

Ingestão de *Wolffia brasiliensis* por camundongos: impacto fisiológico e bioquímico

Palavras-Chave: *Wolffia brasiliensis*, macrófita, biomassa

Autores:

Guilherme H. A. QUEIROZ^{1*}; Grazielle C. STRADIOTTO^{2*}; Daiane S. B. MIGNONI¹; Wenícios F. CHAVES³; Caroline L. COSTA³; Ana Paula SANCHES³; Estela NUNES⁴; Letícia I. S. ZIMMERMANN⁵; Marcio A. TORSONI⁵; Augusto D. LUCHESSI⁶.

1. Iniciação científica, Laboratório de Biotecnologia-InPhyto/FCA-UNICAMP
2. Pós-doutoranda, Laboratório de Biotecnologia-InPhyto/FCA-UNICAMP
3. Doutorando/a, Laboratório de distúrbios metabólicos-Labdime/ FCA-UNICAMP
4. Pesquisadora, Núcleo de Meio Ambiente/EMBRAPA Suínos e aves
5. Professor/a, Laboratório de distúrbios metabólicos-Labdime/ FCA-UNICAMP
6. Professor, Laboratório de Biotecnologia-InPhyto/FCA-UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A lentilha d'água *Wolffia brasiliensis* é uma espécie pertencente à subfamília Lemnoideae, a qual apresenta a maior taxa de crescimento entre os vegetais superiores (Gupta; Prakash 2013). Além disso, sua biomassa apresenta altos teores de proteínas e carboidratos solúveis (Landolt, 1986), sendo uma ótima opção de alimento para a população, pois além de apresentar um grande potencial nutritivo sua produção é de baixo custo (Bhanthumnavin & McGarry, 1971).

Levando esses pontos em consideração, esse projeto tem como objetivo incorporar a lentilha d'água na alimentação de camundongos e avaliar sua aceitação e eventuais efeitos biológicos. Esses dados serão a base para novos estudos e testes para introduzir esse alimento no mercado brasileiro, sendo uma nova fonte proteica a um preço acessível para a população.

METODOLOGIA:

Composição centesimal

A análise da composição centesimal da biomassa de *Wolffia brasiliensis* foi realizada pela empresa Mercolab Laboratórios LTDA (Chapecó – SC), realizando os experimentos referentes a composição de cinzas, lipídeos (método SOXHLET), fibra bruta, proteína (método Kjeldahl), os carboidratos foram medidos por diferença. Adicionalmente, também foi realizado o teste de inocuidade da amostra, para verificar se havia contaminação da biomassa pelo cultivo no meio semi-impactado. (Figura 1).

Biomassa

A *W. brasiliensis* foi cultivada nos tanques do tipo *raceway* em meio nutritivo contendo água residuária suinícola com 30 mg de N-NH₃, que atua como um importante fator de crescimento, na Embrapa de Concórdia-SC. Após a coleta, a biomassa fresca foi drenada por 24 horas, e posteriormente seca em estufa a 50°C, embalada e enviada para a FCA-UNICAMP.

Preparo das dietas

As dietas foram preparadas baseando-se na ração padrão (Reeves, 1997), assim gerando a dieta controle (seguindo a receita padrão), e as dietas incorporadas com a macrófita (W5, W10 e W20), as quais apresentam, respectivamente, 5%, 10% e 20% de sua composição à base de *Wolffia brasiliensis*, realizando as compensações necessárias de acordo com os macronutrientes (carboidratos, lipídios e proteínas) presentes na biomassa. (Figura 2)

Animais

Para o ensaio *in vivo*, foram utilizados camundongos *Swiss* machos (n=60) adquiridos do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). Os animais passaram por 14 dias de adaptação e depois teve o início do estudo da ingestão de biomassa de *W. brasiliensis*. Os animais foram divididos em 4 grupos, um grupo controle (grupo C) recebendo ração padrão (Reeves, 1997) e os demais grupos (W5, W10 e W20) receberam ração contendo diferentes concentrações de *W. brasiliensis* (5%, 10% e 20%). O peso dos animais foi anotado na semana anterior ao início do tratamento e nas 8 semanas subsequentes ao fornecimento das dietas experimentais. O consumo alimentar foi avaliado nas 8 semanas após o início do tratamento (Figura 3).

Os animais foram eutanasiados por injeção intraperitoneal (300ml/kg de Quetamina, 200ml/kg de Xilazina, 200ml/kg de Diazepam) e decapitados. O sangue total foi coletado e coagulado, seguido pela separação em soro e guardado na temperatura de -80°C. O fígado e amostras de tecido adiposo epigonadal, retroperitoneal, mesentérico, iguinal e marrom) foram extraídos e pesados nos respectivos dias (Figura 3).

Teste de GTT

Uma semana antes do dia da extração, foi feito o teste de GTT. Os animais foram divididos em 2 grupos, cada um contendo 6 espécimes de cada grupo, totalizando 30 camundongos por grupos. O experimento foi realizado em cada grupo em dias consecutivos e o peso foi anotado no dia anterior do experimento para realizar o cálculo da glicose injetada em cada animal (peso do animal x 4 µL de glicose). O animal foi mantido em jejum por 8 horas e alimentado por 30 minutos. Depois de ser realimentado, o animal passava por um jejum de 4 horas e em seguida era cortada a ponta do rabo para obtenção de amostra de sangue. Então, após 30 minutos, a glicemia era avaliada com auxílio de glicosímetro, assim marcando o tempo 0, e logo após a medição, a glicose era injetada. Após a administração, a glicemia era medida nos tempos de 15, 30, 60 e 90 minutos.

Teste de ITT

Na semana da extração, foi realizado o teste de iTT. Os animais foram divididos da mesma maneira que no experimento de. O peso dos camundongos foi anotado no dia anterior do experimento para realizar o cálculo da insulina injetada em cada animal (peso animal x 6 μL de insulina). O animal foi mantido em jejum por 8 horas e alimentado por 30 minutos. Depois de ser realimentado, o animal passava por um jejum de 4 horas e em seguida era cortado a ponta do rabo para posterior obtenção de amostra de sangue para análise. 30 minutos depois do corte a glicemia foi avaliada por glicosímetro, assim marcando o tempo 0, e logo após a medição, a insulina foi injetada. Após a administração, a glicemia foi avaliada nos tempos de 5, 10, 15 e 30 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Preparação das dietas

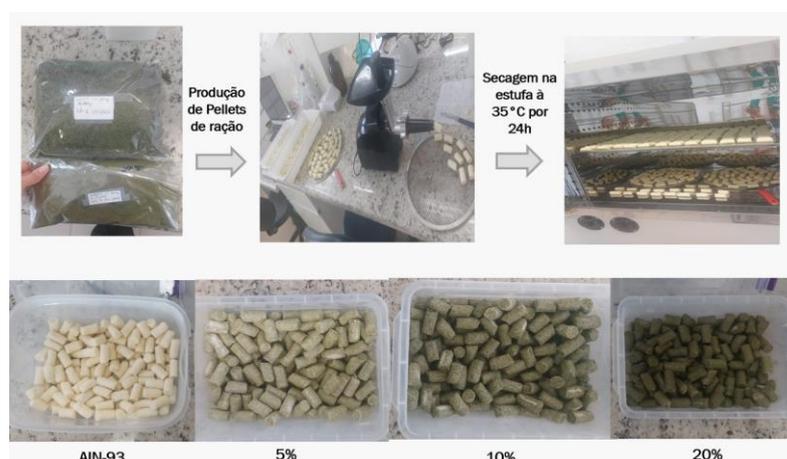


Figura 1: Sequência de preparação das rações. Depois da preparação das rações, elas foram moldadas em formato de *pellets* e levadas à estufa, a 35°C por 24 horas. A seguir, foram armazenadas na geladeira.

Análise centesimal

Com o resultado da análise, verificamos que a biomassa de *W. brasiliensis* apresenta maiores porcentagens de proteína, cinzas e carboidratos. No teste de inocuidade, não foi encontrado presença de *Salmonella* e a contagem de coliformes termotolerantes estava dentro dos parâmetros adequados.

A

ENSAIO	RESULTADO	UNIDADE	LQ	MÉTODO	INÍCIO	FIM
Cinzas	23,45	%	0,25	Gravimétrico / Portaria 108 MAPA	30/11/2023	01/12/2023
Extrato Etéreo SOXHLET	4,60	%	0,50	Gravimétrico / Compêndio, 2013	06/12/2023	07/12/2023
Fibra Bruta	9,50	%	0,4	Gravimétrico / Portaria 108 MAPA	06/12/2023	08/12/2023
Proteína Bruta - Kjeldahl	27,39	%	0,2	Titulométrico / Portaria 108 MAPA	08/12/2023	11/12/2023

B

ENSAIO	RESULTADO	UNIDADE	LQ	MÉTODO	INÍCIO	FIM
Pesquisa de Salmonela	Ausência	25g	-	ISO 6579-1:2017	28/11/2023	01/12/2023
Contagem de Coliformes Termotolerantes	$<1,0 \times 10^{-1}$	UFC/g	10	Manual de Métodos Oficiais	28/11/2023	02/12/2023

Figura 2: Tabelas de análise da composição centesimal e da inocuidade. Na primeira tabela (A) apresenta as porcentagens dos macronutrientes presentes na biomassa da *W. brasiliensis*. Na segunda tabela (B) é mostrada a análise da presença de *Salmonella* e coliformes termotolerantes na biomassa da *W. brasiliensis* crescida em meio levemente impactado.

Animais

Foi encontrado um maior ganho de peso do grupo que ingeriu 10% de *W. brasiliensis* em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). Com os dados de ingestão alimentar, foi visto que todos os grupos que ingeriram a dieta contendo a macrófita, apresentaram maior ingestão quando comparado com o controle ($p < 0,05$).

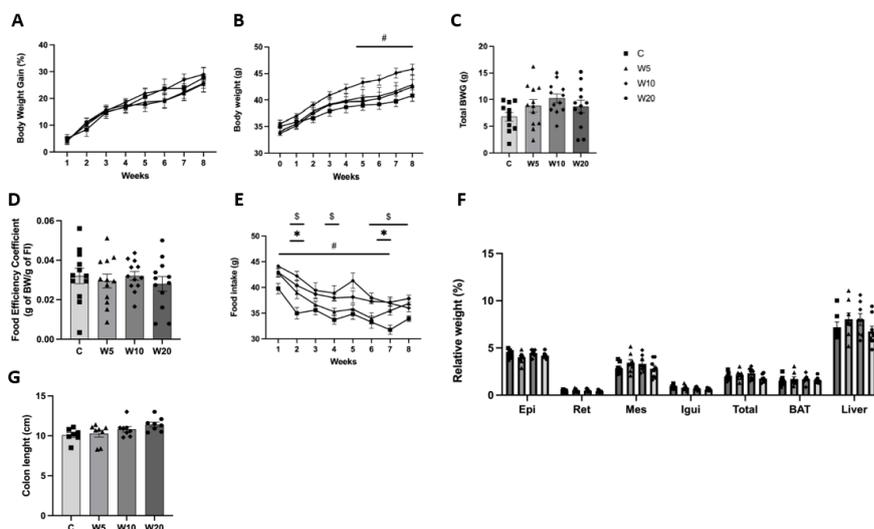


Figura 3: Gráficos de peso de tecido, ganho de peso e ingestão. (A) ganho de peso percentual. (B) ganho de peso em gramas, (#) significa a comparação do C vs W10. (C) Ganho de peso total em gramas. (D) Eficiência alimentar (ganho de peso em gramas/ingestão alimentar em gramas). (E) Ingestão alimentar em gramas, (*) significa comparação do C vs W10, (#) C vs W20 e (\$) W5 vs W10. (F) Peso relativo dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal, mesentérico, inguinal, marrom, tecido adiposo total e fígado. (G) Comprimento do colón.

Com o teste de GTT, foi encontrado na curva glicêmica, uma maior glicemia no grupo W10 quando comparado com o grupo C e W5 ($p < 0,05$). No teste de ITT, o grupo W10 apresentou maior glicemia em jejum quando comparado com o W20 ($p < 0,05$).

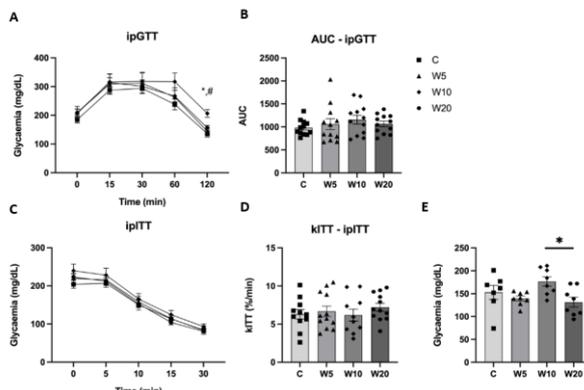


Figura 4: Gráficos de GTT e ITT. (A) Gráfico da curva glicêmica do teste de GTT, (*) significa a comparação de C vs W10 e (#) significa a comparação de W5 vs W10. (B) Gráfico da área sob a curva (C) gráfico da curva glicêmica do teste de ITT. (D) Gráfico da constante de tolerância a insulina (E) Gráfico da glicemia de jejum no ITT, (*) significa a comparação de W10 com W20.

Com os dados das análises do perfil lipídico, foi encontrado redução do colesterol total dos grupos W10 e W20 quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$).

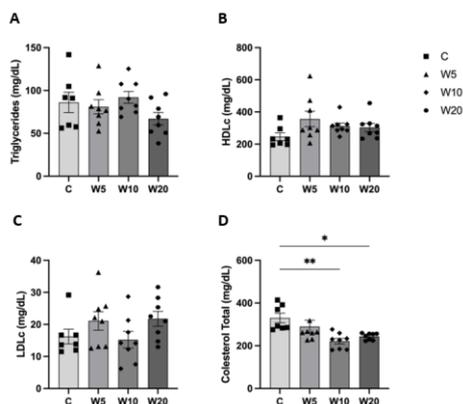


Figura 5: Gráficos do perfil lipídico. (A) Gráfico de triglicérides. (B) Gráfico de HDL. (C) Gráfico de LDL. (D) Gráfico de colesterol total, (*) significa a comparação com W20 e controle, (**) significa a comparação com W10 e controle.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, verificamos que a introdução de biomassa de *W.brasiliensis* na alimentação dos animais não refletiu em perdas nutricionais ou efeitos fisiológicos negativos nos animais que se alimentaram da planta, demonstrando que a planta apresenta capacidade de nutrir as necessidades dos animais que a consumiram, mostrando assim um potencial como fonte proteica de baixo custo para o mercado brasileiro.

BIBLIOGRAFIA

BHANTHUMNAVIN, K., and MCGARRY, M. G. *Wolffia arrhiza* as a possible source of inexpensive protein. **Nature** 232, 495.1971. doi:10.1038/232495a0.

GUPTA, C.; PRAKASH, D. Duckweed: An effective tool for phyto-remediation. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 95, n. 8, p. 1256–1266, 2013.

REEVES, P. G. **Symposium: Animal Diets for Nutritional and Toxicological Research Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet 1,2**. *J. Nutr.* [S. l.: s. n.], 1997.