

RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS DE RATOS APÓS RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL COM DIETA ACRESCIDA DE *Spirulina*

LIDIANE MUNIZ MOREIRA¹; BRUNA DEL SACRAMENTO BEHLING²; MIRIAN RIBEIRO GALVÃO MACHADO³; ROSANE DA SILVA RODRIGUES⁴; LEONOR ALMEIDA DE SOUZA-SOARES⁵

¹Universidade Federal do Rio Grande - lidianemunizmoreira@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – bruna_behling@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – miriangalvao@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – rosane.rodrigues@ufpel.edu.br

⁵Universidade Federal do Rio Grande – leonor.souzasoares@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 30% da população mundial é subnutrida e 40.000 crianças morrem a cada dia devido à desnutrição e doenças relacionadas. Seja qual for a causa da desnutrição, o organismo gera respostas conforme o tempo a que fica submetido à carência de nutrientes. Há décadas a desnutrição protéica vem preocupando autoridades ligadas aos setores de saúde pública, principalmente a Organização Mundial da Saúde (OMS), cujos técnicos têm debatido a descoberta e o emprego de novas fontes de proteína, bem como as normas a serem seguidas para seu uso na alimentação humana (WHO, 2012).

Micro-organismos têm sido constantemente estudados como possíveis fontes protéicas. Cianobactérias tem certas vantagens sobre a utilização frente a outros micro-organismos devido ao seu rápido crescimento, quantidade e qualidade da proteína. Dentre as microalgas, a do gênero *Spirulina* (*Arthrospira*) contém cerca de 60 a 70% de proteínas, ácidos nucleicos e aminoácidos recomendados pela FAO (*Food and Agriculture Organization*). Contém ainda beta-caroteno e ferro absorvível, além de outros minerais, e altos níveis de vitaminas, compostos fenólicos, ácido gama-linolênico e outros ácidos graxos essenciais (VON DER WEID et al., 2000; MOREIRA et al., 2011).

No Brasil, a *Spirulina* é classificada como novo ingrediente e, seu consumo diário recomendado é de 1,6 g/indivíduo (BRASIL, 2009). Segundo BECKER (2007), entre os fatores que limitam o uso de proteína unicelular na alimentação humana está a presença da parede celular, a qual pode influenciar na digestibilidade e absorção, e ainda o alto conteúdo de ácidos nucleicos, cuja ingestão em excesso pode levar ao acúmulo no organismo humano com consequências eventualmente negativas. Dentro deste contexto, esta pesquisa foi delineada para avaliar os efeitos da *Spirulina* na recuperação nutricional de ratos submetidos à desnutrição protéica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material

Para elaboração das dietas foi utilizada a microalga *Spirulina* LEB18 (MORAIS et al., 2008) e os demais ingredientes foram adquiridos em comércio local. Doze *Rattus norvegicus* Wistar, machos, recém-desmamados (21 dias), com peso médio de 70 g ± (Desvio padrão, g) foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Dietas

Três dietas (Tabela 1), baseadas na formulação para roedores em crescimento (AIN93G) descrita por Reeves et al. (1993), foram preparadas semanalmente no

Laboratório de Processamento de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFPel: Dieta controle (C): AIN93G adaptada; Dieta aprotéica (A): sem adição de proteína e dieta S: 8,8% de *Spirulina*. A formulação da dieta controle (C), apesar da recomendação de ingestão de 20% de proteínas para roedores em crescimento, foi adaptada a fim de apresentar 12% deste nutriente, para atender às recomendações do teste de MILLER; BENDER (1955) e Sgarbieri (1996). É importante salientar que para obtenção da dieta (C) com 12% de proteína foram adicionados: 120 g de caseína, já que essa não se apresentava pura (>85% de proteína bruta); o restante dos ingredientes foi adicionado conforme preconizado por Reeves et al. (1993) e o amido de milho adicionado para completar 1000 g de dieta. Para formulação da dieta (S), o cálculo foi baseado na composição proximal da biomassa (Tab. 1), na capacidade de ingestão diária por roedores (SOUZA-SOARES et al., 2009) e na recomendação de consumo diário de *Spirulina* (BRASIL, 2009).

Tabela 1 - Formulação das dietas C (controle), S (8,8% de *Spirulina*) e A (aprotéica)

Ingredientes (g.kg ⁻¹)	Dietas/tratamentos		
	C ¹	A ²	S ¹
<i>Spirulina</i> LEB18 **	-	-	88,0
Caseína (mín. 85% de proteína bruta)	120,0	-	50,5 ³
Óleo de soja	70,0	70,0	63,5*
Mistura de minerais ⁴	35,0	35,0	25,5*
Mistura de vitaminas ⁴	10,0	10,0	10,0
L- cistina	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Farelo de trigo	50,0	50,0	43,5*
Sacarose	100,0	100,0	100,0
Amido de milho ⁵	609,5	729,5	613,5

¹Dieta com 12% de proteína bruta; ²Dieta com 1,5% de proteína bruta; ³Para obtenção de 12% de proteína, valor mínimo necessário ao desenvolvimento de roedores, a dieta S foi suplementada com caseína; ⁴Preparado conforme AIN-93G (Reeves et al., 1993); ⁵Adicionado para completar a dieta; *Descontada a quantidade intrínseca presente na microalga; ** 56% proteína bruta; 7,4% lipídios; 10,7% cinzas, valores obtidos em análise AOAC (2000).

Ensaio *in vivo*

O bioensaio foi conduzido na Sala de Experimentação Animal do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFPel, promovendo-se o conforto bioclimático (ou térmico) e de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, tendo duração de 40 dias, sendo os 10 primeiros destinados à desnutrição dos animais com dieta (A). Após constatação da desnutrição, através da observação da perda de cerca de 10% do peso inicial e da queda de pelos, os 12 animais foram divididos em dois grupos e receberam as dietas (C) e (S) durante 30 dias consecutivos. O protocolo para a condução do ensaio biológico (processo nº 23110.008077/2009-22) foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal da UFPel., com o aval de todos os pesquisadores envolvidos no presente estudo.

Determinações

Ao término do experimento, após os animais serem submetidos a um jejum de 12 h, foi realizada, imediatamente, coleta de sangue por punção cardíaca. Cerca de 1 mL do sangue foi disposto em eppendorf com anticoagulante EDTA e destinado para análise de hemograma em contador hematológico automático (POCH-100iVDiFF, SYSMEX®); o restante centrifugado a 1000g x 15 min a 4°C em tubos de

ensaio para obtenção do soro que foi armazenado a -18°C para posterior análise em avaliador bioquímico LabMax 240 (LABTEST DIAGNÓSTICA S.A.). Foram realizadas análises de variância (ANOVA), seguidas do teste de Tukey para comparação entre as médias num nível de significância de 5% ($P < 0,05$) nos dados obtidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se observar as respostas fisiológicas, bioquímicas e hematológicas dos tratamentos Controle (C) e *Spirulina* (S), presentes na Tabela 2, nota-se que esses só diferiram estatisticamente entre si em relação à variável resposta Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA). O CEA relaciona o ganho de peso total dos animais (em gramas) e o consumo alimentar total (em gramas), portanto, quanto maior o valor, maior a capacidade de nutrição.

Tabela 2 – Respostas fisiológicas, bioquímicas e hematológicas de ratos alimentados com dietas controle (C) e *Spirulina* (S) e valores de referência

Variáveis resposta	Valores de referências	Dietas	
		C	S
Peso inicial (g)	-	56,00±7,80 ^a	54,40±4,95 ^a
Peso final (g)	-	189,35±11,50 ^a	200,00±40,65 ^a
Ganho de peso (g)	-	118,35±13,30 ^a	130,00±34,35 ^a
Consumo alimentar (g)	-	407,95±46,20 ^a	439,20±66,40 ^a
CEA	-	0,18±0,01 ^a	0,25±0,05 ^b
Proteínas totais (g.dL ⁻¹)	5,6 – 7,5*	6,10±0,15 ^a	6,60±0,25 ^a
Ferro (µg.dL ⁻¹)	104 – 279**	93,33±13,25 ^a	116,40±28,35 ^a
Fósforo (mg.dL ⁻¹)	7,96***	10,25±0,95 ^a	10,70±1,70 ^a
Magnésio (mg.dL ⁻¹)	2,13***	2,35±0,40 ^a	2,75±0,65 ^a
Cálcio (mg.dL ⁻¹)	12,34***	11,15±0,55 ^a	11,00±1,05 ^a
Hematócrito (%)	28 – 50**	42,60±0,85 ^a	44,00±1,90 ^a
Hemoglobina (%)	7,2 – 16**	13,85±0,15 ^a	14,75±0,60 ^a
VCM(%)	46 – 60**	59,95±1,75 ^a	60,72±0,50 ^a
HCM (%)	26 – 35**	32,50±0,75 ^a	32,65±0,20 ^a
Eritrócitos (10 ⁶ .mm ⁻³)	7 – 10**	7,10±0,25 ^a	7,25±0,30 ^a

Média de 6 repetições ± desvio padrão; Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as dietas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$); CEA: coeficiente de eficácia alimentar, relaciona ganho de peso (g) e consumo alimentar (g); VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média. ¹Referência 1: Souza-Soares et al., 2009; ²Referência 2: Carvalho et al., 2009; ³Referência 3: Santos et al., 2004

Nesta pesquisa, além da comparação entre a dieta experimental (S) e controle (C), os autores compararam os resultados com três referências encontradas em outros estudos. Como visto na tabela 2, todas as respostas encontradas, com exceção para teor de fósforo, encontram-se próximos dos valores de referência. Comprovando assim, dentro das condições experimentais, a eficiência da proteína em estudo quanto à recuperação nutricional.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho levam a concluir que a dieta com *Spirulina* cepa LEB18 em substituição à caseína, promoveu um desenvolvimento adequado aos animais durante o período experimental, evidenciando a qualidade protéica desta microalga.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao projeto PRÓ-ENGENHARIA da FURG e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro para a realização deste estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis. **Official Methods of Analysis**, 17ª Edição, Washington, D. C., CD-ROM, 2000.

BECKER, E. W. Microalgae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 207–210, 2007.

BRASIL - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - Lista dos Novos Ingredientes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, maio de 2009. Acessado em 01 de jul de 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/legislacao>

CARVALHO, G. D.; MASSENO, A. P. B.; ZANINI, S. F.; PORFIRIO, L. C.; MACHADO, J. P.; MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, v. 56, n. 1, p. 51-57, 2009.

MILLER, D. S.; BENDER, A. E. The determination of the net protein utilization of proteins by a hortened method. **British Journal of Nutrition**, v. 9, p. 382–388, 1955.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE; A. J., MARINS, L. F. F. E J. A. V. COSTA. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 144–150, 2008.

MOREIRA, L. M.; ROCHA, A. S.; GARCEZ, C. L.; RODRIGUES, R. S.; SOUZA-SOARES, L. A. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Spirulina platensis*. **African Journal Food Science**, v. 5, n. 15, p. 799-805, 2011.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H. E G. C. FAHEY 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-76 Rodent Diet. **Rodent Diet**, v. 123, n. 6, p.1939-1951, 1993.

SANTOS, H. B.; MADRUGA, M. S.; BION, F. M.; ANTUNES, N. L. M.; MENDES, K.; ÁGUIDA, R. Biochemical and hematological studies in rats involving mineral bioavailability in a diet supplemented with "multimistura". **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 613-618, 2004. Falta citar

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação**. São Paulo: Editora Varela, 1996. 517p.

SOUZA-SOARES, L. A.; MACHADO, M. R. G. E R. DA S. RODRIGUES. **Experimentação com animais de laboratório: manual básico**. Pelotas: Editora Universitária, 2009. 468p.

VON DER WEID, D.; DILLON, J. C.; FALQUET, J. **Malnutrition: a silent massacre**. Geneve: Antenna Technology, 2000. 13p.

WHO – **World Health Organization**. Acessado em 01 de julho de 2012. Disponível em: <http://www.who.int/en>