



DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE DIETA EXPERIMENTAL PURIFICADA, HIPERLIPÍDICA, PELETIZADA, PARA ROEDORES DE LABORATÓRIO.

Palavras-chave: *pellet, hiperlipídica, AIN-93*

Autores:

Letícia Maria Paula da Silva; Julia Bôro de Lima; Camila Venturini Ayres Cunha; Leandro Kansuke Oharomari; Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari; Adelino Sanchez Ramos da Silva; Eduardo Rochete Ropelle; José Rodrigo Pauli; FCA – Unicamp

Maria Cristina Chiarinelli Nucci Mascarenhas; FEA - Unicamp

Chiu Chih Ming; FEQ - Unicamp

Prof. Dr. Dennys Esper Cintra (orientador), FCA – Unicamp

OBJETIVOS DA PESQUISA

- Desenvolver pellet com textura adequada à temperatura ambiente para nutrição animal experimental de camundongos contendo dieta purificada hiperlipídica, satisfatória ao desenvolvimento de obesidade.
- Avaliar a ação de uma dieta contendo microcap e a nova formulação sobre o ganho de peso e comportamento alimentar.
- Avaliar a palatabilidade.
- Produzir pellet comercial, de custo acessível, e que mantenha a segurança e qualidade à pesquisa experimental.

RESUMO

Dietas experimentais são instrumentos fundamentais para o desenvolvimento de diversos tipos de pesquisas com animais de laboratório. **As dietas do tipo “hiperlipídicas” são amplamente utilizadas para o desenvolvimento do modelo experimental de obesidade e outras comorbidades associadas.** Portanto, esse tipo de dieta experimental tem contribuído muito para a compreensão do desenvolvimento e tratamento dessa doença. Entretanto, **algumas dificuldades são comumente encontradas e não superadas durante o processo de elaboração da dieta.** De forma frequente, problemas são apresentados em relação à **textura e consistência adequada.** As dietas experimentais devem ser desenvolvidas baseadas no proposto pelo American Institute of Nutrition (AIN). Contudo, o modelo proposto por esse renomado instituto em 1993, vem recebendo críticas a fim de que possa ser melhorado.

No caso das dietas hiperlipídicas, o elevado teor de gordura implica em **consistência pastosa**, de característica muito amolecida, podendo comprometer o experimento por interferir no consumo alimentar, comportamento do animal, tempo de prateleira da dieta, e higiene da gaiola e da própria dieta. Assim, a proposta desse projeto é o desenvolvimento e melhoramento tecnológico para **adequação da característica de textura da dieta hiperlipídica a fim de formação de pellets duráveis, resistentes e que promovam a manutenção e do hábito de roer**, uma vez que é designada a roedores. Para isso, propomos reformulação sutil dos ingredientes, mas com alteração importante na forma de elaboração da dieta. Por fim, a nova dieta necessitará ser comparada à já existente, no que tange a capacidade de desenvolvimento de ganho de peso, e indução do processo inflamatório tecidual, na mesma dimensão do que já é conquistado pela dieta hiperlipídica tradicionalmente executada no Laboratório de Genômica Nutricional da Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp.

METODOLOGIA DA PESQUISA

Formulações: Foram realizadas ao todo 15 tentativas de formulação, respeitando os parâmetros da AIN-93, variando as quantidades de de sólido, gordura, temperatura, processo e também adição de um aditivo alimentício, Microcap® utilizado na indústria de alimentos, proveniente da empresa Noviga, que apresenta em sua composição amido de milho ou mandioca (modificados ou não) e/ou maltodextrina gorduras vegetais trans free e lecitina de soja. Alterações quais permanecem em sigilo devido ao futuro interesse em realizar o patenteamento através da INOVA Unicamp (FELLOWS, 2006; REEVES, 1993).

Análise de consistência e teste de tensão de ruptura: As formulações teste foram acondicionadas em geladeira comum (4-8 °C) durante 24h após a confecção e levadas em caixa térmica a Faculdade de Engenharia Química da Unicamp (FEQ) para análise em Texturômetro Universal textura TA-TXi (*Stable Micro Systems*, Inglaterra) controlado por microcomputador. Para análise de consistência, os testes foram efetuados através de penetração com cone acrílico de ângulo 45° (45° cone Perspex, código P45C) e foram conduzidos nas condições: distância 10 mm, força 5g, velocidade 2,0 mm/s, tempo 5 segundo, em quintuplicada. Os dados foram tratados com cálculo de média entre duplicatas. Para teste de tensão de ruptura, foi utilizado o probe HDP/3PB - *three point bend rig*, onde o parâmetro avaliado foi de força aplicada ao centro do pellet registrada antes da ruptura, os apoios do probe distanciavam 1,6 cm, distância 15 mm, força 5g e a velocidade de descida da célula foi de 1,7mm/s. Temperatura de análise +- 0,5°C (JORGE, 1999).

Atividade de água: Amostras das formulações, foram levadas ao Laboratório de Lácteos, probióticos e prebióticos (LLPP), masceradas manualmente a fim de aumentar a superfície de contato, em placas menores específicas para a análise no analisador de atividade de água da marca aqualab. Foram realizadas amostras em duplicata, em comparação a dieta controle já realizada no LabGeN. (ARAÚJO, 2005)

Exsudação de óleo: No laboratório de Genômica Nutricional (LabGeN) as amostras foram moldados em pellets do mesmo tamanho (3g), colocadas em papel filtro utilizado da marca inlab, tipo 50 de 9,0 cm, já anteriormente pesados em balança de precisão, e acondicionadas por 4h na estante ventilada onde residem os camundongos (22+2 °C). Após, foi aferido o peso do óleo exsudado bem como a área do óleo exsudado, utilizando a equação da área da elipse, devido a similaridade da forma obtida no papel (MASCARENHAS, 2015)

Modelo animal: Foram utilizados camundongos Swiss, com quatro semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade de Campinas (CEMIB). Os animais foram separados em cinco grupos experimentais, diferenciados pelos tipos de dietas, com 6 animais em cada grupo, sendo mantidos em dieta e água ad libitum por 60 dias, em estantes ventiladas, em ambiente com luz (12h claro/12h escuro) e temperatura (22+2 °C) controladas. Semanalmente, durante o período experimental, serão aferidos o peso e o consumo alimentar. Ao final, os animais serão anestesiados e os seguintes tecidos serão analisados: Dentes, fígado, adiposo (epididimal e inguinal), músculo (gastrocnemio), sangue. Coletaremos as fezes das caixas.

Análise Estatística: A diferença estatística foi analisada utilizando o software prisma, rodamos uma (análise de variância) ANOVA e em seguida do teste de Tuckey, com ($p \leq 0,05$), comparando os resultados de cada uma das formulações com a HF padrão. $P < 0,05^*$ $P < 0,01^{**}$ $P < 0,001^{***}$ $P < 0,0001^{****}$

Figura 1 - Representação da evolução do processo de reformulação



a) Dietas com consistência mole e grudadas após armazenamento; b) Moldagem dos pellets; c) Processamento; d) Pellets com consistência de maior dureza.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Encontra-se na literatura algumas críticas ao atual cenário de confecção de dietas e a sugestão de atualização da AIN-93 (JOSHI, 2021; KLURFELD, 2021; NIELSEN, 2018). Com os testes experimentais, as formulações apresentaram um avanço em relação a dureza do pellet, quando comparadas a dieta hiperlipídica já utilizada no Laboratório de Genômica Nutricional (LabGeN), que apresenta consistência pastosa (Figura 1). Os testes iniciais foram destinados a compreender como a escolha dos materiais se comportam em relação a parâmetros de qualidade, além de como o processamento poderia interferir positivamente na dureza do pellet.

A Análise de Consistência e o Teste de Tensão de Ruptura foram realizados com as amostras que se apresentavam pastosas, a fim de compreender como os ingredientes se comportavam, e obtivemos como resultado que aumentar a % amido dextrinizado ou celulose não ajudaria na dureza, enquanto a granulatura de alguns ingredientes podem interferir aumentando a dureza (figura 2). *Ademais, deve-se tomar cuidado para que as amostras não estejam úmidas durante o teste, pois caso esteja, o resultado será incongruente, logo, será necessário refazer com as amostras peletizadas e para maior diagnóstico fidedigno ao habitat dos camundongos, fixar a temperatura à 22°C.*

As formulações escolhidas e, conseqüentemente, os grupos dos modelo experimental foram, dieta comercial normocalórica da marca nuvilab (A), dieta hiperlipídica

pastosa utilizada anteriormente no LabGeN (B), nova formulação pastosa I (C), nova formulação peletizada I (D), nova formulação peletizada II (E).

O **teste de atividade de água (Aw)** buscou analisar se a adição de água nas novas formulações gerava aumento de água livre e se atingia os pontos ótimos para crescimento de microorganismos (Aw entre 0,6 a 0,9). A dieta B, tem atividade de Aw menor que essa faixa, de 0,57. Já os nossos pellets que adicionamos água tem Aw um pouco maior, entre 0,6 e 0,7 (Figura 3). Isso significa que provavelmente terão menor tempo de prateleira quando comparados a dieta normal. Entretanto, nenhum dos nossos pellets apresentou Aw ótima para o crescimento de fungos (0,7), leveduras (0,8) e/ou bactérias (0,9).

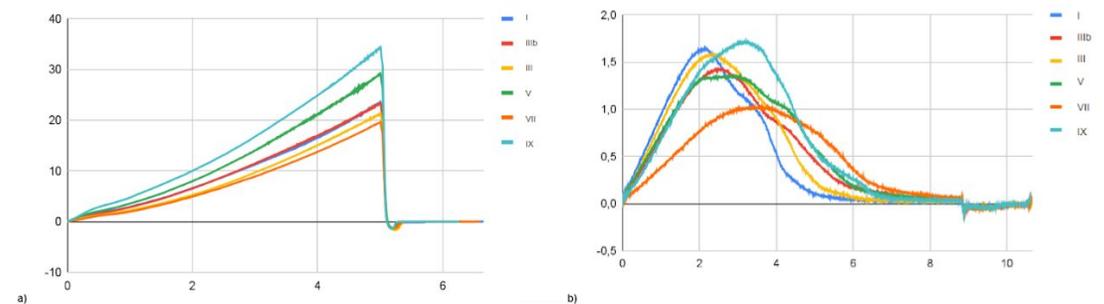
A **Exsudação de Óleo (EO)** é um defeito crítico para diversos produtos alimentícios que geralmente se manifesta durante o tempo de vida de prateleira, o qual ocorre com grande frequência em produtos com uso de misturas de bases lipídicas, pois a fração mais líquida se libera da rede cristalina e migra para a superfície do produto, podendo resultar em oleosidade aparente ou diminuição do tempo de prateleira. O peso de óleo exsudado foi significativamente menor nas formulações peletizadas (D e E) do que nas que se encontram pastosas (B e C), o que demonstra que possivelmente o processo de peletização faz com que a porção lipídica permaneça incorporada à ração (figura 4).

Ademais nota-se aparente EO no pelo dos animais nas dietas B e C, de consistência pastosa (figura 6).

Ao iniciar o tratamento os animais foram distribuídos em decorrência do peso, em grupos de forma que não haja diferença estatística entre grupos (teste t, $p < 0,5$). Após os 60 dias do tratamento dos camundongos Swiss, divididos em 5 grupos, podemos afirmar que houve ganho de peso significativamente maior entre as 3 novas formulações propostas quando comparadas a A, porém, nota-se também, um alto desvio padrão (figura 5a).

O peso do músculo gastrocnêmio do lado direito (figura 5b) foi significativamente menor nos grupos C e D quando comparados a A, ao passo que, o peso do tecido adiposo inguinal direito (figura 5c), foi significativamente maior nos grupos C, D e E, e o peso do tecido adiposo epididimal direito (figura 5d), foi significativamente maior em todos os grupos, quando comparado a A. O que indica provável maior percentual de gordura nos animais tratados com as dietas C, D e E, quando comparados ao A, o que condiz com o aumento significativo da circunferência da cintura das dietas hiperlipídicas quando comparadas com o A (figura 5e). Ademais, não houve diferença significativa entre o índice de Lee, ao comprimento dos dentes e nem em relação ao peso do lóbulo maior do fígado dos animais (figura 5f-g).

Figura 2 - Análise de Textura e Tensão de Ruptura



a) Médias de análise de textura (força x tempo) em temperatura controlada (4-8 °C); b) Média SNAP (tensão de ruptura) em temperatura controlada 4-8°C (força x tempo)

Figura 4 - Avaliação da exsudação do óleo dos pellets

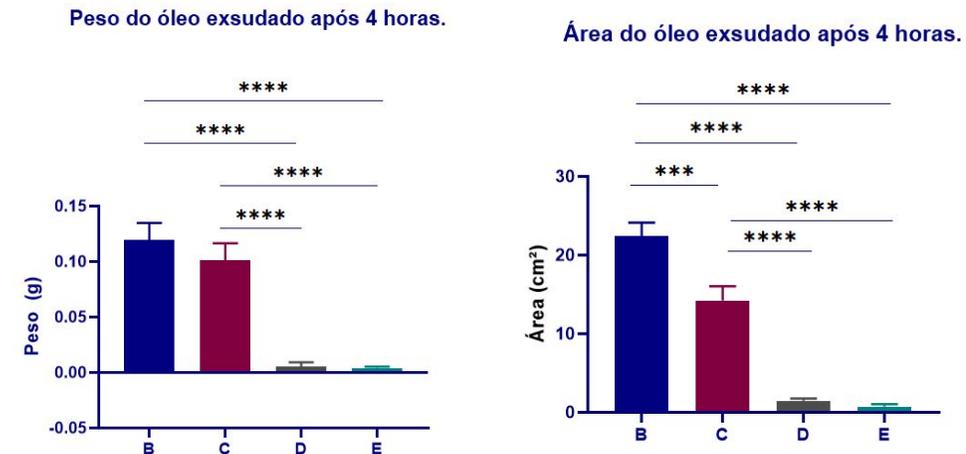


Figura 3 - AW das formulações

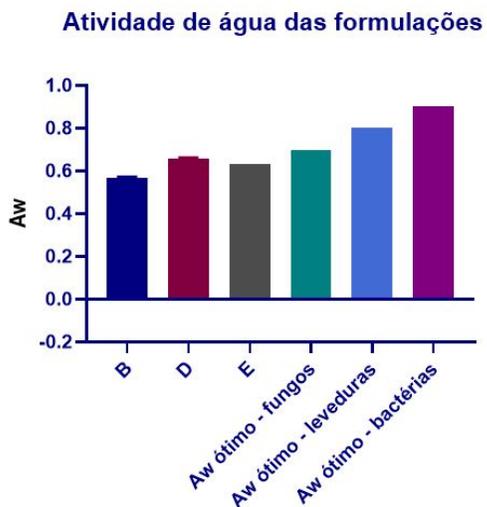
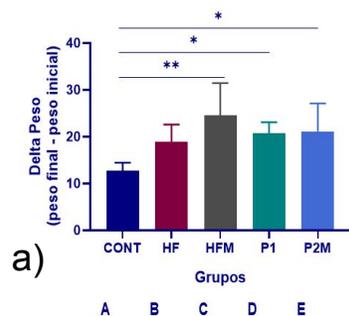
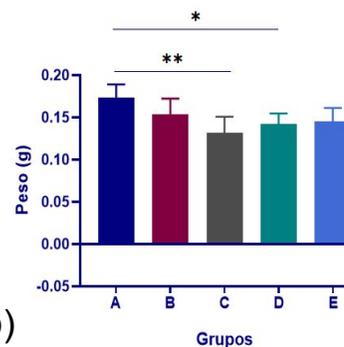


Figura 5 - Avaliação teste *in vivo*

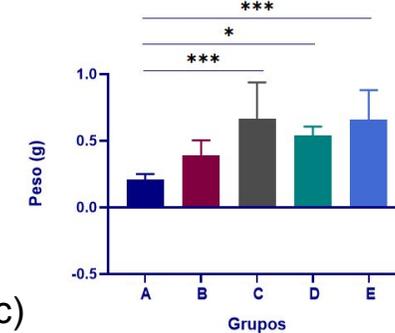
Diferença de peso entre grupos após 60 dias de tratamento, com início aos 28 dias de vida.



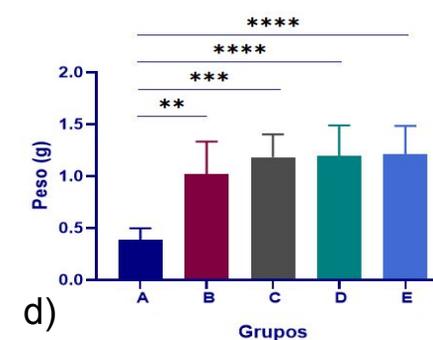
Peso do Músculo Gastrocnêmio



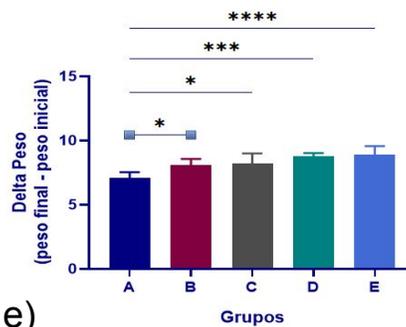
Peso do tecido adiposo inguinal



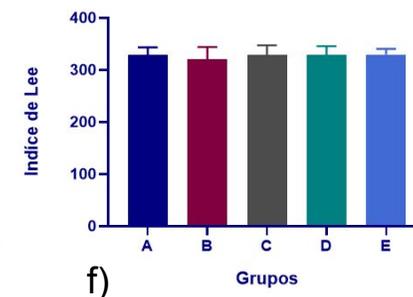
Peso tecido adiposo epididimal



Circunferência da Cintura após 60 dias de tratamento



Índice de Lee



Peso do lóbulo maior do fígado

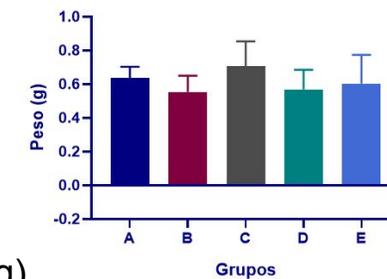
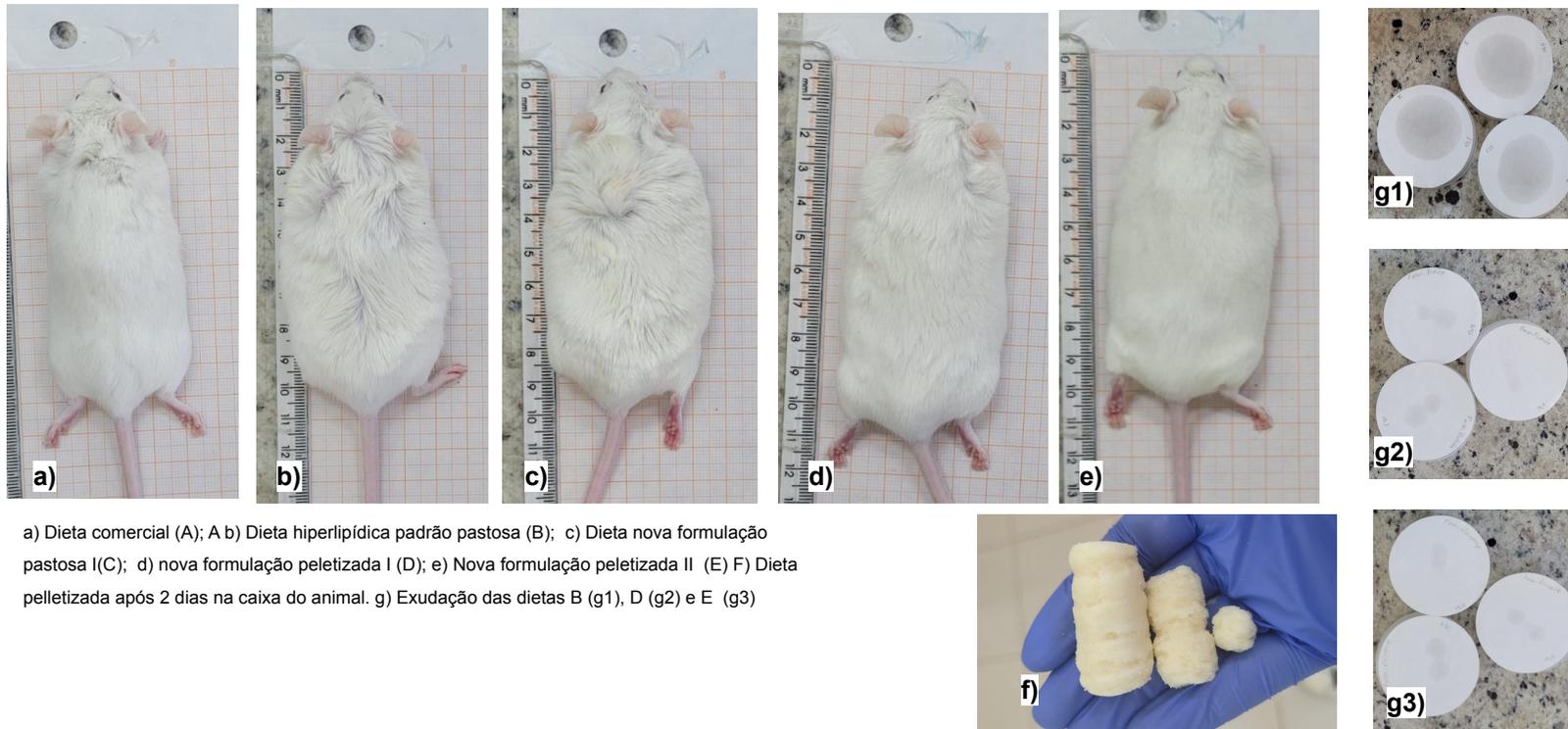


Figura 6 - Exsudação de óleo.



a) Dieta comercial (A); A b) Dieta hiperlipídica padrão pastosa (B); c) Dieta nova formulação pastosa I(C); d) nova formulação peletizada I (D); e) Nova formulação peletizada II (E) F) Dieta peletizada após 2 dias na caixa do animal. g) Exsudação das dietas B (g1), D (g2) e E (g3)

CONCLUSÕES

O desenvolvimento de novas formulações geraram ganho de peso significativo com aumento do percentual de gordura, se distanciando dos resultados da dieta normocalórica, o que indica avanço no intuito de induzir obesidade no modelo animal experimental. Vale destacar que as dietas peletizadas apresentaram resultado comparativo a dieta pastosa, logo, é possível que mesmo na forma peletizada essa dieta provoque obesidade tanto quanto a pastosa, já utilizada em muitos estudos, porém com maior facilidade de manuseio, exportação e armazenamento. No mais, as dietas peletizadas apresentaram menor exsudação de óleo, o que sugere menor contaminação da dieta e maior conservação da porção calórica. No tempo de tratamento deste projeto, não foram observadas alterações significativas na morfologia dentária dos animais. Por fim, são necessários testes biológicos para confirmar sucesso na reformulação da dieta hiperlipídica.

BIBLIOGRAFIA

ARAÚJO, L. F. et al. Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: relação com a umidade ótima para fermentação sólida. Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas. Rev. bras. eng. agríc. ambient. 2005.

FELLOWS, P. J. Tecnologia do Processamento de Alimentos. Princípios e Prática. 2ª Edição, Porto Alegre: Ed. Artmed, 2006.

JORGE, M. C.; R. I.; HOMBRE, R. Evaluation of an instrumental method of texture analysis for quality control of chocolate bars. Alimentaria. v.36, n. 305, p. 73-76. 1999.

JOSHI, T. P.; FIOROTTO, M. L. Variation in AIN-93G/M Diets Across Different Commercial Manufacturers: Not All AIN-93 Diets are Created Equal. J Nutr. 2;151(11):3271-3275. 2021.

KLURFELD, D. M.; GREGORY, J. F.; FIOROTTO, M. L. Should the AIN-93 Rodent Diet Formulas be Revised? J Nutr. 1;151(6):1380-1382. 2021.

NIELSEN, F. H. 90th Anniversary Commentary: The AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents-The Development of a Landmark Article in The Journal of Nutrition and Its Impact on Health and Disease Research Using Rodent Models. J Nutr. 1;148(10):1667-1670. 2018.

MASCARENHAS, C. Produção, caracterização e aplicação de micropartículas de óleos totalmente hidrogenados como sementes de cristalização em sistemas lipídios compostos por óleo de palma. 2015. 277 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.

REEVES, Philip G.; NIELSEN, Forrest H.; FAHEY, George C. Jr; . AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr. v.123, p.1939-1951. 1993.