#### 4.2.2 Principais componentes

A composição centesimal do biopolímero foi determinada utilizando metodologia oficial da *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC, 1995). O conteúdo de carboidratos foi calculado por diferença e confirmado pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

### **4.2.3 Atividade de água**

A atividade de água do biopolímero foi medida em equipamento AQUA LAB CX-2<sup>®</sup>.

### **4.2.4 pH**

Soluções de biopolímero nas concentrações de 1, 5 e 10% foram preparadas por adição sob agitação em água deionizada (previamente fervida) a 25°C e em seguida o pH foi medido com potenciômetro Tecnal Tec-3MP (AOAC, 1995).

### **4.2.5 Composição Mineral**

A amostra de biopolímero (0,4 g) foi digerida em 3 mL de solução nitroperclórica (HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub>, 3:1) a 150°C durante 5 horas. Após diluição, a determinação dos minerais da amostra foi realizada por espectrometria de emissão de plasma (ICP-ICAP 61E, Thermo Jarrel Ash Corporation). A quantificação de Na e K foi determinada em fotômetro de chama (Micronal).

A composição mineral do biopolímero foi determinada no Laboratório de Solos do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR).

## **4.2.6 Carboidratos**

### **4.2.6.1 Monossacarídeos**

O biopolímero foi hidrolisado em HCl 2M (biopolímero:HCl, 1:3) a 105°C por 16 horas e a solução obtida foi filtrada, concentrada em evaporador (Tecnal TE-210), ressuspensa em metanol e conduzida à evaporação. Cromatografia de camada delgada foi aplicada para identificação dos monossacarídeos, utilizando glicose (1mg/mL) como padrão. O eluente utilizado foi clorofórmio:metanol:ácido acético:água [4:4:1:1 (v/v/v/v)]. A revelação foi realizada borrifando solução de anisaldeído:ácido sulfúrico:ácido acético [1:2:100 (v/v/v)] sobre a placa, que foi mantida em estufa a 110°C por 10 minutos para visualização sob luz ultravioleta de onda curta (365 nm) (MOREIRA; SOUZA; VENDRUSCOLO, 1998).

### **4.2.6.2 Fibra alimentar**

Foi realizada a determinação de fibra alimentar total, solúvel e insolúvel do biopolímero pelo método enzimático-gravimétrico n° 985.29 da AOAC (1995), utilizando o kit da Sigma (TDF 100A) e tampão MES-TRIS.

## **4.2.7 Proteínas**

### **4.2.7.1 Proteína solúvel**

Foi determinada pelo método colorimétrico de Lowry et al. (1951), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e albumina de soro bovina como padrão.

#### **4.2.7.2 Peso molecular da fração protéica**

Anteriormente à determinação do peso molecular da fração protéica os minerais do biopolímero foram removidos por diálise contra água destilada durante 4 dias em saco de diálise (MEMBRA-CEL) MC 18 x 100 CLR. O dialisado foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto frio, durante 24 horas a 4°C e desidratado a 40°C durante 12 horas. Uma solução de biopolímero (40 µL) em água bidestilada contendo 50 µg de proteína por mililitro foi analisada quanto ao peso molecular da fração protéica, por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% (LAEMMLI, 1970), revelado em solução de nitrato de prata. O perfil eletroforético obtido foi comparado ao padrão de peso molecular 220-10 kDa (Invitrogen®).

Esta análise foi realizada no Laboratório de Zoonoses, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, UEL.

### **4.3 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS**

#### **4.3.1 Índice de absorção de água (IAA) e índice de solubilidade em água (ISA)**

Uma mistura de 2,5g de biopolímero em 30mL de água deionizada aquecida a 30°C foi homogeneizada em agitador magnético (Corning PC-420D) por 30 minutos e centrifugada a 1500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi mantido a 105°C (estufa Neuoni NV1.5) até secagem completa e o tubo com a amostra foi pesado. O IAA foi obtido pela razão entre o peso do sólido obtido da centrifugação e o peso da amostra e o ISA pela razão entre o resíduo seco e o peso da amostra (ANDERSON et al., 1969).

#### 4.3.2 Índice de absorção de óleo (IAO)

Foi determinado da mesma maneira que o IAA, utilizando óleo de soja comercial em ao invés de água, porém neste caso o sobrenadante foi descartado.

#### 4.3.3 Viscosidade

Soluções de 0,5, 1, 1,5, 2, 5 e 15% (p/v) foram preparadas adicionado o biopolímero à água destilada sob agitação, mantida por 10 minutos, à temperatura ambiente. A viscosidade das soluções foi medida em viscosímetro Brookfield com *spindle* n° 18, a 20 rpm e 25°C.

#### 4.3.4 Formação de gel

Soluções de biopolímero (20 mL) a 1 e 2% (p/v), preparadas conforme descrito acima, foram utilizadas para avaliar a formação de gel quando aquecidas em banho-maria a 60°C por 15 minutos (FUNAMI et al., 1999b) e então mantidas a temperatura ambiente durante 4 horas. A determinação da viscosidade foi realizada em viscosímetro Brookfield com *spindle* n° 18, a 10 rpm e 25°C.

### **4.3.5 Propriedades emulsificantes**

#### **4.3.5.1 Atividade emulsificante**

Uma mistura de 5 mL de água, 5 mL de óleo de soja (Soya®) e 0,5 g de biopolímero foi emulsionada a 9500 x g durante 1 minuto em agitador de haste Heidolf (YAMATSU et al., 1972). A emulsão obtida foi centrifugada (centrífuga Harrier 15/80 MSE) a 2000 x g, a 25°C por 5 minutos e a atividade emulsificante determinada pela razão entre o volume da emulsão e o volume total de solução. Amostra de lecitina de soja comercial (Solec<sup>TM</sup>F, marca SOLAE) foi analisada quanto às propriedades emulsificantes, conforme descrito, para fins de comparação.

#### **4.3.5.2 Estabilidade da emulsão**

A emulsão obtida conforme descrito acima foi mantida em banho-maria a 80°C durante 30 minutos e resfriada em água corrente por 10 minutos. A emulsão foi novamente centrifugada a 2000 x g por 5 minutos e a estabilidade calculada pela razão entre o volume final e o inicial (YAMATSU et al., 1972).

## **4.4 ESTUDO DE TOXICIDADE**

### **4.4.1 Citotoxicidade**

A toxicidade *in vitro* foi avaliada pelo teste MTT (MTT-based kit, stock no. TOX-1, Sigma Chem. Co., USA), que consiste na reação da desidrogenase mitocondrial das células viáveis com o reagente MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil brometo de tetrazólio) e determinação espectrofotométrica da viabilidade

celular. As células de uma linhagem contínua de LLC MK2 (células epiteliais de rim de macaco *Rhesus*) foram ativadas durante 48 horas em microplacas de 96 poços. As soluções teste foram preparadas em DMEM (meio de Eagle modificado por Dubelco) estéril para obter as concentrações de 2,5, 5,0 e 10,0 mg de biopolímero por mililitro de meio de cultivo celular. DMEM puro foi utilizado como controle. Após 72 horas de reação do biopolímero com as células, a substância teste foi removida virando a microplaca sobre papel filtro estéril. Os poços foram lavados com solução tampão fosfato (PBS) estéril e foram adicionados 10  $\mu$ L do reagente MTT para incubação a 37 °C durante 3 horas. Foram adicionados 90  $\mu$ L de iso-propanol acidificado e a microplaca mantida em agitador orbital (FANEM 255B) por 15 minutos. A absorbância foi medida em leitor de ELISA (Universal Microplate Reader EL<sub>x</sub> 800, BIO-TEC) a 490 e 630 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e a concentração citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) calculada pela análise de regressão da curva dose-resposta.

O teste de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, UEL.

#### 4.4.2 Toxicidade oral

As soluções de biopolímero foram preparadas com água destilada estéril à temperatura ambiente sob agitação e mantidas sob refrigeração até o momento do uso.

Vinte e cinco camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, livres de patógenos, com 8 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR e aclimatados durante uma semana a um fotoperíodo de doze horas (12 horas de claro:12 horas de escuro) em caixa de polipropileno, com ração (Nuvilab CR1, Nuvital) e água estéril *ad libitum*.

Os animais foram divididos em cinco grupos de cinco por caixa e identificados com solução de ácido pícrico. As soluções de biopolímero (200  $\mu$ L) a 5, 15, 50 e 150 mg/mL (aproximadamente 25, 75, 250 e 750 mg/kg/dia respectivamente) foram administradas diariamente durante 30 dias por gavagem. O

grupo controle recebeu 200 $\mu$ L de água destilada estéril. Os animais foram pesados antes de iniciar o experimento, semanalmente e ao final do estudo. A ocorrência de mortalidade foi verificada diariamente e o consumo alimentar a cada semana.

Os ensaios de toxicidade oral foram conduzidos no Laboratório de Genética Microbiana, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, UEL.

#### **4.4.2.1 Análise hematológica**

Ao final do experimento (31<sup>o</sup> dia), os animais foram insensibilizados em câmara de éter para a coleta do sangue por punção cardíaca, para as análises: contagem de células vermelhas (RBC), hematócrito (Hmt), concentração de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e contagem diferencial (MALVEZI et al., 2000).

#### **4.4.2.2 Análise histológica**

A necrópsia foi realizada em todos os animais experimentais e os órgãos foram analisados macroscopicamente. Um lóbulo do fígado e o rim esquerdo de cada animal foram removidos para avaliação microscópica. Os órgãos foram fixados em Bouin aquoso, processados, embebidos em paraplast e cortados em micrótomo a 7  $\mu$ m. As lâminas foram preparadas conforme metodologia aplicada para avaliação de cortes histológicos e coradas com hematoxilina-eosina (H-E) (LEESON; LEESON, 1966). A análise histológica dos órgãos foi realizada em um teste cego, por três especialistas do Laboratório de Imunologia IV, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, UEL. Para a análise, foi considerada uma escala de danos de 0 (sem efeito) a 4 (efeito severo) (GERMOLEC et al., 2004). Os cortes foram observados em microscópio óptico (Olympus CH20)

com aumento de 40 vezes. Microfotografias foram capturadas com câmara digital Cânon Power Shot A70 (3.2 Megapixels).

#### 4.5 APLICAÇÃO COMO SUBSTITUTO DE GORDURA EM PRODUTO CÁRNEO À BASE DE FRANGO

Considerando que este trabalho visa à elaboração de um produto cárneo que atenda aos requisitos para fazer parte de dietas de baixa caloria, foi utilizada a carne de frango, que contém mais proteína, menos gordura e menos colesterol que a carne vermelha (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

##### 4.5.1 Formulação de produto cárneo à base de frango

As formulações de produto cárneo à base de frango foram elaboradas utilizando as quantidades de ingredientes descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Formulação dos produtos cárneos à base de frango

Ingredientes (%)	Formulações		
	F0	F5	F10
Peito de frango sem pele	87	87	87
Gordura	10	5	-
Biopolímero	-	5	10
Amido de milho	2	2	2
Sal	0,95	0,95	0,95
Pimenta do reino	0,05	0,05	0,05

A gordura utilizada nas formulações foi extraída de pele de peito de frango. Em frigideira pré-aquecida foram colocados 100 g de pele picada (3,0 x 3,0 cm), a frigideira foi tampada e o processo durou 20 minutos, com a retirada da gordura extraída a cada 5 minutos. A carne de frango congelada foi picada em

cubos de 3,0 cm e triturada em cutter Filizola  $\frac{1}{2}$  CV, a 1730 rpm por 10 segundos. O processamento no cutter foi repetido a cada adição de ingrediente, nesta ordem: 50% do sal, gordura, biopolímero, sal restante, amido, pimenta-do-reino. Os produtos foram moldados com forma plástica para ravióli em formato retangular de dimensões 0,4 x 4,5 x 2,5 cm, embalados em sacos plásticos e armazenados a -10°C durante 20 horas. As amostras foram grelhadas em chapa elétrica Gourmet Sizzler EH-REC13 (ZOJIRUSHI) pré-aquecida a 200°C. Cada amostra permaneceu na chapa elétrica durante 30 segundos de cada lado, totalizando dois minutos.

#### **4.5.2 Principais componentes**

Foram determinados de acordo com o item 4.2.2.

#### **4.5.3 Parâmetros físicos e químicos das formulações**

##### **4.5.3.1 Atividade de água**

As amostras das formulações foram trituradas em liquidificador e a atividade de água medida segundo o item 4.2.3.

##### **4.5.3.2 pH**

As amostras de produto cárneo à base de frango foram trituradas em liquidificador e homogeneizadas (5 g) com 50 mL de água deionizada (previamente fervida) a 25°C, mantendo agitação ocasional durante 30 minutos. As misturas permaneceram em repouso por 10 minutos, quando os sobrenadantes foram

transferidos para béquers limpos. Os valores de pH dos sobrenadantes foram medidos com potenciômetro Tecnal Tec-3MP (AOAC, 1995).

#### **4.5.3.3 Capacidade de retenção de água (CRA)**

Uma porção central da amostra (2g) foi colocada entre dois papéis filtro de 11 cm de diâmetro e entre placas de acrílico de 16 x 16 cm e pressionada por 10 kg durante 5 minutos. A amostra foi pesada novamente e a CRA calculada:  $[100 - (\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial} \times 100]$  (HAMM, 1960).

#### **4.5.3.4 Rendimento de cocção**

Três amostras de cada formulação foram pesadas em balança semi-analítica Mark – Bel Engineering, antes e após serem grelhadas (BERRY, 1992).

#### **4.5.3.5 Análise de textura**

A porção central (1,4 x 4,5 cm) das amostras grelhadas foi retirada para determinação da força de cisalhamento, sendo as dimensões definidas em virtude do formato do probe. A amostra foi posicionada perpendicularmente ao probe HBP/BSW Blade Set With Warner Bratzler acoplado ao texturômetro TA-XT2 (Texture Technologies Corp., Scardale, NY, USA), operando à velocidade de 5 mm/s, distância de 30 mm e força do Tríquer igual a 0,19 N. Foram realizadas seis medições por formulação (GARCÍA-SEGOVIA; ANDRÉS-BELLO; MARTÍNEZ-MONZÓ, 2007).

#### 4.5.4 Análise microestrutural

A análise microestrutural das formulações grelhadas foi realizada segundo Barbut (2006). Uma porção central (0,5 x 1,0 x 0,2 cm) de cada formulação foi retirada, fixada em formalina 10% (v/v) (amostra:solução, 10 g:100 mL) por 10 horas a 20°C, desidratada gradativamente em álcool iso-propílico (70, 95 e 100%, v/v) e diafanizada em xilol absoluto. As peças foram incluídas em parafina e cortadas em micrótomo a 6 µm. As lâminas foram preparadas conforme metodologia aplicada para avaliação de cortes histológicos e coradas com hematoxilina-eosina (H-E) (LEESON; LEESON, 1966). Os cortes foram observados em microscópio óptico (Leica DMLS) com aumento de 100 vezes. Microfotografias foram capturadas por um sistema de análise computadorizado (JVC TK-C1380, software Motic Images Plus 2.0 ML) acoplado ao microscópio.

#### 4.5.5 Análise de cor

Foram tomadas medidas de cor da região central de cinco amostras por formulação, com uma medida de cada lado. As amostras cruas (congeladas) e grelhadas foram analisadas utilizando colorímetro Byk Gardner GmbH, nas condições padrão do aparelho: lâmpada D 65 (luz natural do dia) e a 10° do observador. A coloração das amostras foi detectada de acordo com o sistema CIE (*Commission International l'Eclairage*) e os resultados dados em L\* (luminosidade), a\* (vermelho-verde) e b\* (amarelo-azul).

#### 4.5.6 Avaliação Sensorial

Os provadores não treinados (n = 50) foram solicitados a preencher um questionário a respeito da faixa etária, sexo, escolaridade e hábitos de consumo referentes a produtos similares ao apresentado no teste. Na entrevista, o termo

hambúrguer foi utilizado como referência para facilitar o entendimento pelos provadores, ainda que as formulações não apresentassem todos os atributos característicos de um hambúrguer. Um produto conhecido (hambúrguer) foi utilizado como referência porque, segundo Gil (1996) e Gressler (2004), em questionários de pesquisa as perguntas devem ser formuladas de maneira clara, concreta e precisa, devendo-se levar em consideração o sistema de referência dos entrevistados, bem como o seu nível de informação.

As amostras foram servidas a aproximadamente 60°C em pratos plásticos brancos, codificados com números aleatórios de três dígitos. Cada provador avaliou as três formulações (F0, F5 e F10), apresentadas uma por vez, em ordem aleatorizada. Na figura 2 está apresentada a ficha utilizada na avaliação sensorial, realizada como segue: foi realizado um teste de aceitabilidade com escala hedônica híbrida de dez pontos (VILLANUEVA; PETENATE; DA SILVA, 2005), sendo os resultados dados pela média das notas atribuídas pelos provadores para cada formulação. Simultaneamente ao teste de aceitação, a maciez e o sabor de frango das formulações foram avaliados utilizando a escala do ideal. Os provadores foram também questionados sobre a intenção de compra em relação a cada amostra.

Os resultados obtidos na escala do ideal (*Just Right Scales*) e no questionário de intenção de compra foram calculados pela frequência de respostas assinaladas para cada ponto das escalas (NAGATO et al., 2003).

Nome (opcional): \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra codificada de hambúrguer de frango. Por favor, prove-a e marque com um "X" o local na escala (incluindo entre os pontos) que melhor represente o quanto você desgostou ou gostou da amostra, de uma maneira geral.

Amostra: \_\_\_\_\_

0 ————— 5 ————— 10  
 Desgostei                      Não gostei                      Gostei  
 extremamente                      nem desgostei                      extremamente

Agora, utilizando a escala abaixo, avalie o quão próximo do ideal estão as amostras, em relação à maciez e sabor:

Maciez	Sabor de frango
(+1) mais que o ideal	(+1) mais que o ideal
(0 ) ideal	(0 ) ideal
(-1 ) menos que o ideal	(-1 ) menos que o ideal

Quanto à intenção de compra, avalie as amostras de acordo com a seguinte escala:

- ( 5 ) certamente compraria
- ( 4 )
- ( 3 ) talvez comprasse / talvez não comprasse
- ( 2 )
- ( 1 ) certamente não compraria

**Figura 2** – Ficha utilizada para avaliação sensorial dos produtos cárneos à base de frango

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como médias  $\pm$  o desvio padrão e foram comparados por análise de variância (ANOVA), utilizando o software Statistica 5.0, com significância a  $p \leq 0.05$ . Em caso de diferença significativa, foi realizada a comparação entre médias aplicando o teste Tukey.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

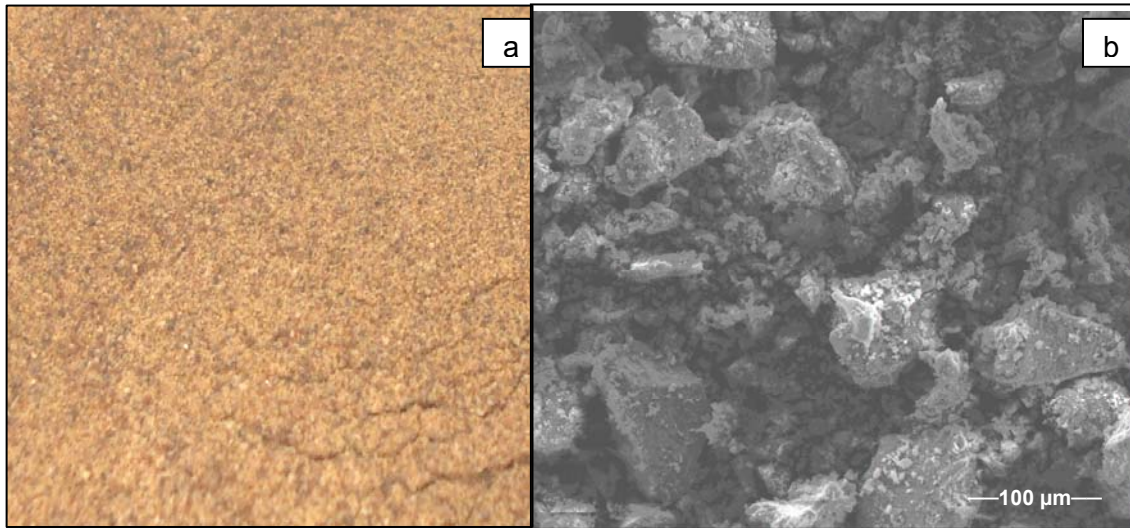
### 5.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO PELA *Agrobacterium radiobacter* k84

A fermentação pela *Agrobacterium radiobacter* k84 de um meio contendo melação de cana-de-açúcar como fonte de carbono, seguida pela precipitação do produto obtido com etanol resultou em aproximadamente 10 g.L<sup>-1</sup> de um novo biopolímero bruto, com aspecto de pó marrom (Figura 3a), composto de 40% de minerais, 35% de carboidratos, 15% de proteína. O teor de umidade (10%) é semelhante ao da goma curdlana (SPICER; GOLDENTHAL; IKEDA, 1999). A produção do biopolímero foi conduzida 3 vezes, sem apresentar diferença significativa no rendimento e na composição do produto obtido.

Aproximadamente 3 g.L<sup>-1</sup> de biomassa ativa foram recuperados do caldo de cultivo após a produção do biopolímero. Esse subproduto da obtenção do biopolímero apresenta aplicação potencial na área agrônômica, no combate à doença da galha da coroa (PENALVER et al., 1994; STOCKWELL; MOORE; LOPER, 1993).

Em solução aquosa a 1%, o biopolímero apresentou pH 7,0, assim como a goma curdlana (SPICER; GOLDENTHAL; IKEDA, 1999). A atividade de água de 0,525 representa a estabilidade do biopolímero a uma série de reações (AGUILERA; STANLEY, 1990) e à contaminação microbiana, já que 0,61 é atividade de água mínima para haver algum crescimento microbiano (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

### 5.1.1 Microestrutura



**Figura 3** – Imagens do biopolímero produzido pela *Agrobacterium radiobacter* k84: (a) observado a olho nu; (b) observado em microscópio eletrônico de varredura com aumento de 300 x.

Na micrografia do biopolímero (Figura 3b) pode-se observar partículas de formas irregulares e tamanhos extremamente variáveis, estando as partículas menores tanto aderidas como não aderidas à superfície das de maior dimensão. Este tipo de estrutura é definido como uma “mistura parcialmente randomizada” (*partially random mixture*), caracterizada pela interação parcial entre as partículas de tamanhos diferentes (BARBOSA-CANOVAS; RUFNER; PELEG, 1985).

De acordo com Cano-Chauca et al. (2005), a aderência das partículas menores em torno das maiores, demonstrada pelo biopolímero (Figura 3b), indica a ausência de superfícies cristalinas e é característica de compostos amorfos. A presença dessas superfícies amorfas se traduz em alta solubilidade do pó em água (CANO-CHAUCA et al., 2005; YU, 2001) e em maior velocidade de dissolução, em comparação a compostos no estado cristalino (YU, 2001).

### 5.1.2 Composição Mineral

Na Tabela 2 estão os resultados da análise de minerais do biopolímero, bem como a Ingestão Dietética Recomendada (IDR) e o Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL), estabelecidos para cada mineral.

**Tabela 2** – Composição mineral de 1 grama do biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84, Ingestão Dietética Recomendada (IDR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) dos minerais.

Mineral	Biopolímero (mg/g)	Ingestão dietética recomendada <sup>1</sup> (mg/dia)	Limite superior tolerável de ingestão <sup>2</sup> (mg/dia)
Macroelementos			
K	200	4700*	ND
P	8	700	4000
Ca	7	1000 *	2500
Mg	6	320	350
Na	1,2	1500 *	2300
Microelementos			
Fe	0,6	18	45
Mn	0,2	1,8 *	11
Zn	0,06	8 (mulher); 11(homem)	40
Pb	0,014	ND	ND
Cu	0,01	0,9	10
Cd	0,01	ND	ND
Cr	0,007	0,025 *	ND
Co	0,004	ND	ND
Ni	0,002	ND	1
Mo	0,002	0,045	2

<sup>1</sup>Ingestão Dietética Recomendada (IDR) para indivíduos de 19 a 50 anos.

<sup>2</sup>Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL – *upper limit*) para indivíduos de 19 a 70 anos.

\* Ingestão adequada (AI – *adequate intakes*)

ND = Não determinável devido à falta de dados sobre efeitos adversos ou à baixa probabilidade de consumo excessivo.

(OTTEN; HELLWIG; MEYERS, 2006)

Para os microelementos chumbo e cádmio não há funções essenciais estabelecidas e, dependendo da dose, esses minerais têm relação com efeito tóxico por serem metais pesados (MAIHARA; FÁVARO, 2005).

A ingestão máxima tolerável semanal (PTWI – *provisional tolerable weekly intake*) prevista para o chumbo é de 25 µg/kg de peso corpóreo, de acordo com o JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*, órgão da FAO/WHO). Em carnes, o *Codex Alimentarius* estabelece 0,5 mg/kg como o limite máximo para a presença de chumbo (MAIHARA; FÁVARO, 2005) e em água, a ANVISA prevê esse limite como 0,01 mg/L (ANVISA, 2004).

Para o cádmio a PTWI é de 7 µg/kg de peso corpóreo, de acordo com o JECFA. Segundo o Decreto nº. 55871 de 26/03/1995 da legislação brasileira, o limite máximo para o cádmio é igual a 1 mg/kg de alimento (MAIHARA; FÁVARO, 2005) e em água esse limite é de 0,005 mg/L (ANVISA, 2004).

A goma curdlana contém sais inorgânicos (principalmente NaCl) em pequena quantidade e metais pesados na proporção de 0,02 mg/g (SPICER; GOLDENTHAL; IKEDA, 1999) e é um exemplo de biopolímero de *A. radiobacter* utilizado em alimentos há pouco mais de uma década sem apresentar efeitos adversos à saúde.

Valores de referência para a ingestão do cobalto não foram estabelecidos por não haver relato de eventos associados a efeitos tóxicos, devido à presença deste elemento na dieta em quantidades que não causam tais efeitos (FRANCO, 1996).

Considerando que os minerais apresentam funções essenciais no organismo humano, como regular a atividade enzimática, facilitar a transferência de compostos essenciais através da membrana celular e manter o equilíbrio ácido-base e a pressão osmótica (CZAJKA-NARRINS, 1998), o conteúdo de minerais do biopolímero pode contribuir com a saúde. Além disso, os minerais apresentam funcionalidade tecnológica resultante de interações com os componentes dos sistemas alimentares, o que justifica a adição em alimentos (NABRZYSKI, 2002, SIKORSKI, 2002).

### 5.1.3 Carboidratos

A caracterização da composição de monossacarídeos por cromatografia de camada delgada demonstrou que a fração de carboidrato do

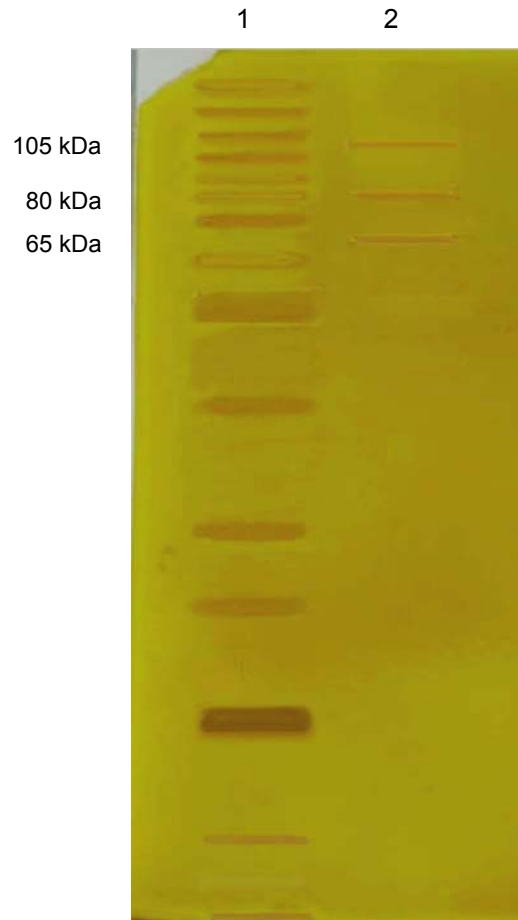
biopolímero é composta exclusivamente por resíduos de glicose (Rf 0,43). A determinação de fibra alimentar indicou que a fração de carboidratos do biopolímero é constituída de fibra solúvel. A goma curdlana apresenta a mesma composição monossacarídica, porém é insolúvel (HARADA; MISAKI; SAITO, 1968) e a succinoglucana é um heteropolímero solúvel (DUSSAP; DE VITA; PONS, 1991). A partir disso, verifica-se que o biopolímero obtido se trata de um novo ingrediente.

A fração de carboidratos do biopolímero, sendo uma fibra solúvel composta por unidades de glicose, sugere relação com benefícios à saúde, considerando que a maioria dos polissacarídeos de interesse nutricional são polímeros de glicose (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998a) e que as fibras solúveis são conhecidas por manter o funcionamento normal do trato gastrointestinal, reduzindo os níveis de colesterol sérico (BEMILLER; WHISTLER, 1996). Já que as fibras solúveis apresentam propriedades tais como a habilidade de reter água e de formar géis (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998a), é plausível considerar aplicações tecnológicas do biopolímero.

#### **5.1.4 Proteínas**

O perfil eletroforético de peso molecular do biopolímero revelou proteínas de 65 kDa, 80 kDa e 105 kDa (Figura 4).

Segundo Rosenberg e Ron (1999), proteínas de baixo peso molecular atuam na diminuição da tensão interfacial, enquanto aquelas de alto peso molecular são mais eficazes na estabilização de emulsões óleo/água, pelo efeito no aumento da viscosidade (SHEPHERD et al., 1995). Quanto ao peso molecular, um tamanho mínimo para a proteína é requerido para que haja interação eletrostática (POOLE; WEST; FRY, 1987; POOLE; WEST; WALTERS, 1984), condição para que um composto apresente certas propriedades, como a de formar gel (FENG; HULTIN, 2001).



**Figura 4** – Perfil eletroforético do biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 em poliacrilamida (SDS-PAGE), corado com nitrato de prata  
1 = Padrão de peso molecular (Invitrogen®) – 10-220 kDa  
2 = Biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 (50 µg de proteína/mL)

## 5.2 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS

A importância de caracterizar as propriedades tecnológicas de um biopolímero de origem microbiana, como é o caso do produto em questão neste trabalho, além de prever as possibilidades de aplicação, reside na escassez de dados de parâmetros tecnológicos a respeito deste tipo de ingrediente. Portanto, foram avaliadas as características de solubilidade em água, absorção de água e de óleo, viscosidade, formação de gel e propriedades emulsificantes do biopolímero, objeto deste estudo.

### 5.2.1 Índice de solubilidade em água (ISA)

O biopolímero apresentou ISA de  $68,59 \pm 3,17\%$ , o que indica alta solubilidade, já que um composto com ISA superior a 50% é classificado como altamente solúvel (CHEL-GUERRERO et al., 2002). Esse parâmetro apresentado pelo biopolímero está relacionado com seu estado amorfo, elucidado a partir da análise microestrutural (figura 3b) do composto.

A goma curdlana é insolúvel, formando suspensão quando misturada à água (JEZEQUEL, 1998). O valor obtido para o biopolímero está entre os índices de solubilidade em água de ingredientes utilizados como substitutos de gordura: 60% para a goma xantana (SCIARINI et al., 2008), 75% para FOS e 80% no caso da povidona (DEIS, 1994).

Essa comparação sugere a possibilidade de aplicação do biopolímero em substituição à gordura. O ISA do biopolímero é um indicador de propriedades emulsificantes, considerando que a relação entre esses parâmetros foi proposta por Kanterewicz et al. (1987) e Kinsella (1976). Além disso, compostos com alta absorção de água são utilizados como agentes de volume (PENNA, 2002).

### 5.2.2 Índice de absorção de água (IAA) e de óleo (IAO)

O biopolímero produzido pela *Agrobacterium radiobacter* k84 apresentou  $83,3 \pm 1,95\%$  de absorção de água e  $190,76 \pm 9,63\%$  de absorção de óleo, o que indica propriedade lipofílica superior à hidrofílica.

Esses índices são amplamente estudados e relacionados à fração protéica dos ingredientes. Por exemplo, um isolado protéico de soja apresentou IAA de 265% e IAO de 103% (SOSULSKI; McCRUDY, 1987), enquanto esses índices para concentrado protéico de soro de leite foram IAA de 20% e IAO de 97% (ELIZALDE; PILOSOFF; BARTOLOMAI, 1991) e para concentrado protéico de feijão, IAA de 271,73% e IAO de 220,91% (DONADEL; PRUDENCIO-FERREIRA, 1999). No caso da goma curdlana, em condições ótimas apresenta IAA de 100% (JEZEQUEL, 1998).

O resultado de IAA do biopolímero sugere aplicação como substituto de gordura, já que a habilidade de um ingrediente em manter a água no sistema alimentar (JEZEQUEL, 1998; RUITER; VORAGEN, 2002) resulta em solução ou suspensão viscosa que imita a palatabilidade da gordura e é eficaz na manutenção da estabilidade do produto durante a armazenagem (FUNAMI; YADA; NAKAO, 1998).

Em proteínas, as características de absorção de água e de óleo, mais que a solubilidade, determinam a habilidade em estabilizar emulsões (ELIZALDE et al., 1988), pela influência na espessura da camada interfacial que previne a coalescência dos glóbulos de gordura (ELIZALDE et al., 1988; KANTEREWICZ et al., 1987). O índice de absorção água-óleo (IAAO), ou balanço hidrofílico-lipofílico é considerado como o melhor indicador para predizer as propriedades emulsificantes de proteínas (ELIZALDE et al., 1988; KANTEREWICZ et al., 1987) e é obtido pela razão entre o IAA e IAO. O biopolímero obtido apresentou IAAO de 0,44 que, segundo Kanterewicz et al. (1987), corresponde à atividade emulsificante limitada, já que o valor 2 corresponde à máxima atuação na formação de emulsões.

### 5.2.3 Viscosidade

Os resultados de viscosidade das soluções do biopolímero estão na tabela 3.

**Tabela 3** – Viscosidade das soluções de biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 (*Spindle* n° 18, 20 rpm, 25°C)

Concentração de biopolímero (% p/v)	Viscosidade (Cp)
0,5	31,75 <sup>a</sup> ± 2,47
1	32,10 <sup>a</sup> ± 1,27
1,5	34,75 <sup>ab</sup> ± 1,76
2	38,55 <sup>bc</sup> ± 1,63
5	41,3 <sup>c</sup> ± 0,99
15	114,25 <sup>d</sup> ± 0,78

Valores são médias ± desvio padrão dos resultados, em duplicatas. Médias acompanhadas de letra diferente apresentam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ )

Observou-se que o biopolímero tem a propriedade de formar soluções viscosas quando dissolvido em água à temperatura ambiente e que a viscosidade aumenta com a concentração (Tabela 3). Esta conduta é típica de polímeros lineares que apresentam grupos carregados e é resultante da maior interação entre as cadeias do polímero quando a concentração aumenta (PENNA, 2002). A habilidade do biopolímero em formar soluções viscosas está de acordo com sua característica de alta absorção de água (item 5.2.2), parâmetros correlacionados por Funami, Yada e Nakao (1998). Além disso, essa habilidade aponta para a propriedade de estabilizar emulsões, relacionada ao efeito do aumento da viscosidade na diminuição da colisão entre as gotículas (BECHER, 1965; ELIZALDE et al., 1988; KANTEREWICZ et al., 1987; PETROWSKI, 1976).

A goma curdlana não forma suspensões uniformes em concentração inferior a 2%, devido à precipitação das partículas em virtude da baixa viscosidade da suspensão, e tampouco em concentração superior a 10%, devido à hidratação insuficiente da goma (FUNAMI et al., 1999b).

#### **5.2.4 Formação de gel**

Na concentração de 1% em solução aquosa o biopolímero não formou gel sob aquecimento (60°C/15 minutos). Quando em solução aquosa a 2%, aquecida sob as mesmas condições, o biopolímero formou gel com viscosidade de  $230,10 \pm 2,05$  Cp (*Spindle* n° 18, 10 rpm, 25°C), que é comparável com suspensão de curdlana (FUNNAMI et al., 1999a), conhecida como agente geleificante (PSZCZOLA, 1997).

A capacidade de formação de gel pelo biopolímero pode ser atribuída à composição em polissacarídeo e proteínas, por serem macromoléculas que normalmente apresentam atividade geleificante (RUITER; VORAGEN, 2002; SIKORSKI, 2002; SUTHERLAND, 2001) e favorecida pela composição mineral, devido à presença de íons divalentes que aumentam as interações eletrostáticas, necessárias à geleificação (FENG; HULTIN, 2001; SIKORSKI, 2002; WARD; ANDON, 2002).

### 5.2.5 Propriedades emulsificantes

Além de contemplar a atividade emulsificante (AE), que é habilidade de diminuir a tensão interfacial entre água e óleo em uma emulsão, as propriedades emulsificantes envolvem a estabilidade da emulsão (EE) formada (KANTEREWICZ et al., 1987).

Quanto às propriedades emulsificantes, o biopolímero apresentou  $56,11 \pm 0,78\%$  de atividade emulsificante e  $98,02 \pm 1,39\%$  de estabilidade da emulsão, enquanto a lecitina de soja comercial, analisada para fins de comparação, apresentou AE de  $72,78 \pm 0,55\%$  e EE igual a  $99,62 \pm 0,54\%$ . Embora a atividade emulsificante do biopolímero seja expressivamente inferior à da lecitina, ambos apresentaram valores elevados e próximos para a estabilidade da emulsão, iniciando efeito estabilizante.

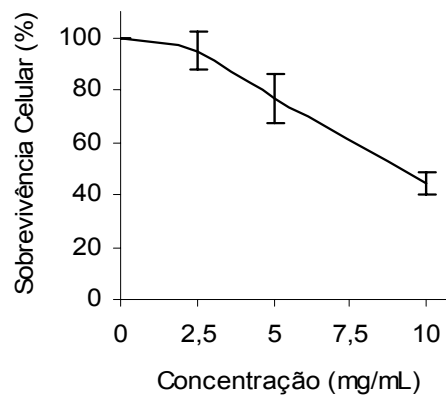
Pode-se considerar a fração protéica do biopolímero como responsável pela atividade emulsificante e a fração de carboidrato como estabilizante da emulsão, de acordo com o observado por Barriga et al. (1999), acerca de compostos bioemulsificantes. Considerando que a atividade emulsificante é favorecida pela presença de cátions divalentes (ROSENBERG; RON, 1999), pode-se inferir que o conteúdo de minerais do biopolímero também teve efeito nessa propriedade.

### 5.3 ESTUDO DE TOXICIDADE

O estudo toxicológico do novo biopolímero bruto produzido pela *Agrobacterium radiobacter* k84 e proposto como ingrediente alimentar é essencial como uma questão de segurança alimentar, portanto, a toxicidade celular bem como a toxicidade oral foram avaliadas.

### 5.3.1 Citotoxicidade

O biopolímero causou decréscimo dose-dependente na proliferação de células LLC MK<sub>2</sub> após 72 horas de exposição (Figura 5). O tratamento com 2,5 mg de biopolímero /mL de meio de cultivo celular, reduziu a proliferação celular em 5% em comparação aos controles. A concentração de 5,0 mg/mL, 23,48% das células morreram, e quando 10,0 mg/mL foram aplicados, a perda de viabilidade celular foi de 55,91%.



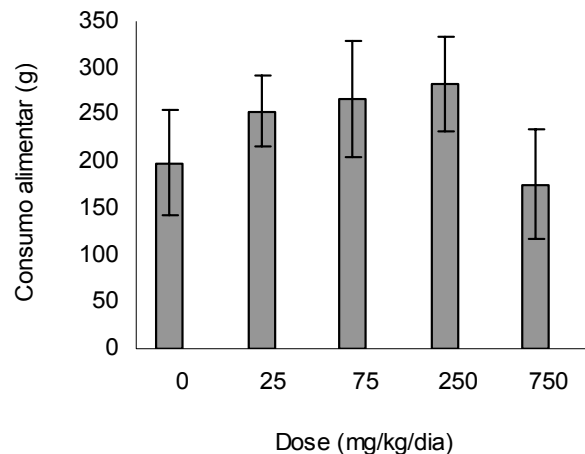
**Figura 5** – Efeito citotóxico do biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 em células LLC MK<sub>2</sub>, determinado pelo teste MTT. Resultados são médias de triplicatas  $\pm$  o desvio padrão.

A curva dose-resposta (Figura 5) obtida do teste de citotoxicidade pelo método MTT evidencia que 9,32 mg/mL de biopolímero no meio de cultivo celular torna inviáveis 50 % das células de epitélio de rim de macaco *Rhesus*, após 72 horas de reação. Charles et al. (2002) encontraram valores semelhantes para a concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) de extratos vegetais (alho, canela e gengibre) em células e reportaram esses resultados como o início de uma base de dados útil ao desenvolvimento de métodos para definir a toxicidade comparativa de alimentos, sem indicação de que esses alimentos sejam inerentemente tóxicos. Extrato de ginko biloba, amplamente utilizado como fitoterápico, apresentou CI<sub>50</sub> de 1,48 mg/mL em cultivo de células LLC MK<sub>2</sub>, após 48 horas (HECKER et al., 2002). A comparação entre os resultados de citotoxicidade do biopolímero e dos extratos vegetais

mencionados é um indício de que a toxicidade celular do biopolímero não representa risco à saúde.

### 5.3.2 Toxicidade oral

Todos os animais sobreviveram até o final do experimento. O consumo alimentar (Figura 6) e o ganho de peso corpóreo (Tabela 4) em todas as concentrações de biopolímero testadas não apresentaram diferença significativa entre si nem em comparação aos valores verificados no grupo controle. Esses resultados significam ausência de efeito do biopolímero sobre os parâmetros avaliados.



**Figura 6** – Consumo alimentar semanal médio (g) por grupo de camundongos Swiss tratados por gavagem com o biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84, durante 30 dias.

Na Tabela 4 estão os pesos dos animais utilizados no estudo de toxicidade oral do biopolímero.

**Tabela 4** – Peso corporal (média semanal, em gramas) dos camundongos Swiss tratados por gavagem com o biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84, durante 30 dias.

Dia	Dose (mg/kg/dia)				
	0	25	75	250	750
Início (Dia 0)	35,51 ± 3,1	38,84 ± 1,6	39,12 ± 4,9	39,36 ± 1,5	34,22 ± 4,1
7	36,40 ± 2,4	37,30 ± 2,8	38,66 ± 2,8	40,20 ± 1,7	32,82 ± 5,1
14	38,94 ± 2,7	41,62 ± 1,2	42,26 ± 3,6	44,20 ± 3,3	36,08 ± 3,5
21	40,30 ± 2,4	42,90 ± 1,5	44,12 ± 4,7	45,90 ± 4,1	39,42 ± 3,5
30	40,88 ± 2,8	44,32 ± 1,6	44,08 ± 5,1	45,04 ± 4,2	41,44 ± 3,9

Valores são medias ± D.P. por grupos de 5 animais

### 5.3.2.1 Parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos (Tabelas 5 e 6) dos animais de todos os grupos tratados foram considerados normais, pois, além de não apresentarem diferença em relação ao grupo controle, coincidem com os parâmetros hematológicos considerados normais para camundongos Swiss, determinados por Malvezi et al. (2000).

**Tabela 5** – Parâmetros hematológicos dos camundongos Swiss tratados por gavagem com o biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84, durante 30 dias.

Parâmetro	Dose (mg/kg/dia)				
	0	25	75	250	750
Hemácias (milhões/ mm <sup>3</sup> )	9,1 ± 0,4	7,6 ± 0,4	6,3 ± 0,9	6,8 ± 1,5	8,5 ± 0,4
Hemoglobina (g/dL)*	13,4 ± 2,2	13,1 ± 1,4	13,3 ± 1,0	15,0 ± 2,0	18,0 ± 3,5
Hematócrito (%)*	49,5 ± 5,5	51,0 ± 7,0	49,3 ± 3,7	47,3 ± 4,1	46,5 ± 2,4
Volume corpuscular médio (μ <sup>3</sup> )	50,8 ± 2,4	70,2 ± 11,5	74,6 ± 7,5	73,9 ± 11,5	52,9 ± 2,6
Hemoglobina corpuscular média (pg)	17,2 ± 1,3	17,8 ± 1,2	21,2 ± 5,0	20,8 ± 3,8	21,6 ± 8,0
Concentração hemoglobina corpuscular média (%)	28,0 ± 6,1	27,0 ± 4,6	27,0 ± 3,2	31,0 ± 3,1	39,0 ± 9,7

Médias ± D.P. de valores de 2 animais por grupo

\*Médias ± D.P. de valores de 5 animais por grupo

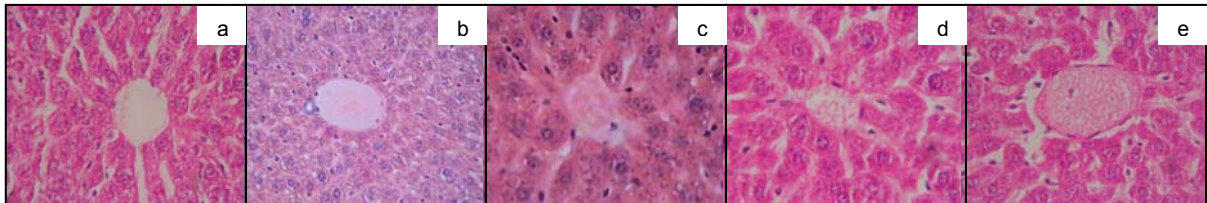
**Tabela 6** – Contagem diferencial de células sanguíneas dos camundongos Swiss tratados por gavagem com o biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84, durante 30 dias.

Parâmetro	Dose (mg/kg/dia)				
	0	25	75	250	750
Neutrófilos (%)	11,0 ± 2,8	13,0 ± 6,3	11,2 ± 5,1	13,6 ± 8,9	14,8 ± 9,9
Linfócitos (%)	83,6 ± 2,9	81,0 ± 7,4	83,0 ± 5,0	80,6 ± 9,2	80,0 ± 8,9
Monócitos (%)	4,6 ± 1,9	4,8 ± 1,5	4,2 ± 1,8	4,4 ± 1,7	4,2 ± 1,6
Eosinófilos (%)	0,8 ± 1,1	1,3 ± 0,9	1,6 ± 0,9	1,4 ± 1,1	1,3 ± 1,3

Valores são medias ± D.P. por grupos de 5 animais

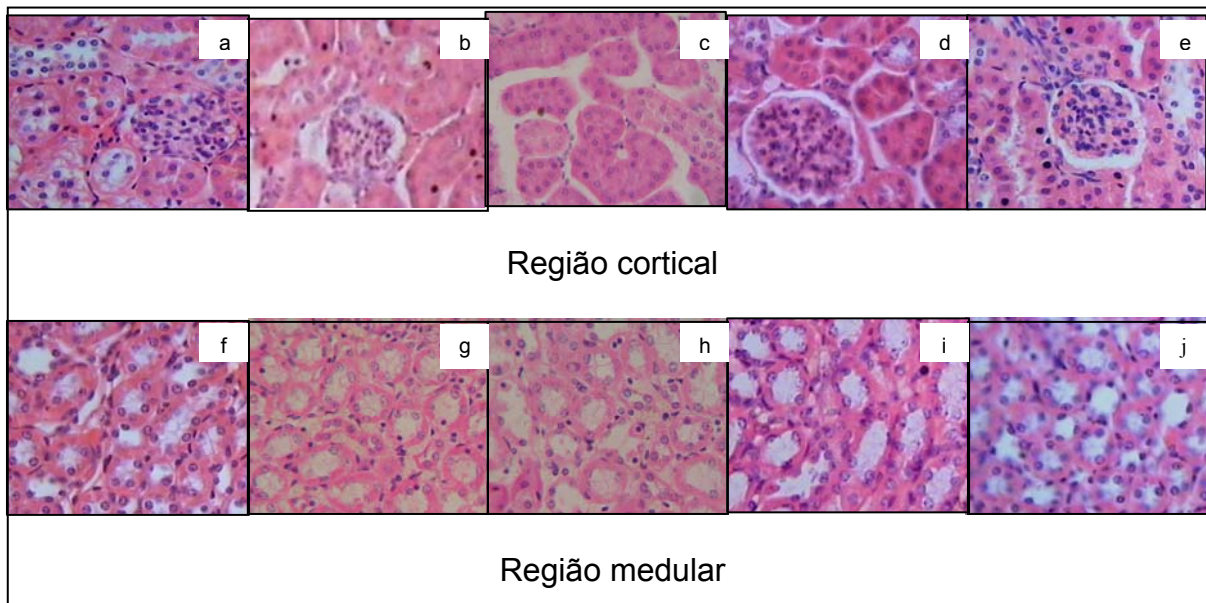
### 5.3.2.2 Parâmetros histológicos

Na necrópsia, os órgãos dos animais experimentais não apresentaram alterações macroscópicas e a análise por microscopia óptica (Figuras 7 e 8) não revelou diferenças entre os órgãos dos animais dos grupos teste e do grupo controle, o que indica a potencial inocuidade do biopolímero.



**Figura 7** – Micrografias da região centro lobular dos fígados dos camundongos Swiss tratados por gavagem com o biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84, durante 30 dias: (a) controle; (b) 25 mg/kg/dia; (c) 75 mg/kg/dia; (d) 250 mg/kg/dia; (e) 750 mg/kg/dia. Coloração H-E. Aumento de 40 x, em microscópio óptico.

Os animais tratados com o biopolímero apresentaram constituição hepática (Figuras 7b a 7e) semelhante à apresentada pelos animais do grupo controle (Figura 7a), com os hepatócitos nucleados e sem alterações morfológicas, dispostos em torno do vaso centro lobular, também com a estrutura intacta.



**Figura 8** – Micrografias dos rins dos camundongos Swiss tratados por gavagem com o biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 durante 30 dias: (a)(f) controle; (b)(g) 25 mg/kg/dia; (c)(h) 75 mg/kg/dia; (d)(i) 250 mg/kg/dia; (e)(j) 750 mg/kg/dia. Coloração H-E. Aumento de 40 x, em microscópio óptico.

Nos rins dos animais tratados com o biopolímero (Figuras 8b-8e; 8g-8j) pode-se identificar estruturas comparáveis às observadas nos órgãos do grupo controle (Figuras 8a e 8f): na região cortical (Figuras 8b a 8e) aparecem os glomérulos (estruturas maiores) íntegros, assim como os túbulos e na região medular (Figuras 8g a 8j) estão os ductos coletores, também inalterados.

A ausência de efeitos negativos do biopolímero sobre o consumo alimentar, peso corporal, parâmetros hematológicos e histologia dos órgãos, indica que, nas condições experimentais, o composto é seguro ao organismo de camundongos. A partir da NOAEL de 150 mg/mL (aproximadamente 750 mg/kg/dia), definida no estudo de toxicidade oral, pode-se calcular a ingestão diária aceitável (ADI – *acceptable daily intake* = NOAEL/100) como 7,5 mg/kg/dia (NESTMANN; LYNCHA, 2007; VETTORAZZI, 1977). Para um adulto de 70 kg, essa dose (ADI) seria igual a 525 mg/dia, o que limitaria a quantidade de biopolímero utilizada em alimentos. Para contornar essa limitação, se fazem necessários testes *in vivo* com doses superiores às praticadas neste experimento, já que no estudo de toxicidade oral do biopolímero, a dose máxima administrada (solução a 15%, para resultar na concentração de 150 mg/mL ou dose de 725 mg/kg/dia) resultou na formação de

uma pasta, que dificultou deveras a administração por gavagem. Por outro lado, de acordo com Eisenbrand et al. (2002), a ausência de efeitos tóxicos no organismo de camundongos representa uma perspectiva favorável à utilização do biopolímero em alimentos, considerando que a correlação entre a toxicidade de um composto em animais e humanos está em torno de 70 a 80%. Sob esse ponto de vista, a ingestão de até 600 mg/kg/dia do biopolímero, seria considerada como segura.

A respeito da correlação entre os resultados da citotoxicidade e da toxicidade oral obtidos, é importante considerar que os estudos *in vitro* auxiliam a descrever o efeito das substâncias sobre as células, mas não podem determinar a magnitude do risco apresentado para animais ou humanos (BRENT, 2004; CHARLES et al., 2002), pois em muitos casos, sistemas *in vitro* reagem de maneira diferente do tecido animal *in vivo* (TIMBRELL, 2002). A extrapolação *in vitro* para *in vivo* em testes com misturas, como é o caso do biopolímero, é ainda mais complicada devido à biodisponibilidade variável dos constituintes e à possibilidade de interações entre eles (AUFDERHEIDE, 2008; NIELSEN, 2008). É importante salientar que a correlação da toxicidade *in vivo* / *in vitro* ainda não está totalmente elucidada (UKELIS et al., 2008).

Os resultados dos estudos de toxicidade do biopolímero corroboram com o descrito na literatura: a *A. radiobacter* k84 foi registrada em 1979 como agente de controle da galha da coroa, sem registros subseqüentes de efeitos prejudiciais ao ambiente e a espécies vivas (EPA, 2005) e não existe ocorrência de efeitos adversos relacionados à ingestão de curdlana e succinoglucana, produzidas pela bactéria.

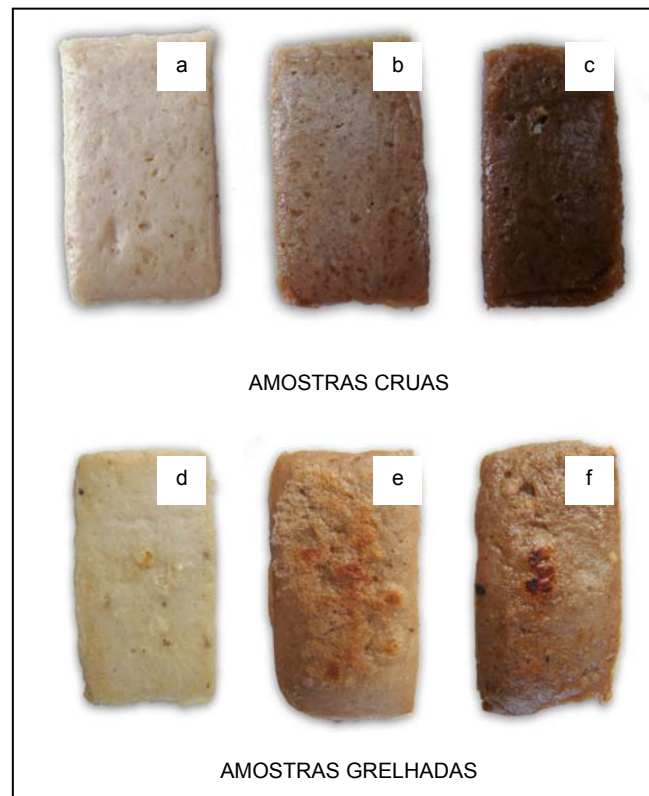
Em estudo realizado por Primo (2008), o biopolímero (obtido conforme item 4.1), quando administrado por gavagem a camundongos Swiss nas concentrações de 75, 150 e 300 mg/Kg de peso corpóreo foi avaliado por ensaios do micronúcleo em sangue periférico. O biopolímero apresentou efeito antimutagênico, com significativa redução de danos, enquanto mutagenicidade não foi observada nas concentrações testadas, o que vai ao encontro dos resultados dos estudos de toxicidade realizados, quanto à ausência de efeitos nocivos.

Como os biopolímeros de origem microbiana para uso como ingredientes em alimentos não são produzidos industrialmente no Brasil, não há uma legislação nacional específica acerca dessa categoria de produtos. Quanto à regulamentação de um novo ingrediente alimentar, em relação à toxicidade, a

ANVISA estabeleceu em 1965 que o ingrediente deve ser seguro para alimentação humana (ANVISA, 2003b). Referente ao assunto, o órgão internacional *Food and Drug Administration* (FDA) atualizou em 2007 os Princípios Toxicológicos para Determinação de Inocuidade de Ingredientes de Alimentos e, no caso de ingredientes de origem microbiana, requer que o microrganismo seja seguro e que sejam seguidas as normas estabelecidas para ingredientes em geral, podendo os cientistas do órgão estipular requisitos específicos. Para a obtenção de registro de um novo ingrediente, o FDA exige testes *in vitro*, seguidos de experimentos com roedores, com animais não roedores e com humanos (FDA, 2007).

#### **5.4 APLICAÇÃO COMO SUBSTITUTO DE GORDURA EM PRODUTO CÁRNEO À BASE DE FRANGO (SISTEMA ALIMENTAR MODELO)**

Na figura 9 pode-se observar o aspecto das formulações cruas e grelhadas do produto cárneo à base de frango. As diferenças de cor entre as formulações se devem ao fato de o biopolímero apresentar cor marrom pelo uso de melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para a produção pela *Agrobacterium radiobacter* K84. Pode-se apreciar que houve aumento na intensidade da coloração da formulação F0 quando esta foi grelhada e que houve efeito contrário no caso de F0 e F5, contendo o substituto de gordura.



**Figura 9** – Aparência das formulações de produto cárneo à base de frango, cruas e grelhadas: (a)(d) F0 = formulação com 10% de gordura; (b)(e) F5 = formulação com 5% de gordura e 5% de biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84; (c)(f) F10 = formulação com 10% de biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84.

#### 5.4.1 Principais componentes

Na tabela 7 estão os resultados, em porcentagem, dos principais componentes de cada formulação de produto cárneo à base de frango.

**Tabela 7** – Principais componentes das formulações de produto cárneo à base de frango

Parâmetro (%)	Formulação		
	F0	F5	F10
Umidade	60,06 <sup>a</sup> ± 0,21	59,25 <sup>a</sup> ± 0,35	62,63 <sup>b</sup> ± 0,33
Cinzas	2,03 <sup>a</sup> ± 0,04	2,96 <sup>b</sup> ± 0,12	3,69 <sup>c</sup> ± 0,20
Proteína	24,15 <sup>a</sup> ± 0,59	24,54 <sup>a</sup> ± 0,60	23,46 <sup>a</sup> ± 0,99
Lipídios	4,23 <sup>a</sup> ± 0,05	2,83 <sup>b</sup> ± 0,11	0,11 <sup>c</sup> ± 0,03

Valores são médias ± desvio padrão dos resultados de duplicatas, em base úmida.

Médias na mesma linha acompanhadas de letra diferente apresentam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ )

F0 = formulação com 10% de gordura;

F5 = formulação com 5% de gordura e 5% de biopolímero;

F10 = formulação com 10% de biopolímero.

O teor de umidade foi semelhante nas formulações F0 e F5 e maior na formulação F10, supostamente devido à capacidade de absorção de água do biopolímero, propriedade comum aos substitutos de gordura (BERRY, 1992). A quantidade de minerais das formulações foi proporcional à substituição da gordura, devido à composição do biopolímero, o que representa contribuição com o aporte de minerais da dieta, considerando a composição mineral (Tabela 2). As formulações não apresentaram diferença significativa no teor de proteínas. O teor de lipídios nas formulações com o biopolímero significou uma redução de 33,4% e 97,4%, respectivamente, para as formulações com 5% e 10% de substituição da gordura, contribuindo com as características nutricionais dos produtos.

#### 5.4.2 Parâmetros físicos e químicos das formulações de produto cárneo à base de frango

Os resultados de pH, atividade de água (Aw), capacidade de retenção de água (CRA), rendimento de cocção, bem como da análise de textura das formulações, estão na tabela 8.

**Tabela 8** – Parâmetros físicos e químicos das formulações de produto cárneo à base de frango

Parâmetro	F0	F5	F10
pH	6,39 <sup>a</sup> ± 0,02	6,75 <sup>b</sup> ± 0,01	6,64 <sup>c</sup> ± 0,01
Aw	0,978 <sup>a</sup> ± 0,00	0,970 <sup>a</sup> ± 0,00	0,972 <sup>a</sup> ± 0,01
CRA (%)	94,56 <sup>a</sup> ± 1,98	96,58 <sup>a</sup> ± 0,99	96,49 <sup>a</sup> ± 0,82
Rendimento de cocção (%)	77,00 <sup>a</sup> ± 7,07	84,67 <sup>a</sup> ± 0,82	82,29 <sup>a</sup> ± 1,34
Força de cisalhamento (N)*	12,15 <sup>a</sup> ± 2,95	11,30 <sup>a</sup> ± 1,93	12,58 <sup>a</sup> ± 1,11

Valores são médias ± desvio padrão dos resultados, em triplicatas.

\*Médias de seis repetições.

Médias na mesma linha acompanhadas de letra diferente apresentam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ )

F0 = formulação com 10% de gordura;

F5 = formulação com 5% de gordura e 5% de biopolímero;

F10 = formulação com 10% de biopolímero.

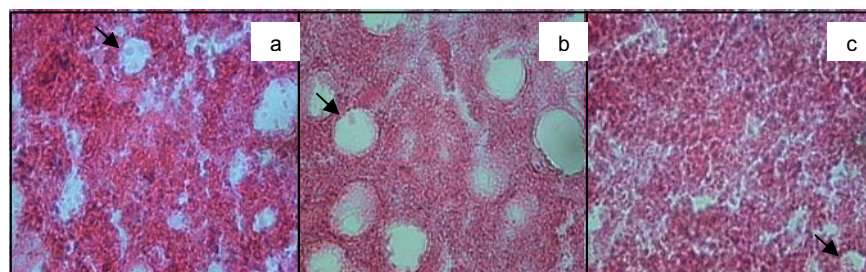
O pH das formulações foi significativamente diferente. A formulação F0 apresentou o pH mais baixo (6,39) entre as amostras. A diferença de pH entre as

formulações F5 e F10 pode ser explicada pela relação inversa entre concentração de biopolímero e pH: solução aquosa a 5% (p/v) apresenta pH 6,42 e a 10% (p/v), pH 6,33.

As três formulações não apresentaram diferenças entre si para os valores de atividade de água, capacidade de retenção de água, rendimento de cocção e força de cisalhamento (Tabela 8), o que representa uma vantagem da aplicação do biopolímero como substituto de gordura, uma vez que a diminuição do teor de gordura em produtos cárneos implica na redução de indicadores de qualidade como a retenção de umidade (BARBUT, 2006), o rendimento (BARBUT, 2006; TROY; DESMOND; BUCKEY, 1999) e a maciez (COLMENERO, 2000; TROY; DESMOND; BUCKEY, 1999; GARCIA et al., 2002; MENDOZA et al., 2001; MUGUNZERA et al., 2002), parâmetros esses que apresentam correlação.

#### 5.4.3 Análise microestrutural

Para avaliar o efeito do biopolímero nas formulações e elucidar os tipos de interações do ingrediente com os outros componentes do produto, foi realizada a análise microestrutural das formulações (Figura 10), porque enquanto a estabilidade da emulsão pode ser determinada pela aplicação de critérios físicos e químicos, a análise estrutural frequentemente revela as causas do comportamento da emulsão (AGUILERA; STANLEY, 1990).



**Figura 10** – Micrografias das formulações grelhadas de produto cárneo à base de frango: (a) F0 = formulação com 10% de gordura; (b) F5 = formulação com 5% de gordura e 5% de biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84; (c) F10 = formulação com 10% de biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84. Coloração H-E. Aumento de 100 x, em microscópio óptico.

Na figura 10, pode-se observar a distribuição da gordura (setas), nas diferentes formulações.

Observando a microestrutura da formulação com 10% de gordura (Figura 10a), pode-se notar a presença de poucos glóbulos de gordura não bem definidos (seta) e a ausência de um filme protéico interfacial (membrana ao redor do glóbulo de gordura), o que representa quebra da emulsão, com a ruptura dos glóbulos e conseqüente coalescência. De acordo com Aguilera e Stanley (1990), a quebra da estrutura inclui, além da separação da gordura, a exudação de água da matriz, quando as proteínas da carne desnaturam e coagulam, perdendo em parte a capacidade de reter água e tornando a matriz débil. A matriz geleificada limita o movimento dos glóbulos de gordura rompidos.

Uma causa provável da quebra da emulsão na formulação contendo somente gordura, reside na utilização de gordura líquida. De acordo com Lee, Carrol e Abdollahi (1981), a emulsão cárnea pode ser desestabilizada pelo uso de gordura líquida, pois a mobilidade desta é inversamente proporcional à consistência, podendo ocorrer a quebra da emulsão onde a gordura líquida escoar pelos espaços intersticiais formados, independente da formação do filme interfacial. Estes resultados sugerem a importância da coesividade da matriz e a consistência da gordura na estabilidade da emulsão.

Para a formulação F0 pode-se considerar a teoria baseada no princípio de uma não-emulsão, onde a gordura está fisicamente aprisionada na matriz protéica e uma porção mínima da gordura aparece embebida na matriz (BARBUT, 1988; LEE; CARROL; ABDOLLAHI, 1981).

A micrografia da formulação F5 (Figura 10b) representa claramente os componentes característicos de uma emulsão cárnea, conforme descrito por Aguilera e Stanley (1990), onde se observam glóbulos de gordura (seta) bem definidos, dispersos na matriz protéica e envoltos por um filme protéico interfacial, indicando que houve boa dispersão da gordura e conseqüente estabilidade da emulsão. Os glóbulos de gordura na formulação F5 apresentam forma variável de circular a oval e estão distribuídos aleatoriamente na matriz protéica. Não houve coalescência durante o aquecimento, provavelmente porque a matriz restringiu fisicamente o movimento dos glóbulos de gordura. A estrutura da matriz pode ser resultante do efeito do biopolímero tanto no aumento da viscosidade da fase contínua como na absorção da gordura e do excesso de umidade, propriedades

observadas por Barbut (2006), ao utilizar soro de leite em pó modificado em produto cominuído de frango. A formação de membranas envolvendo os glóbulos de gordura pode ter ocorrido devido à função do biopolímero na formação do filme protéico interfacial. Efeitos semelhantes foram observados por Gnanasambandam e Zayas (1994), utilizando proteína de gérmen de trigo (7%) como estabilizante em salsichas tipo Frankfurt.

O efeito do biopolímero na formação da estrutura da amostra F5 (substituição parcial da gordura), se destaca em comparação à formulação F0 (sem substituição da gordura), demonstrando que o biopolímero atuou como estabilizante da emulsão. Lin e Zayas (1987) observaram efeito similar em salsicha, aplicando gordura pré-emulsificada e proteína de gérmen de milho como estabilizante. Comparando a microestrutura das formulações F0 e F5 pode-se considerar que a quebra da emulsão na formulação F0 ocorreu, além das causas já discutidas, pela falta de um agente estabilizante, indicando que o amido na proporção utilizada (2%, p/v) e os outros ingredientes não foram eficazes na formação de uma emulsão estável.

A ação do biopolímero, observada microestruturalmente (Figura 10), na formação e estabilidade da emulsão em produto cárneo cominuído à base de frango discorda do previsto a partir dos parâmetros de IAAO e atividade emulsificante, já discutidos nos itens 5.2.2 e 5.2.5, respectivamente. Por outro lado, essa ação está em consonância com a atividade estabilizante de emulsão apresentada pelo composto (item 5.2.5). A habilidade do biopolímero em estabilizar a emulsão no produto cárneo pode ser associada a sua capacidade de formar gel (item 5.2.4) e reter água (item 5.2.2), propriedades apontadas por Comer e Allan-Wojitas (1988) como possivelmente mais importantes que a emulsificação na estabilidade de sistemas cárneos cominuídos.

Na micrografia da formulação F10 (Figura 10c) observa-se uma rede de gel, não havendo a formação de emulsão, devido à quantidade ínfima de gordura (Tabela 7). De acordo com Aguilera e Stanley (1990), em produtos cárneos cominuídos pode-se observar fragmentos de carne não orientados juntamente com uma solução protéica, que sob aquecimento forma um gel que mantém as partículas unidas. Pode-se considerar que houve a formação de uma rede espessa, devido à contribuição do biopolímero para a firmeza do gel. Efeito semelhante foi observado por Tsumura et al. (2005) em gel preparado com proteína cárnea solúvel em sal,

adicionado de isolado protéico de soja. Da análise microestrutural da formulação F10 conclui-se que no produto cárneo o biopolímero manteve a capacidade de formar gel, propriedade apresentada pelo composto em solução aquosa (item 5.2.4). Isso indica a possibilidade de aplicação do biopolímero em produtos cárneos.

#### **5.4.4 Análise de cor**

Os resultados obtidos da análise das formulações de produto cárneo à base de frango para os parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , avaliados pelo sistema CIELab, estão na tabela 9. A cor das amostras pode ser observada na Figura 9. Houve diminuição acentuada na luminosidade ( $L^*$ ) das formulações com o biopolímero, tanto para as amostras cruas como para as grelhadas. Verifica-se diminuição da luminosidade entre a amostra F0 crua e a grelhada, o que é característico para produtos cárneos. No caso das formulações com substituição parcial e total da gordura pelo biopolímero, quando grelhadas, houve um aumento da luminosidade. Nas amostras cruas, a intensidade da cor vermelha ( $a^*$ ) foi semelhante nas formulações com substituto de gordura (F5 e F10) e menor na amostra com gordura (F0). Por outro lado, após grelhadas, somente as amostras F0 e F10 apresentaram essa diferença. A cor amarela ( $b^*$ ) foi mais expressiva nas amostras F0 e F5 cruas. Nas formulações grelhadas, a intensidade da cor amarela é maior na formulação F0 e semelhante entre as formulações F5 e F10.

**Tabela 9** – Efeito da formulação na cor dos produtos cárneos à base de frango, crus e grelhados

Parâmetro	Amostras cruas		
	Formulação		
	F0	F5	F10
L*	71,03 <sup>a</sup> ± 0,98	53,06 <sup>b</sup> ± 2,31	40,11 <sup>c</sup> ± 1,55
a*	2,98 <sup>a</sup> ± 1,08	5,86 <sup>b</sup> ± 0,41	6,09 <sup>b</sup> ± 1,10
b*	18,89 <sup>a</sup> ± 0,71	19,31 <sup>a</sup> ± 0,41	15,72 <sup>b</sup> ± 1,52
Parâmetro	Amostras grelhadas		
	Formulação		
	F0	F5	F10
L*	70,14 <sup>a</sup> ± 5,20	54,79 <sup>b</sup> ± 3,94	48,55 <sup>c</sup> ± 3,83
a*	6,39 <sup>a</sup> ± 4,13	9,01 <sup>ab</sup> ± 2,01	10,04 <sup>b</sup> ± 1,56
b*	28,11 <sup>a</sup> ± 6,23	23,47 <sup>b</sup> ± 2,09	21,76 <sup>b</sup> ± 1,35

Valores são médias ± desvio padrão de 10 medidas.

Médias na mesma linha acompanhadas de letra diferente apresentam diferença significativa (teste Tukey,  $p \leq 0,05$ )

F0 = formulação com 10% de gordura; F5 = formulação com 5% de gordura e 5% de biopolímero; F10 = formulação com 10% de biopolímero.

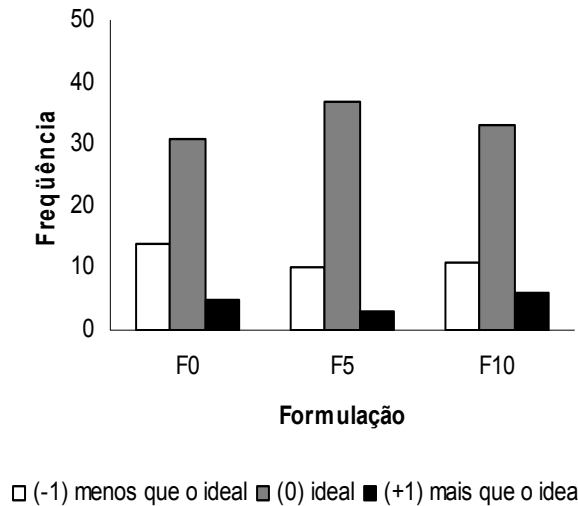
#### 5.4.5 Avaliação sensorial

O perfil dos 50 provadores, de acordo com as respostas dos questionários aplicados na ocasião da análise sensorial foi o seguinte: 90% estavam na faixa entre 15 e 35 anos (46% entre 15 e 25 anos), sendo 70% do sexo feminino e 52% de alunos de pós-graduação. Entre os provadores, 98% afirmaram gostar de hambúrguer e 58% apresentam consumo moderado, em média 3 vezes por mês. Quanto ao tipo de hambúrguer, 98% já provaram o de carne, 78% o de frango e 22% conhecem algum tipo de hambúrguer *light*.

No teste de aceitação com escala hedônica híbrida de 10 pontos, a formulação contendo somente gordura apresentou a maior nota (F0 = 7,03), diferindo das amostras com substituição parcial (F5 = 5,87) e total (F10 = 4,76) da gordura por biopolímero, que foram aceitas da mesma forma. A amplitude das notas de aceitação atribuídas para as três formulações de produto cárneo à base de frango, que compreende valores entre 4,76 e 7,03, variou entre a indiferença quanto à aceitação (5 = “não gostei nem desgostei”) e a aceitação máxima (10 = “gostei extremamente”).

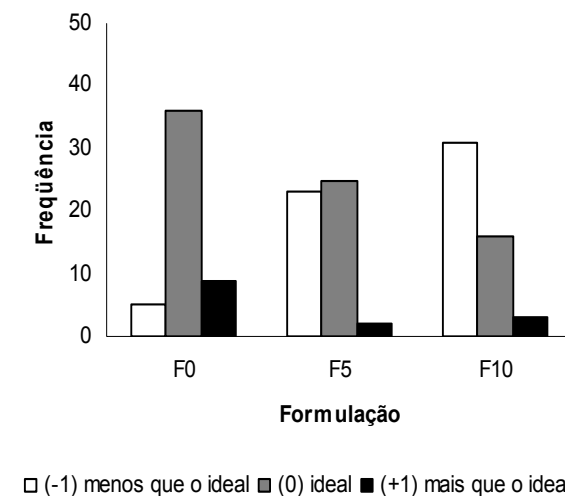
Em relação ao atributo maciez, todas as formulações apresentaram a maior frequência de respostas “ideal” e, comparando as formulações entre si,

observa-se (Figura 11) que um número próximo de provadores (F0 = 31; F5 = 37 e F10 = 33) considerou a maciez das três formulações como ideal.



**Figura 11** – Frequência das notas para o atributo maciez dos produtos cárneos à base de frango, segundo a escala do ideal

Quanto ao sabor de frango (Figura 12), a formulação F0 apresentou maior frequência de respostas “ideal”, enquanto as formulações contendo o substituto de gordura tiveram frequência de respostas “ideal” decrescente com o aumento da substituição da gordura pelo biopolímero.



**Figura 12** – Frequência das notas para o atributo sabor de frango dos produtos cárneos à base de frango, segundo a escala do ideal

Referente à atitude de compra (Tabela 10), as três formulações apresentaram respostas diferentes, com a intenção de compra proporcional à quantidade de gordura da amostra.

**Tabela 10** – Freqüência da intenção de compra para cada formulação de produto cárneo à base de frango

Intenção De compra	F0		F5		F10	
	Freqüência	%	Freqüência	%	Freqüência	%
5	13	26	10	20	6	12
4	17	34	5	10	5	10
3	14	28	21	42	13	26
2	4	8	5	10	7	14
1	2	4	9	18	19	38

A baixa familiaridade dos provadores (22%) com hambúrgueres com reduzido teor de gordura e o aspecto visual das formulações F5 e F10 (Figura 9), com a presença de cor marrom, diferente da característica para produtos de frango, podem ter influenciado na aceitabilidade mais baixa dessas formulações com substituição parcial e total da gordura pelo biopolímero. De acordo com os resultados da análise sensorial, a aceitabilidade dos produtos contendo o biopolímero como substituto de gordura foi influenciada pelo sabor (Figura 12) e não pela textura (Figura 11), pois este parâmetro não apresentou variação entre as três formulações, o que concorda com os resultados da análise instrumental da força de cisalhamento (Tabela 8), correlação esta entre textura sensorial e instrumental determinada por Parks e Carpenter (1987). Os resultados obtidos para o atributo sabor de frango das formulações (Figura 12) podem ser explicados pela habilidade da gordura em carrear compostos lipofílicos de sabor e por isso atuar como precursor do desenvolvimento de sabor, enquanto os mimetizadores de gordura são capazes de carrear apenas sabores solúveis em água, havendo uma desvantagem nesse atributo em comparação aos produtos que levam gordura na formulação (RUITER; VORAGEN, 2002), o que torna a manutenção do sabor em produtos cárneos com teor reduzido de gordura um desafio (BARBUT, 2006; COLMENERO, 2000; FLINT, 1996).

Diante disso, se fazem necessários novos testes de formulação, utilizando menor quantidade de biopolímero e/ou adicionando às formulações ingredientes que tenham efeito superior ao do biopolímero no sabor e na cor dos produtos.

## 6 CONCLUSÃO

6.1 Foi possível obter um biopolímero bruto produzido por *Agrobacterium radiobacter* k84 utilizando melaço de cana-de-açúcar 4°BRIX como fonte de carbono.

6.2 A análise microestrutural demonstrou que o biopolímero é um composto amorfo. A caracterização das frações constituintes do biopolímero é uma mistura de minerais (P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, Mn, Na, Fe, Cr, Co, Ni, Pb, Cd, Mo), fibra solúvel composta por unidades de glicose e proteínas de 65, 80 e 105 kDa.

6.3 O biopolímero apresentou propriedades de importância tecnológica, como alta solubilidade em água, alta absorção de água e de óleo, formação de soluções viscosas à temperatura ambiente, geleificação sob aquecimento e efeito emulsificante e alta capacidade estabilizante de emulsão.

6.4 Nas condições experimentais aplicadas, não há toxicidade evidente do biopolímero, do que se pode considerar o composto como potencialmente inócuo.

6.5 Verificou-se ser possível a utilização do biopolímero como substituto de gordura em produto cárneo cominuído à base de frango.

6.5.1 As diferenças entre os parâmetros físico-químicos (pH, umidade e lipídios) das formulações de produto cárneo foram devidas ao conteúdo variável de biopolímero, havendo diminuição expressiva no teor de lipídios das amostras contendo o biopolímero em substituição à gordura.

6.5.2 A cor das formulações do produto cárneo foi influenciada pela adição do biopolímero.

6.5.3 Como substituto parcial e total de gordura, o biopolímero foi eficaz em manter a textura apresentada pela formulação elaborada sem substituição da gordura.

6.5.4 As formulações de produto cárneo contendo o biopolímero em substituição à gordura apresentaram menor aceitação em termos de sabor, em comparação ao produto com teor integral de gordura.

6.5.5 A partir da análise microestrutural do produto cárneo cominuído à base de frango pode-se observar que o biopolímero apresentou alta atividade emulsificante e estabilizante da emulsão.

6.6 Considerando a composição em minerais, carboidratos e proteínas, as propriedades tecnológicas e a ausência de efeitos prejudiciais à saúde, o biopolímero apresenta possibilidades de aplicação do ponto de vista nutricional e tecnológico como ingrediente em alimentos.

## REFERÊNCIAS

AOAC - Association of Official Analytical Chemist. **Official Methods of Analysis** v.II, 16.ed., 1995.

AGUILERA, J.M. Microstructure and food product engineering. **Food Technology**, v.54, n.11, p.56-65, 2000.

AGUILERA, J.M. Why food microstructure? **Journal of Food Engineering**, v.67, p.3–11, 2005.

AGUILERA, J.M.; STANLEY, D.W. **Microstructural Principles of Food Processing and Engineering**. Amsterdam: Elsevier, 1990.

AGUILERA, J.M.; STANLEY, D.W.; BAKER, K.W. New dimensions in microstructure of food products. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.3-9, 2000.

AMARAL, P.F.F. et al. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v.41, p.1894-1898, 2006.

ANDERSON, R.A. et al. Gelation of corn grits by roll and extrusion cooking. **Cereal Science Today**, Saint Paul v. 14, n.1, p. 4-7, 11-12, 1969.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº518, de 25 de Março de 2004. Padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde. **e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22322&word - 172k -**, 2004.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC nº 360, de 23 de Novembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. **http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9059**, 2003a.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Decreto nº 55.871, de 26 de Março de 1965. Ingredientes usados em Alimentos. **http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22**, 2003b.

AUFDERHEIDE, M. An efficient approach to study the toxicological effects of complex mixtures. **Experimental and Toxicologic Pathology** doi:10.1016/j.etp.2008.01.015, 2008.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.495–508, 2000.

BARBOSA-CANOVAS, G.V; RUFNER, R.; PELEG, M. Microstructure of selected binary food powder mixtures. **Journal of Food Science**, v.50, p.473-477, 481, 1985.

BARBUT, S. Effects of caseinate, whey and milk powders on the texture and microstructure of emulsified chicken meat batters. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.39, p.660–664, 2006.

BARBUT, S. Microstructure of reduced salt meat batters as affected by polyphosphates and chopping time. **Journal of Food Science**, v.53, n.5, p.1300-1304, 1988.

BARRIGA, J.A.T. et al. Components of the emulsifier from *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, p.96-102, 1999.

BATER, B.; MAURER, A.J. Effects of fat source and final cominution temperature on fat particle dispersion, emulsion stability, and textural characteristic of turkey frankfurters - 1. **Poultry Science**, v.70, n.6, p.1424-1429, 1991.

BECHER, P. **Emulsions: theory and practice**. 2.ed. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1965.

BEMILLER, J.N., WHISTLER, R.L. Carbohydrates. In: **Food Chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996, pp. 157-224.

BERGEY, D.H. Gram-negative aerobic rods and cocci. In: **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1974, pp. 217-285.

BERRY, B.W. Low fat level effects on sensory, shear, cooking, and chemical properties of ground beef patties. **Journal of Food Science**, v.57, n.3, p.537-540, 1992.

BRENT, R.L. Utilization of Animal Studies to Determine the Effects and Human Risks of Environmental Toxicants (Drugs, Chemicals, and Physical Agents). **Pediatrics**, v.113, p.984-995, 2004.

CANO-CHAUCA, M. et al. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.6, n.4, p.420-428, 2005.

CHARLES, G.D. et al. An *in vitro* screening paradigm for extracts of whole foods for detection of potential toxicants. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.1391-1402, 2002.

CHEL-GUERRERO et al. Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canvalia ensiformis* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.584-591, 2002.

COLMENERO, F.J. Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 56-66, 2000.

COMER, F.W.; ALLAN-WOJITAS, P. Functional and microstructural effects of fillers in comminuted meat products. **Food Micorstructure**, v.7, p.25-42, 1988.

COZZOLINO, S.M.F. Recomendações de nutrientes. In: \_\_\_\_\_ **Biodisponibilidade de Nutrientes**. São Paulo: Manole, 2005, p.12-37.

CUNHA, M.A.A. et al. Goma Curdlana: Propriedades e Aplicações. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.33, p.55-61, 2004.

CUNHA, M.A.A. **Produção de goma curdlana pela bactéria *Agrobacterium radiobacter* k84**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CZAJKA-NARRINS, D.M. Minerais. In: MAHAN, L. K; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9.ed. São Paulo: Roca, 1998, p.123-166.

DAGORN-SCAVINER, C.; GUEGUEN, J.; LEFEBVRE, J. Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors. **Journal of Food Science**, v.52, n.2, p.335-341, 1987.

DAMODARAN, S. Structure-function relationship of food proteins. In: HETTIARACHCHY, N.S; ZIEGLER, G.R. **Protein functionality in food systems**, New York: Marcel Dekker, 1994, p.1-37.

DEIS, R.C. Adding bulk without adding sucrose. **Cereal Foods World**, v.39, n.2, p.93-97, fev. 1994.

DONADEL, M.E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H. Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.3, p.380-386, 1999.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

DUSSAP, C.G.; DE VITA, D.; PONS, A. Modeling growth and succioglucon production by *Agrobacterium radiobacter* NCIB 9042 in batch cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.38, p.65-74, 1991.

EISENBRAND, G. et al. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.193–236, 2002.

ELIZALDE, B.E. et al. Physicochemical properties of food proteins related to their ability to stabilize oil-in-water emulsions. **Journal of Food Science**, v.53, n.3, p.845-848, 1988.

ELIZALDE, B.E.; PILOSOFF, A.M.R.; BARTOLOMAI, G.B. Prediction of emulsion instability from emulsion composition and physicochemical properties of proteins. **Journal of Food Science**, v.56, n.1, p.116-120, 1991.

EPA – U.S. Environmental Protection Agency. **Agrobacterium radiobacter strain K1026(006474)**.[http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech\\_docs/tech\\_006474.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/tech_006474.htm), 2005.

ESCHLEMAN, M. **Introductory nutrition and diet therapy**. London: Lippincott J.B.Co., 1984.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients**. <http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/red-toca.html>., jul. 2007.

FENG, Y.; HULTIN, H.O. Effect of pH on the rheological and structural properties of gels of water-washed chicken-breast muscle at physiological ionic strength. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.3927, 2001.

FILISSETTI, T.M.C.C.; LOBO, A.R. Fibra alimentar e seu efeito na biodisponibilidade de minerais. IN: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. São Paulo: Manole, 2005, p.174-212.

FLINT, O. **Microscopía de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1996.

FOEGEDING, E.A.; RAMSEY, S.R. Effect of gums on low-fat meat batters. **Journal of Food Science**, v.51, p.33-36, 46, 1986.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FUNAMI, T. et al. Gelation mechanism of curdlan by dynamic viscoelasticity measurements. **Journal of Food Science**, v.64, n.1, p.129-132, 1999a.

FUNAMI, T. et al. Rheological and thermal studies on gelling characteristics of curdlan. **Food Hydrocolloids**, v.13, p.317-324, 1999b.

FUNAMI, T.; YADA, H.; NAKAO, Y. Curdlan properties for application in fat mimetics for meat products. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 2, p. 283-287, 1998.

FURTADO, M.R. Desequilíbrio climático abre mercado para novos hidrocolóides. **Química e Derivados**, v.430, p.1-5, set. 2004.

GARCIA, M.L. et al. Utilization of cereal fruit fibers in low fat dry fermented sausages. **Meat Science**, v.60, p.227-236, 2002.

GARCÍA-SEGOVIA, P.; ANDRÉS-BELLO, A.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J. Effect of cooking method on mechanical properties, color and texture of beef muscle (*M. pectoralis*). **Journal of Food Engineering**, v.80, p.813-821, 2007.

GERMOLEC, D.R. et al. The accuracy of extended histopathology to detect immunotoxic chemicals. **Toxicological Sciences**, v.82, p.504–514, 2004.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M. Dietary modulation of human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotic. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1412, 1995.

GIL, A.C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 3.ed. São Paulo: Atlas, 1996.

GNANASAMBANDAM, R.; ZAYAS, J.F. Microstructure of frankfurters extended with wheat germ proteins. **Journal of Food Science**, v.59, n.3, p.474-477, 1994.

GOMBAS, A. et al. Quantitative determination of crystallinity of alpha-lactose monohydrate by near infrared spectroscopy (NIRS). **International Journal of Pharmaceutics**, v.256, p.25–32, 2003.

GRESSLER, L.A. Entrevista. In: \_\_\_\_\_. **Introdução à pesquisa: projetos e relatórios**. 2.ed. São Paulo: Loyola, 2004. p.164-169.

HAMM, R. Biochemistry of meat hydration. **Advances in Food Research**, v.10, n.2, p.335-443, 1960.

HARADA, T.; MISAKI, A.; SAITO, H. Curdlan: A bacterial gel-forming  $\beta$ -1,3-glucan. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.124, p.292-298, 1968.

HAVLIK, I. et al. Curdlan sulphate in human severe/cerebral *Plasmodium falciparum* malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.99, p.333-340, 2005.

HECKER, H. et al. *In vitro* evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from Ginkgo biloba L. **Toxicology**, v.177, p.167–177, 2002.

HENDLER, S.S. **The doctor's vitamin and mineral encyclopedia**. New York: Simon and Schuster, 1990.

HOLZAPFEL, W.H.; SHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v.35, p.109-116, 2002.

HROMÁDKOVÁ, Z. et al. Influence of the drying method on the physical properties and immunomodulatory activity of the particulate (1→3)- $\beta$ -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.9–15, 2003.

IVEY, F.J.; WEEB, N.B.; JONES, V.A. The effect of disperse phase droplet size and interfacial film thickness on the emulsifying capacity and stability of meat emulsions. **Food Technology**, v.24, p.91, 1970.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. 19.ed. New York: Springer, 2005.

JEZEQUEL, V. Curdlan: a new functional  $\beta$ -glucan. **Cereal Foods World**, v.43, p.361-364, 1998.

JONES, J.M. Food safety. In: SIKORSKI, Z.E. **Chemical and functional properties of food components**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2002, p.291-305.

JONES, K.W.; MANDIGO, R.W. Effects of chopping temperature on the microstructure of meat emulsions. **Journal of Food Science**, v.47, p.1930-1935, 1982.

KANTEREWICZ, R.J. De et al. Water-oil absorption index (WOAI): a simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. **Journal of Food Science**, v.52, n.5, p.1381-1383, 1987.

KINSELLA, J.E. Functional properties of proteins in foods: a survey. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.7, p.219-280, abr. 1976.

KLEMASZEWSKI, J.L.; HAQUE, Z.; KINSELLA, J.E. An electronic images system for determining droplet size and dynamic breakdown of proteins stabilized emulsions. **Journal of Food Science**, v.54, n.2, p.440-445, 1989.

KRUMELL, D. Lipídeos. In: MAHAN, L. K; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9.ed. São Paulo: Roca, 1998, p.49-56.

LABUZA, T.P.; EDMAN JUNIOR, J.W. **Food Science and Nutrition Health: An Introduction**. Saint Paul: West Publishing Company, 1984.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LARREA, V. et al. Microstructural changes in teruel dry cured ham during processing. **Meat Science**, doi:10.1016/j.meatsci.2007.01.013, 2007.

LEE, C.M.; CARROL, R.J.; ABDOLLAHI, A. A microscopical study of the structure of meat emulsions and its relationship to thermal stability. **Journal of Food Science**, v.46, p.1789-1804, 1981.

LEE, J.W. et al. Microbial production of water-soluble non curdlan type exopolymer-B with controlled composition by *Agrobacterium radiobacter*. **Biotechnology Letters**, v.19, n.12, p.1217-1221, 1997a.

LEE, J.W. et al. Exopolymers from curdlan production: incorporation o sucrose-related sugars by *Agrobacterium* sp. strain ATCC 31749. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.149-156, 1997b.

LEESON, C.R.; LEESON, T.S. Preparation of tissues. In: **Histology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1966, p.8-12.

LIN, C.S.; ZAYAS, J.F. Microstructural comparisons of meat emulsions prepared with corn protein emulsified and unemulsified fat. **Journal of Food Science**, v.52, n.2, p.267-270, 1987.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

MAHAN, L. K; ESCOTT-STUMP, S. Carboidratos. In: \_\_\_\_\_. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9.ed. São Paulo: Roca, 1998a, p.31-47.

MAHAN, L. K; ESCOTT-STUMP, S. Proteínas. In: \_\_\_\_\_. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9.ed. São Paulo: Roca, 1998b, p.63-66.

MAIHARA, V.A; FÁVARO, D.I.T. Elementos tóxicos. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. São Paulo: Manole, 2005, p.629-659.

MALVEZI, A.D. et al. Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss e C57BL/6 mantidos em biotério convencional. **Biosaúde**, v.2, p.65-74, 2000.

MENDOZA, E. et al. Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausage. **Meat Science**, v.57, p.387-393, 2001.

MOREIRA, A. da S., SOUZA, A. da S., VENDRUSCOLO, C.T. Determinação da composição de biopolímero por cromatografia de camada delgada: Metodologia. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n.3, p.222-224, 1998.

MUGUNZERA, E. et al. Effect of level and partial replacement of pork backfat with olive oil in processing and quality characteristics of fermented sausage. **Meat Science**, v.61, p.397-404, 2002.

NABRZYSKI, M. Mineral components. In: SIKORSKI, Z.E. **Chemical and functional properties of food components**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2002, p.51-79.

NAGATO, L.A.F. et al. Parâmetros físicos e químicos e aceitabilidade sensorial de sucos de frutas integrais, maracujá e uva, de diferentes marcas comerciais brasileiras. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.127-136, jan.-jun. 2003.

NAKAO, Y. et al. Curdlan: Properties and Application to Foods. **Journal of Food Science**, v.56, n.3, p.769-776, 1991.

NESTMANN, E.R.; LYNCHA, B.S. Method for calculating ADI-derived guidance values for drug carryover levels in medicated feeds. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.47, n.3, p.232-239, abr. 2007.

NIELSEN, J.B. What you see may not always be what you get – Bioavailability and extrapolation from *in vitro* tests. **Toxicology in Vitro**, v.22, p.1038–1042, 2008.

OGA, S.; SIQUEIRA, M.E.P.B. Introdução à toxicologia. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 5-7.

OLIVEIRA, M.R. et al. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p.177–183, 2007.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Emulsões cárneas. In: SHIMOKOMAKI, M. et al. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, 2006, p.123-132.

OTTEN, J.J.; HELLWIG, J.P.; MEYERS, L.D. **Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements**. Washington: National Academies Press, 2006.

PAPPAS, G.; RAO, V.N.M.; SMIT, C.J.B. Development and characteristics of modified agar gels. **Journal of Food Science**, v.52, n.2, p.467-471, 1987.

PARKS, L.L.; CARPENTER, J.A. Functionality of six nonmeat proteins in meat emulsion systems. **Journal of Food Science**, v.52, n.2, p.271-274, 278, 1987.

PENALVER, R. et al. *Agrobacterium radiobacter* strains k84, k 1026 produce an antibiotic-like substance, active *in vivo* against *A. tumefaciens* and phytopathogenic *Erwinia* and *Pseudomonas* spp. **Biocontrol Science and Technology**, v.4, n.3, p.259-267, 1994.

PENNA, A.L.B. Hidrocolóides: usos em alimentos. **Food Ingredients**, v.3, n.17, p.58-64, 2002.

PETROWSKI, G.E. Emulsion stability and its relation to foods. **Advances in Food Research**, v.22, p.309-359, 1976.

PHILLIPS, K.R.; LAWFORD, H.G. Theoretical maximum and observed product yields associated with curdlan production by *Alcaligenes faecalis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.1270-1276, 1983.

POOLE, S.; WEST, S.I.; FRY, J.C. Effects of basic proteins on the denaturation and heat-gelation of acidic proteins. **Food Hydrocolloids**, v.1, n.4, p.301-316, 1987.

POOLE, S.; WEST, S.I.; WALTERS, C.L. Protein-protein interactions: Their importance in the foaming of heterogeneous proteins system. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.35, p.701-711, 1984.

PORTILHO, M. et al. Production of insoluble exopolysaccharide of *Agrobacterium* sp (ATCC 31749 and IFO 13140). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.131, n.1-3, p.864-869, 2006.

PRIMO, M.S. **Avaliação da atividade antimutagênica de um biopolímero extraído do microrganismo *Agrobacterium radiobacter* em camundongos Swiss**. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Nutrição) - Centro Universitário Filadélfia, Londrina.

PSZCZOLA, D. E. Curdlan differs from other gelling agents. **Food Technology**, v.51, n.4, p.30, 1997.

REPETTO, M. **Toxicología Fundamental**. 3.ed. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 1997.

RIBEIRO, L. de F. **Regras básicas para apresentação formal de trabalhos**. Londrina: Sistema de Bibliotecas da UEL, jan. 2006.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.154–162, 1999.

RUITER, A.; VORAGEN, A.G.J. Major food additives. In: SIKORSKI, Z.E.. **Chemical and functional properties of food components**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2002, p.273-289.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: **Biotecnologia Industrial**, v.2, São Paulo: Edgard Blücher, 2001, pp. 5-18.

SCIARINI, L.S. et al. Chemical composition and functional properties of *Gleditsia triacanthos* gum. **Food Hydrocolloids**, doi:10.1016/j.foodhyd.2008.02.011, 2008.

SHEPHERD, R. et al. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v.40, p.207-217, 1995.

SIKORSKI, Z.E. **Chemical and functional properties of food components**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2002.

SILVA, A.G.H.; COZZOLINO, S.M.F. Fósforo. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. São Paulo: Manole, 2005a, p.447-458.

SILVA, A.G.H.; COZZOLINO, S.M.F. Manganês. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. São Paulo: Manole, 2005b, p.600-608.

SMITH, G.C. et al. Efficacy of protein additives as emulsion stabilizer in frankfurts. **Journal of Food Science**, v.38, p.849, 1973.

SOSULSKI, F.W.; McCRUDY, A.R. Functionality of flours, protein fractions and isolates from field peas and faba bean. **Journal of Food Science**, v.52, n.4, p.1010-1014, 1987.

SOUW, P.; DEMAIN, A.L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology**, p.1186-1192, jun. 1979.

SPICER, E.J.F.; GOLDENTHAL, E.I.; IKEDA, T. A toxicological assessment of curdlan. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.455-479, 1999.

STOCKWELL, V.O.; MOORE, L.W.; LOPER, J.E. Fate of *Agrobacterium radiobacter* K84 in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, p.2112-2120, jul. 1993.

SUTHERLAND, I.W. Microbial polysaccharides from gram negative bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.663-674, 2001.

SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech**, v.16, p.41-46, jan. 1998.

SUTHERLAND, I.W. The role of acylation in exopolysaccharides including those for food use. **Food Biotechnology**, v.6, n.1, p.75-86, 1992.

THIES, C. Microencapsulation: what it is and purpose. In: VILSTRUP, P. (Ed.), **Microencapsulation of food ingredients**. Leatherhead: Leatherhead Publications, 2001, pp.1-30.

TIMBRELL, J. Toxicity testing and risk assessment. In: \_\_\_\_\_. **Introduction to toxicology**. 3.ed. Washington: CRC Press, 2002, pp.163-182.

TIRAPAGUI, J.; CASTRO, I.A.; ROSSI, L. Biodisponibilidade de proteínas. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. São Paulo: Manole, 2005, p.68-123.

TORABIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S.A.; TEHRANI, H.A. Preparation and Characterisation of Bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.29. p.734-737, 1996.

TOREN, A. et al. Solubilization of phenanthrene by recombinant protein bioemulsans. **Biochemical Engineering Journal**, v.16, p.169-174, 2003.

TRIVENI, R.; SCHAMALA, T.R.; RASTOGI, N.K. Optimised production and utilisation of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. **Process Biochemistry**, v.36, p.787-795, 2001.

TROY, D.J.; DESMOND, E.M.; BUCKEY, D.J. Eating quality of low-fat beef burgers containing fat-replacing functional blends. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.79, p.507-516, 1999.

TSUMURA, K. et al. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.38, p.255-261, 2005.

UKELIS, U. et al. Replacement of *in vivo* acute oral toxicity studies by *in vitro* cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.51, p.108–118, 2008.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Meat and Meat Products**. 5.ed. London: Chapman & Hall, 1995.

VETTORAZZI, G. El Codex Alimentarius y otros organismos internacionales en cuanto instrumentos de armonización internacional y acuerdo para la determinación de niveles de seguridad de las sustancias químicas. Un caso específico: la valoración toxicológica a la luz de recientes opiniones. **World Health Organization, International Programme on Chemical Safety**. p.117-132, <http://bvsde.per.paho.org/bvsacd/eco/040067/040067-032.pdf>, 1977.

VILLANUEVA, N.D.M.; PETENATE, A.J.; DA SILVA, M.A.A.P. Performance of the hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. **Food Quality and Preference**, v.16, p.691–703, 2005.

WAITZBERG, D. L.; LOGOLLO, P. Proteínas. In: WAITZBERG D.L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. São Paulo: Atheneu, 2000, p.35-54.

WARD, F.M.; ANDON, S.A. Hydrocolloids as film formers, adhesives, and gelling agents for bakery and cereal products. **Cereal Foods World**, v.47, n.2, p.52-55, fev. 2002.

WNEK, G.E. **Biopolymer**. Access Science - Encyclopedia of science and technology online. <http://www.accessscience.com>. The McGraw-Hill Companies, 2008.

YAMATSU, K. et al. Whipping and emulsifying properties of soy bean products. **Journal of Agriculture and Biology Chemistry**, v.36, n.5, p.719-727, 1972.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: Preparation, characterization and stabilization. **International Journal of Pharmaceutics**, v.48, p.27– 42, 2001.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. Succinoglycan and galactoglucan. **Carbohydrate Polymers**, v.33, p.139-144, 1997.

**ANEXO**

**ANEXO A –**

Artigo apresentado no Exame de Qualificação de doutorado e submetido à publicação no periódico Food and Chemical Toxicology

***In vitro* and *in vivo* toxicity studies of a novel *Agrobacterium radiobacter* k84  
biopolymer (ARB)**

C. M. Calliari<sup>a\*</sup>, M. Magnani<sup>a</sup>, A. Y. Saito<sup>b</sup>, P. S. R. Dionízio Filho<sup>b</sup>, A. D. Malvezi<sup>c</sup>, R. J. H.  
Castro-Gómez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Department of Food Science Technology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil*

<sup>b</sup>*Department of Pathological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil*

<sup>c</sup>*Laboratory of Hematology, Hospital Universitário Regional, Universidade Estadual de Londrina,  
Londrina, Brazil*

\*Corresponding author: Caroline Maria Calliari, Caixa Postal 6001 - 86051-970 Londrina – Paraná –  
Brazil; Tel: 00 55 43-3371-4575; fax: 00 55 43-3371-4585; e-mail: [carolinemariac@yahoo.com.br](mailto:carolinemariac@yahoo.com.br)

Running title: *In vitro/in vivo* toxicity studies of *A. rad.*

Keywords: *Agrobacterium*. Biopolymer. Food ingredient. Cytotoxicity. Oral toxicity. Swiss mice.

TABLE OF CONTENTS

<b>1. Introduction</b>	2
2. Materials and Methods	4
2.1. Materials	4
2.2. ARB production	4
2.3. Cytotoxicity	5
2.4. 30-Day oral toxicity	5
2.4.1. Hematology	6
2.4.2. Histology	6
2.5. Statistical analyses	6

<b>3. Results</b>	7
3.1. ARB	7
3.2. Cytotoxicity	7
3.3. 30-Day oral toxicity	7
<b>4. Discussion</b>	8
<b>5. Acknowledgements</b>	10
<b>6. References</b>	10

## Abstract

*Agrobacterium radiobacter* k84 biopolymer (ARB) is a novel, soluble metabolite obtained in this work by fermentation using sugar cane molasses as a carbon source, and proposed as a food ingredient. The process resulted in 10 g.L<sup>-1</sup> of a crude biopolymer composed of ash (40%), carbohydrate (35%) and protein (15%). Evaluation of the cytotoxic effect of ARB at 2.5, 5.0 and 10.0 mg/mL in LLC MK<sub>2</sub> (Rhesus Monkey Kidney) cells by the MTT test, revealed a 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) of 9.32 mg/mL. In a 30-day oral toxicity study, Swiss mice were administered ARB by gavage at 5, 15, 50 and 150 mg/mL (approximately 25, 75, 250 and 750 mg/kg/day). The mice presented no hematological or histopathological signs of adverse effects, leading us to define the no observed adverse effect level (NOAEL) as 150 mg/mL (approximately 750 mg/kg/day).

## 1. Introduction

*Agrobacterium radiobacter*, first identified as *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, is a non-pathogenic, Gram-negative, aerobic bacterium, typically found in soil, with optimum growth occurring in the temperature range between 25 - 30°C and the pH range of 6 – 9; this bacterium is known as a producer of exopolysaccharides curdlan and succinoglucan (Dussap et al., 1991; Bergey, 1974; Harada et al., 1968).

Curdlan safety (Spicer et al., 1999) was extensively studied by Takeda Chemicals Industries Ltd., which commercializes this insoluble  $\beta$ -1,3 linked glucose polymer as a heat-gelling and water-binding agent, thickener, stabilizer, emulsifier and fat substitute (Funami et al., 1999; Jezequel, 1998; Pzczcola, 1997; Nakao et al., 1991). In addition, curdlan has health benefits common to the  $\beta$ -glucans (Havlik et al., 2005). Succinoglucan is a soluble heteropolysaccharide (Dussap et al., 1991) that was industrially produced by Shell (Zevenhuizen, 1997), because of its useful applications as emulsion-stabilizing, suspending and thickening agent. There are innumerable studies pertaining to obtaining biopolymers from *A. radiobacter* fermentation by varying the carbon source and process conditions (Portilho et al., 2006; Triveni et al., 2001; Sutherland, 1998; Lee et al., 1997a, 1997b).

It is clear that *A. radiobacter* fermentation has potential in food ingredient development, and several more applications may be identified, especially as we look to renewable resources as alternatives to products of the chemical industry (Sutherland, 2001).

In biotechnological products obtained by fermentation, between 38 and 73% of the total production cost comes from the raw materials, especially from the organic carbon source (Schmidell, 2001). Sugar cane molasses is a cheaper carbon source alternative than glucose traditionally used to make commercial products from *Agrobacterium* cultivation. Its advantages lie in its high concentration of sucrose and a great variety of mineral salts, necessary for industrial metabolite production (Oliveira et al., 2007).

Moreover, the biomass recovered after *A. radiobacter* fermentation has a potential application in the agronomic area; the microorganism produces agrocin, which is toxic to *Agrobacterium tumefaciens*, the bacterium that causes crown gall disease, common in peach trees (Penalver et al., 1994; Stockwell et al., 1993).

In this work, we present preliminary toxicological studies of a novel *A. radiobacter* k84 biopolymer (ARB) produced using sugar cane molasses as a carbon source. The cytotoxicity of ARB was determined in LLC MK<sub>2</sub> (Rhesus Monkey Kidney) cells, and the 30-day oral toxicity of ARB was determined in Swiss mice.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Sugar cane molasses was kindly provided by Cooperativa Agropecuária Rolândia Ltda (COROL), Rolândia, Paraná, Brazil. The *A. radiobacter* k84 bacterial strain was supplied by the Laboratory of Food Microbiology, Department of Food Science Technology, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

### 2.2. ARB production

*A. radiobacter* k84 was maintained in a slant of mannitol yeast agar (1.0% mannitol, 0.02%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.02%  $\text{MgSO}_4$ , 0.01% NaCl, 0.25% yeast extract and 1.5% agar). The cultivation broth, composed of sugar cane molasses 4°BRIX, 1.2% yeast extract (Cunha, 2002) and traces of mineral salts (Phillips and Lawford, 1983), was used to prepare a 48 hour pre-inoculum and a 24 hour inoculum of the bacterium at 28°C and 150 rpm. A new medium was inoculated (10% v/v) and incubated at 28°C, 150 rpm, for 120 hours to produce ARB. The biomass was separated by centrifugation at 12000 x g, for 30 minutes at 4°C (Lee et al., 1997b), and ARB was precipitated from the supernatant using cold absolute ethanol (3:1 v/v) for 24 hours at 4°C. The biomass and ARB that were obtained were dehydrated at 45°C overnight, weighed and milled to 60 mesh.

Ethanol used in the downstream step was recovered in a condenser rotating evaporator (TE 210, Tecnal) at 78°C under vacuum.

ARB centesimal composition and dietary fiber were determined by official AOAC methods (AOAC, 1995). Total carbohydrate was determined by the phenol-sulfuric method (Dubois et al., 1956).

### 2.3. Cytotoxicity

*In vitro* toxicity was evaluated by the MTT test (MTT-based kit, stock no. TOX-1, Sigma Chem. Co., USA) using LLC MK2 cells (Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells) in a 96-well plate, according to the manufacturer's instructions. Briefly, the method consists of the reaction of mitochondrial dehydrogenases of viable cells with the reagent MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) and subsequent spectrophotometrical determination of cellular viability. Test solutions of ARB were prepared in sterile DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) to achieve concentrations of 2.5, 5.0 and 10.0 mg/mL of culture medium, and the cells reacted with ARB for 72 hours. The experiments were carried out in triplicate, and cells grown without test substances were used as controls. The 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) was calculated by regression analysis of the dose-response curve.

### 2.4. 30-Day oral toxicity

ARB solutions were prepared with sterile distilled water at room temperature under agitation and kept under refrigeration until use.

Twenty-five male Swiss mice, eight weeks old and free from pathogens, were obtained from Central Lifehouse of Universidade Estadual de Londrina and acclimated to a 12/12 hour light/dark cycle for one week. The mice were housed in a polystyrene cage with free access to feed (Nuvilab CR1, Nuvital) and sterile tap water.

Mice were divided into five groups of five animals per cage and identified with picric acid solution. ARB solutions (200  $\mu$ L) of 5, 15, 50 and 150 mg/mL, approximately 25, 75, 250 and 750 mg/kg/day respectively, were administered daily by gavage for 30 days. The control group received 200 $\mu$ L of sterile distilled water. The animals were weighed before treatment, weekly during treatment, and again at the end of the study. Behavior and mortality were observed daily, and feed consumption was recorded weekly.

#### *2.4.1. Hematology*

At the end of the experiment (31<sup>st</sup> day), animals were anesthetized in an ether chamber, and blood was collected by cardiac puncture to analyze red blood cell count (RBC), hematocrit (Hct), hemoglobin concentration (Hb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and differential cells count.

#### *2.4.2. Histology*

Necropsies were performed on all study animals. Liver and kidney were analyzed macroscopically, and tissues for microscopic examination were fixed in aqueous Bouin, processed, embedded in paraplast, sectioned to a thickness of 7  $\mu\text{m}$ , and stained with hematoxylin and eosin. Histological analysis of organs was done by three specialists considering a damage scale from 0-4, according Germolec and co-workers (2004).

#### *2.5. Statistical analysis*

Data were presented as mean  $\pm$  S.D. The 50% cytotoxic concentration ( $CC_{50}$ ) was calculated by regression analysis of the dose-response curve. In the 30-day oral toxicity, treated and control groups were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical analyses were carried out using Statistica 5.0 software, and differences with levels of significance at  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. ARB

*Agrobacterium radiobacter* k84 growing in molasses 4°BRIX medium produced approximately 10 g.L<sup>-1</sup> of a brown powder with 40% minerals, 35% carbohydrate, 15% protein and 10% moisture. Fiber analysis determined that the carbohydrate fraction consisted entirely of soluble fiber. Approximately 3 g.L<sup>-1</sup> of biomass were recovered from the cultivation broth after ARB production. ARB production was conducted three times without significant variation in yield or product composition.

#### 3.2. Cytotoxicity

After 72 hours of exposure to ARB, LLC MK<sub>2</sub> cell proliferation decreased in a dose-dependent manner (Fig. 1). Treatment with 2.5 mg/mL ARB in the cell culture medium decreased cellular proliferation by 5% as compared to untreated controls. At the concentration of 5.0 mg/mL, 23.48% of the cells died, and when 10.0 mg/mL was applied, the loss of cellular viability was 55.91%. From this analysis, a CC<sub>50</sub> of 9.32 mg/mL was calculated; this concentration reduced the cell viability by 50%.

<Insert figure 1 here>

#### 3.3. 30-Day oral toxicity

Every animal survived until the end of the experiment. Body weight gains (Table 1) and feed consumption in all ARB concentrations tested were comparable to control group values. No treatment-related macroscopic findings were identified in treated animals at necropsy, and light microscopic examinations did not show significant differences between organs of ARB-treated and control group

animals. Hematological parameters (Tables 2 and 3) of treated animals exposed to all concentrations of ARB were considered normal, as these values were comparable to those of the control group and were similar to values considered normal for Swiss mice (Malvezi et al., 2000). From the results of the 30-day toxicity ARB study in mice, the oral no observed adverse effect level (NOAEL) was determined to be the highest concentration administered (150 mg/mL, approximately 750 mg/kg/day).

<Insert table 1 here>

<Insert tables 2 and 3 here>

#### **4. Discussion**

The novel crude biopolymer named ARB (*Agrobacterium radiobacter* k84 biopolymer) is ethanol precipitated from the biomass generated through the fermentation of *A. radiobacter* k84, using sugar cane molasses as a carbon source. The ARB obtaining process generates biomass as a by-product of economical interest, since *A. radiobacter* k84 can be applied in the biological control of crown-gall disease. Thin layer chromatography of ARB for carbohydrate identification revealed that the carbohydrate fraction is composed exclusively by glucose units, and dietary fiber analysis detected only soluble fiber, which is different from curdlan and succinoglucan profiles. ARB has the property to form viscous solutions when mixed with water at room temperature with a significant increase in viscosity due the gelation under heating.

ARB can contribute to health because of its mineral, soluble fiber and protein contents. In humans, minerals are important regulators of enzymatic activity, they facilitate the transport of essential compounds through cell membranes, and they maintain both the acid-base equilibrium and osmotic pressure (Czajka-Narrins, 1998). Soluble fibers are known to benefit human health by maintaining the normal function of the gastrointestinal tract, reducing serum cholesterol and inducing satiety at meal time (BeMiller and Whistler, 1996). Protein is important to the normal growth of an organism (Waitzberg and Logollo, 2000). Studies with mice demonstrated that ARB has anti-mutagenic activity.

Because ARB has interesting rheological properties and potential health benefits, more studies examining the use of ARB in foods, pharmaceuticals and cosmetics are warranted.

As ARB is proposed as a novel food ingredient, toxicological studies are essential as a question of food security. The dose-response curve (fig. 1) obtained from the cytotoxicity test by MTT demonstrates that 9.32 mg/mL of ARB in cell culture medium causes the death of 50% of the Rhesus Monkey Kidney Epithelial cells, after 72 hours of treatment. The 50% inhibitory concentrations for vegetal extracts (e.g. garlic, cinnamon, ginger) reported by Charles and co-workers (2002) were similar to the value we report for the 50% cytotoxic concentration of ARB. They reported these findings as the initiation of a database tool for methods developed to assess comparative toxicity of foodstuffs, without the indication that these foods are inherently unsafe.

The lack of negative effects of ARB on body weight, hematology, and organ histology suggests that it is safe for consumption in mice. From the NOAEL of 150 mg/mL (approximately 750 mg/kg/day) defined in the ARB 30-day oral toxicity study, the Acceptable Daily Intake (ADI = NOAEL/100) was calculated as 7.5 mg/kg/day (Nestmann and Lynch, 2007; Vettorazzi, 1977). The daily amount of ARB allowed to an adult weighting 70 kg would be 525 mg/day. Higher doses could be tested by another administration via, since the highest concentration tested in this study was difficult to administrate by gavage, due the excessive solution viscosity. According to Eisenbrand et al. (2002), the absence of harmful effects in mice represents a favorable perspective for the use of ARB in foods, considering that animal models are usually good predictors for human toxicities of around 70–80%.

Regarding the correlation between cytotoxicity and oral toxicity results obtained in this work, it is important to consider that *in vitro* studies are helpful in describing the cellular effects of the substances, but that they cannot determine the magnitude of animal or human risks (Brent, 2004; Charles et al., 2002) because in many cases the *in vitro* system reacts differently than the tissue in the animal *in vivo* (Timbrell, 2002). The *in vitro* to *in vivo* extrapolation in tests with mixtures such as ARB, is even more complicated due to varying bioavailability and the possibility of interactions between constituents (Aufderheide, 2008; Nielsen, 2008). It is important to note that the *in vivo/in vitro* correlation is not always given and is not yet fully understood (Ukelis et al., 2008).

ARB potential safety could be expected, seeing as *A. radiobacter* strain k84 has been registered since 1979 as a control for crown-gall agent with no reports of adverse effects to the environment and to the living species (EPA, 2005). Additionally, there are no adverse effects reported about curdlan and succinoglucan produced by this bacterium.

The ARB chemical structural and rheological property characterizations are in progress in order to highlight the composition and possible applications of this new ingredient.

## 5. Acknowledgments

The authors wish to thank CAPES for financial support. For the contribution in toxicological experiments, we thank professors from the Biological Sciences Center from Universidade Estadual de Londrina: from the Department of Pathological Sciences, Dr. Emerson José Venâncio – Laboratory of Immunology IV, and from the Microbiology Department, Dr. Rosa Elisa Carvalho Linhares - Laboratory of Virology, Dr. Sueli Ogatta and Dr. Lucy Megumi Yamaushi Lioni - Microbial Genetic Laboratory.

## 6. References

- AOAC - Association of Official Analytical Chemist, 1995. Section 32 – Cereal Foods. In: Official Methods of Analysis v. II, 16<sup>th</sup> ed., Virginia, USA, pp. 1-12.
- Aufderheide, M., 2008. An efficient approach to study the toxicological effects of complex mixtures. *Experimental and Toxicologic Pathology* doi:10.1016/j.etp.2008.01.015.
- BeMiller, J.N., Whistler, R.L., 1996. Carbohydrates. In: *Food Chemistry* 3rd ed., Marcel Dekker, New York, USA, pp. 157-224.
- Bergey, D.H., 1974. Gram-negative aerobic rods and cocci. In: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, pp. 217-285.

- Brent, R.L., 2004. Utilization of Animal Studies to Determine the Effects and Human Risks of Environmental Toxicants (Drugs, Chemicals, and Physical Agents). *Pediatrics* 113, 984-995.
- Charles, G.D., Linscombe, V.A., Tornesi, B., Mattsson, J.L., Gollapudi, B.B., 2002. An *in vitro* screening paradigm for extracts of whole foods for detection of potential toxicants. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1391–1402.
- Cunha, M.A.A., 2002. Produção de goma curdlana pela bactéria *Agrobacterium radiobacter* k84. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.
- Czajka-Narrins, D.M., 1998. Minerais. In: Mahan, L.K; Escott-Stump, S. Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia 9<sup>th</sup> ed., Roca, São Paulo, pp. 124.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hailton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3), 350-356.
- Dussap, C.G., De Vita, D., Pons, A., 1991. Modeling growth and succioglucan production by *Agrobacterium radiobacter* NCIB 9042 in batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 38, 65-74.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.-C., Pieters, R., Kleiner, J., 2002. Methods of *in vitro* toxicology. *Food and Chemical Toxicology* 40, 193–236.
- EPA – U.S. Environmental Protection Agency, 2005. *Agrobacterium radiobacter* strain K1026 (006474). [http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech\\_docs/tech\\_006474.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/tech_006474.htm).
- Funami, T., Funami, M., Yada, H., Nakao, Y., 1999. Gelation mechanism of curdlan by dynamic viscoelasticity measurements. *Journal of Food Science* 64(1), 129-132.

- Germolec, D.R, Kashon, M., Nyska, A., Kuper, C.F., Portier, C., Kommineni, C., Johnson, K.A., Luster, M.I., 2004. The accuracy of extended histopathology to detect immunotoxic chemicals. *Toxicological Sciences* 82, 504–514.
- Harada, T., Misaki, A., Saito, H., 1968. Curdlan: A bacterial gel-forming  $\beta$ -1,3-glucan. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 124, 292-298.
- Havlik, I., Looareesuwan, S., Vannaphan, S., Wilairatana, P., Krudsood, S., Thuma, P.E., Kozbor, D., Watanabe, N., Kaneko, Y., 2005. Curdlan sulphate in human severe/cerebral *Plasmodium falciparum* malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99, 333-340.
- Jezequel, V., 1998. Curdlan: a new functional  $\beta$ -glucan. *Cereal Foods World* 43, 361-364.
- Lee, J.W., Yeomans, W.G., Allen, A.L., Gross, R.A., Kaplan, D.L., 1997a. Microbial production of water-soluble non curdlan type exopolymer-B with controlled composition by *Agrobacterium radiobacter*. *Biotechnology Letters* 19(12), 1217-1221.
- Lee, J.W., Yeomans, W.G., Allen, A.L., Kaplan, D.L., Deng, F., Gross, R.A., 1997b. Exopolymers from curdlan production: incorporation of sucrose-related sugars by *Agrobacterium* sp. strain ATCC 31749. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 149-156.
- Malvezi, A.D., Peron, J.P.S., Moura, T. R., Souza, F. de, Pinge Filho, P., 2000. Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss e C57BL/6 mantidos em biotério convencional. *Biosaúde* 2, 65-74.
- Nakao, Y., Konno, A., Taguchi, T., Tawada, T., Kasai, H., Toda, J., Terasaki, M., 1991. Curdlan: Properties and Application to Foods. *Journal of Food Science* 56(3), 769-776.
- Nestmann, E.R.; Lynch, B.S., 2007. Method for calculating ADI-derived guidance values for drug carryover levels in medicated feeds. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 47(3), 232-239.

- Nielsen, J.B., 2008. What you see may not always be what you get – Bioavailability and extrapolation from *in vitro* tests. *Toxicology in Vitro* 22, 1038–1042.
- Oliveira, M.R., Silva, R.S.S.F., Buzato, J.B., Celligoi, M.A.P.C., 2007. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal* 37, 177–183.
- Otten, J.J., Hellwig, J.P., Meyers, L.D., 2006. *Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*. National Academies Press, Washington, USA, 543 p.
- Penalver, R., Vicedo, B., Salcedo, C.I., Lopez, M.M., 1994. *Agrobacterium radiobacter* strains k84, k 1026 produce an antibiotic-like substance, active *in vivo* against *A. tumefaciens* and phytopathogenic *Erwinia* and *Pseudomonas* spp. *Biocontrol Science and Technology* 4(3), 259-267.
- Phillips, K.R. and Lawford, H.G., 1983. Theoretical maximum and observed product yields associated with curdlan production by *Alcaligenes faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology* 29, 1270-1276.
- Portilho, M., Matioli, G., Zanin, G.M., Moraes, F.F., Scamparini, A.R.P., 2006. Production of insoluble exopolysaccharide of *Agrobacterium* sp (ATCC 31749 and IFO 13140). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 131(1-3), 864-869.
- Pszczola, D. E., 1997. Curdlan differs from other gelling agents. *Food Technology* 51(4), pp. 30.
- Schmidell, W., 2001. *Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial*. In: *Biotechnologia Industrial* v. 2, Edgard Blücher, São Paulo, Brazil, pp. 5-18.
- Spicer, E.J.F., Goldenthal, E.I., Ikeda, T., 1999. A toxicological assessment of curdlan. *Food and Chemical Toxicology* 37, 455-479.

- Stockwell, V.O., Moore, L.W., Loper, J.E., 1993. Fate of *Agrobacterium radiobacter* K84 in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* July, 2112-2120.
- Sutherland, I.W., 2001. Microbial polysaccharides from gram negative bacteria. *International Dairy Journal* 11, 663-674.
- Sutherland, I.W., 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Tibtech* January (16), 41-46.
- Timbrell, J., 2002. Toxicity testing and risk assessment. In: *Introduction to toxicology* 3rd ed., CRC Press, Washington, USA, pp. 163-182.
- Triveni, R., Schamala, T.R., Rastogi, N.K., 2001. Optimised production and utilisation of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. *Process Biochemistry* 36, 787-795.
- Ukelis, U., Kramer, P-J, Olejniczak, K, Mueller, S.O., 2008. Replacement of *in vivo* acute oral toxicity studies by *in vitro* cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 51, 108-118.
- Vettorazzi, G., 1977. El Codex Alimentarius y otros organismos internacionales en cuanto instrumentos de armonización internacional y acuerdo para la determinación de niveles de seguridad de las sustancias químicas. Un caso específico: la valoración toxicológica a la luz de recientes opiniones. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, 117-132.
- Zevenhuizen, L.P.T.M., 1997. Succinoglycan and galactoglucan. *Carbohydrate Polymers* 33, 139-144.
- Waitzberg, D.L. and Logollo, P., 2000. Proteínas. In: *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*, Atheneu, São Paulo, Brazil, pp. 35-54.

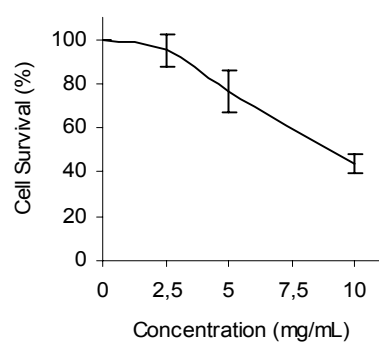


Fig. 1. Cytotoxic effect of ARB in LLC MK<sub>2</sub> cells, as assessed by the MTT assay. Each data point represents the averages of triplicate results  $\pm$  standard deviation.

Table 1:

Mean weekly body weight (grams) of mice administered ARB by gavage for 30 days

Day	Dose (mg/mL)				
	0	5	15	50	150
Initial (Day 0)	35.51 ± 3.1	38.84 ± 1.6	39.12 ± 4.9	39.36 ± 1.5	34.22 ± 4.1
7	36.40 ± 2.4	37.30 ± 2.8	38.66 ± 2.8	40.20 ± 1.7	32.82 ± 5.1
14	38.94 ± 2.7	41.62 ± 1.2	42.26 ± 3.6	44.20 ± 3.3	36.08 ± 3.5
21	40.30 ± 2.4	42.90 ± 1.5	44.12 ± 4.7	45.90 ± 4.1	39.42 ± 3.5
30	40.88 ± 2.8	44.32 ± 1.6	44.08 ± 5.1	45.04 ± 4.2	41.44 ± 3.9

Values are means ± S.D. for groups of 5 mice

Table 2:  
Red blood cell parameters of mice administered ARB by gavage for 30 days

Parameter	Dose (mg/mL)				
	0	5	15	50	150
Red blood cells (millions/ mm <sup>3</sup> )	9.1 ± 0.4	7.6 ± 0.4	6.3 ± 0.9	6.8 ± 1.5	8.5 ± 0.4
Hemoglobin (g/dL)	13.4 ± 2.2	13.1 ± 1.4	13.3 ± 1.0	15.0 ± 2.0	18.0 ± 3.5
Hematocrit (%)	49.5 ± 5.5	51.0 ± 7.0	49.3 ± 3.7	47.3 ± 4.1	46.5 ± 2.4
Mean corpuscular volume (μ <sup>3</sup> )	50.8 ± 2.4	70.2 ± 11.5	74.6 ± 7.5	73.9 ± 11.5	52.9 ± 2.6
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	17.2 ± 1.3	17.8 ± 1.2	21.2 ± 5.0	20.8 ± 3.8	21.6 ± 8.0
Mean corpuscular hemoglobin concentration (%)	28.0 ± 6.1	27.0 ± 4.6	27.0 ± 3.2	31.0 ± 3.1	39.0 ± 9.7

Values are means ± S.D. for groups of 5 mice

Table 3:  
White blood cell parameters (differential counts) of mice administered ARB by gavage for 30 days

Parameter	Dose (mg/mL)				
	0	5	15	50	150
Neutrophils (%)	11.0 ± 2.8	13.0 ± 6.3	11.2 ± 5.1	13.6 ± 8.9	14.8 ± 9.9
Lymphocytes (%)	83.6 ± 2.9	81.0 ± 7.4	83.0 ± 5.0	80.6 ± 9.2	80.0 ± 8.9
Monocytes (%)	4.6 ± 1.9	4.8 ± 1.5	4.2 ± 1.8	4.4 ± 1.7	4.2 ± 1.6
Eosinophils (%)	0.8 ± 1.1	1.3 ± 0.9	1.6 ± 0.9	1.4 ± 1.1	1.3 ± 1.3

Values are means ± S.D. for groups of 5 mice