

Efeito de diferentes tempos de autoclavagem sobre a qualidade nutricional da ração utilizada para ratos (*Rattus norvegicus*) em crescimento

Haroldo Garcia de Faria^{1*}, e Sandra Regina Stabille²

¹Biotério Central, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ²Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

*Author for correspondence.

RESUMO. Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes tempos de autoclavagem na ração utilizada para ratos (*Rattus norvegicus*) em crescimento, bem como verificar a sensibilidade do teste de solubilidade da proteína em KOH como indicador de redução *in vivo* da qualidade da proteína devido a autoclavagem, foram utilizados 300 ratos da linhagem wistar, 150 machos e 150 fêmeas, de 21 a 35 dias de idade, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 tratamentos (cinco tempos de autoclavagem 0, 15, 30, 45 e 60 minutos) e 10 repetições de seis animais por unidade experimental. O peso vivo aos 35 dias, o ganho de peso diário e a conversão alimentar foram prejudicados linearmente com o aumento do tempo de autoclavagem das rações. A solubilidade da proteína das rações em KOH diminuiu de 81,37% para 24,42% quando a ração foi autoclavada de 0 para 60 minutos. Os resultados indicam que a análise da solubilidade da proteína em KOH é um bom indicativo para se verificar o efeito da autoclavagem em rações.

Palavras-chave: Autoclavagem, desempenho, esterilização, rações, ratos Wistar.

ABSTRACT. Effects of different autoclaving times on nutrition quality of diets for growing rats (*Rattus norvegicus*). The effect of different autoclaving times in diets of growing rats (*Rattus norvegicus*) is provided. Similarly, test sensibility is also given with regard to protein solubility in KOH as an *in vivo* reduction indicator of protein quality caused by autoclaving. Three hundred 300 Wistar rats, 150 females and 150 males, were used. Aged from 21 to 35 days, they were distributed in a completely randomized design with 5 treatments (5 times of autoclaving 0, 15, 30, 45 and 60 minutes) and 10 replications of six animals per experimental unit). Live weight at 35 days old, daily weight gain and feed conversion were affected linearly with increasing of autoclaving time of diet. Protein solubility of the diets in KOH decreased from 81.37 to 24.42% when the diet was autoclaved from 0 to 60 minutes. Results indicate that analysis of protein solubility in KOH is a good indication to observe the diet's autoclaving effect.

Key words: Autoclaving, performance, diets, sterilization, Wistar rats.

Um dos principais riscos a que os animais de laboratório estão sujeitos é o da contaminação advinda do meio externo. Este risco pode ser controlado, primariamente, pelo tipo de instalação e por procedimentos como limpeza, lavagem, desinfecção e esterilização.

Um dos procedimentos que merece especial atenção é a ração fornecida, pois a presença de microorganismos na ração pode causar prejuízos aos animais. Neste caso, a eliminação dos microorganismos é necessária. Existem três métodos de esterilização para eliminação de microorganismos

encontrados em rações: fumigação química, calor e a irradiação por raios gama (Ford, 1987).

A esterilização de dietas é essencial e aconselhável para eliminação de germes e patógenos específicos em criações convencionais de animais. A autoclavagem a altas temperaturas, mais que 100°C, com vapor por um tempo suficiente, pode ser efetiva em realizar uma completa esterilização, mas uma exposição excessiva resulta em altas perdas de vitaminas e proteínas (Zimmerman e Wostmann, 1963; Coates, 1984).

Embora a autoclavagem seja um bom método para a eliminação de microorganismos que podem

causar prejuízos aos animais, sua utilização provoca estragos na disponibilidade dos nutrientes, principalmente da proteína, causando sérios danos ao desempenho dos animais.

A esterilização de rações por calor desenvolve-se a uma temperatura de 121°C por 20 minutos e tem sido amplamente utilizada em biotérios, porém apresenta sérios problemas relacionados com a perda ou diminuição do valor nutritivo, particularmente com seu efeito mais acentuado sobre a proteína (desnaturação) e algumas vitaminas (Neves, 1996).

A desnaturação das proteínas resulta em efeitos que podem ser considerados positivos ou negativos. O processamento de alimentos leva à desnaturação de enzimas que contribuem para a deterioração do alimento e apresenta geralmente resultados positivos na sua conservação. A desnaturação também elimina a ação de proteínas naturalmente tóxicas que possam estar presentes nos alimentos.

A desnaturação, não obstante, produz na proteína mudanças de conformação, com abertura das moléculas, podendo, em muitos casos, aumentar a sua reatividade química e dar origem a reações de degradação ou de complexação com outras substâncias do sistema, do que podem resultar alterações na funcionalidade e no valor nutritivo. A presença de pigmentos, carboidratos, substâncias fenólicas e de outras substâncias reativas no sistema, quando este é aquecido, aumenta a probabilidade de deterioração das proteínas. (Sgarbieri, 1996)

A solubilidade da proteína em KOH é relatada como sendo um bom indicador da redução da qualidade da proteína de alguns alimentos, como farelos de soja e de canola (Parsons *et al.*, 1991; Anderson-Hafermann *et al.*, 1993). Esta se baseia na extração e determinação da fração nitrogenada da amostra solúvel em solução de KOH de concentração conhecida e permite detectar a ocorrência ou não de superaquecimento (ANFAR, 1992). Contudo, a capacidade de ser usada como indicador da qualidade da proteína em rações que sofreram esterilização por calor tem sido pouco analisada.

Os objetivos do presente trabalho foram verificar o desempenho de ratos (*Rattus norvegicus*) desmamados, da linhagem *wistar*, alimentados com rações autoclavadas em diferentes tempos e verificar a sensibilidade do teste de solubilidade da proteína em KOH como indicador de redução *in vivo* da qualidade da proteína, devida à autoclavagem.

Material e métodos

Foram utilizados 300 ratos da linhagem Wistar, 150 machos e 150 fêmeas, no período de 21 a 35 dias

de idade, alojados em caixas de polipropileno com dimensões de 40x33x17 cm (comprimento, largura, altura). As caixas foram acondicionadas em uma sala com temperatura controlada, com a média de 21°C. Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco tratamentos e dez repetições, sendo a unidade experimental constituída de seis animais.

A dieta utilizada foi uma dieta comercial para animais de laboratório e sua composição encontra-se na Tabela 1. A autoclavagem da ração utilizada no experimento ocorreu a 121°C em vapor fluido nos seguintes tempos: 0, 15, 30, 45 e 60 minutos. O fornecimento da ração e de água aos animais foi à vontade.

Tabela 1. Composição química da dieta comercial fornecida para ratos da linhagem Wistar, no período de 21 a 53 dias de idade, para verificação do efeito de diferentes tempos de autoclavagem sobre a qualidade nutricional da ração

Nutrientes	%
Matéria seca	89,88
Proteína bruta	22,23
Fibra bruta	5,73
Cálcio	0,92
Fósforo	0,87
Energia bruta (kcal/kg)	3976

Os animais foram pesados no início do experimento com 21 dias de idade e no final do experimento com 35 dias de idade. As rações fornecidas e as sobras também foram pesadas quando da pesagem dos animais. A análise de proteína solúvel em KOH, segundo o método recomendado pela ANFAR (1992), foi determinada no laboratório de nutrição animal da Universidade Estadual de Maringá.

O modelo estatístico utilizado para análise das características de desempenho dos animais foi: $Y_{jk} = \mu + b_1(L_j + L) + b_2(L_j + L)^2 + e_{jk}$, em que:

Y_{jk} = foi o valor observado das variáveis estudadas relativo ao indivíduo k , de sexo j , que recebeu a ração a ração autoclavada no tempo i ,

μ = foi a constante geral,

b_1 = foi o coeficiente linear de regressão da variável Y , em função do tempo de autoclavagem i ,

b_2 = foi o coeficiente quadrático de regressão da variável Y , em função do tempo de autoclavagem i ,

L_j = efeito do tempo i de autoclavagem i sendo $i = 0, 15, 30, 45$ e 60 minutos;

L = média do tempo de autoclavagem i e

e_{jk} = foi o erro aleatório associado a cada observação.

Para análise estatística utilizou-se o SAEG, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa

(1997) e o teste de Dunnett (Vieira e Hoffmann, 1989) para comparação das médias.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos para a proteína solúvel em KOH são mostrados no Gráfico 1. Com o aumento do tempo de autoclavagem, as análises laboratoriais indicaram uma diminuição na solubilidade da proteína em KOH.

As médias de peso vivo aos 35 dias de idade, ganho de peso diário, consumo diário de ração e conversão alimentar, no período de 21-35 dias de idade, de acordo com os diferentes tempos de autoclavagem das rações, são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Peso vivo aos 35 dias, ganho de peso diário e conversão alimentar de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar conforme diferentes tempos de autoclavagem da ração

Sexo	Tempo de autoclavagem (minutos/120°C)					Médias
	0	15	30	45	60	
Peso vivo 35 dias (g)						
Machos	116	112	112	108	104	113
Fêmeas	100	100	99	97	94	98
Médias ¹	108	106	105	102	99*	105
Ganho de peso diário 21-35 dias (g)						
Machos	5,15	5,80	4,60	4,45	4,30	4,84
Fêmeas	4,20	4,20	4,05	4,00	3,85	4,11
Médias ²	4,67	4,50	4,32	4,22*	4,07*	4,47
Consumo de ração diário 21-35 dias (g)						
Machos	12,51	12,12	11,18	11,82	10,96	12,26
Fêmeas	11,21	11,34	11,47	11,16	10,98	11,22
Médias	11,86	11,73	11,83	11,49	11,47	11,74
Conversão alimentar						
Machos	2,42	2,52	2,64	2,64	2,48	2,60
Fêmeas	2,67	2,70	2,83	2,79	2,85	2,76
Médias ³	2,54	2,61	2,73*	2,71	2,81*	2,68

1. Efeito Linear ($P<0,05$) com o tempo de autoclavagem; 2. Efeito Linear ($P<0,05$) com o tempo de autoclavagem; 3. Efeito linear ($P<0,05$) com o tempo de autoclavagem; * - Difere da Testemunha ($P<0,05$) pelo teste de Dunnett

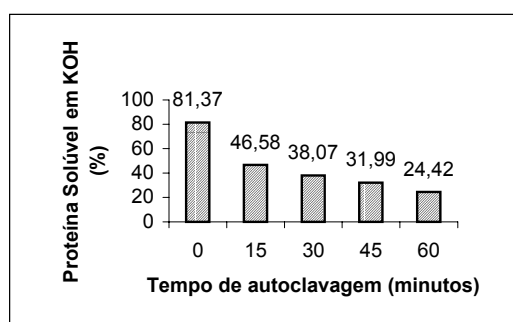


Gráfico 1. Proteína solúvel em KOH em função do tempo de autoclavagem. Fonte: resultados da dosagem de proteínas solúveis em KOH constantes das rações autoclavadas a 121°C por diferentes tempos e fornecidas para ratos Wistar no presente experimento

Avaliadas as características de desempenho, no período de 21-35 dias de idade, aplicando-se o teste de Dunnett, verificou-se que o peso vivo, aos 35 dias, dos animais que receberam ração autoclavada

por 60 minutos foi menor ($P<0,05$) do que o daqueles que receberam a ração controle. O mesmo teste acusou diferença no ganho de peso diário dos animais que receberam rações autoclavadas por 45 e 60 minutos e na conversão alimentar dos animais que receberam ração autoclavada por 30, 45 e 60 minutos quando comparados com os animais que receberam a ração controle.

A análise de regressão demonstrou que o aumento do tempo de autoclavagem prejudicou linearmente ($P<0,05$) o peso vivo aos 35 dias, o ganho de peso diário e a conversão alimentar dos animais no período de 21 a 35 dias.

O resultado obtido nas análises laboratoriais em relação à solubilidade da proteína em KOH é um indicativo do efeito da autoclavagem na redução da qualidade da proteína. Araba e Dale (1990) e Parsons *et al.* (1991), estudando os efeitos do processamento no farelo de soja, afirmaram que a solubilidade da proteína em KOH é um bom indicador na redução da qualidade da proteína.

Em relação ao desempenho, os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com os resultados obtidos com outras espécies animais. Parsons *et al.* (1992), estudando os efeitos do superaquecimento do farelo de soja, verificaram uma piora no desempenho de frangos. Também Anderson-Hafermann *et al.* (1993) constataram uma piora na qualidade nutricional do farelo de canola em função do tratamento térmico.

Zhang e Parsons (1994), estudando diferentes tempos de autoclavagem (0, 30, 60 e 90 minutos) sobre a qualidade nutricional do farelo de girassol, verificaram uma piora na *performance* de frangos.

Zhang *et al.* (1996), avaliando os efeitos do superprocessamento por autoclavagem no farelo de amendoim, autoclavado por 0, 20, 30, 40, 50, 60 e 90 minutos a 120 °C, constataram uma redução de 78% para 56% na proteína solúvel em KOH. Posteriormente, estes farelos foram testados em dietas para frangos e verificou-se uma piora no desempenho produtivo quando o farelo foi autoclavado por mais de 40 minutos.

Pastuszewska *et al.* (1998), trabalhando com farelo e torta de colza aquecidos por 130°C por um período de 0, 10, 20, 40 e 80 minutos, verificaram uma diminuição na proteína solúvel em KOH de 89,2% para 44,6% na torta e no farelo, de 58,6 para 43,4%; os testes *in vivo* realizados com ratos apontaram efeitos negativos do aquecimento no desempenho dos animais.

A piora verificada nas características de desempenho no presente trabalho indica que, provavelmente, ela pode ser atribuída aos produtos formados pela reação

de Maillard durante a autoclavagem da ração, prejudicando a disponibilidade dos nutrientes, principalmente a de proteína, uma vez que o consumo de ração não foi afetado.

Ficou evidente a alteração na ração provocada pela autoclavagem acima de 15 minutos. A ração começou a ficar mais escurecida, sinal claro da referida reação. A reação de Maillard ocorre entre proteínas e açúcares redutores, e leva à formação de pigmentos marrons, resultantes da reação entre a glicose e a glicina. A reação do grupo amino ($-NH_2$) com os grupos carbonilo ($-CHO$) ou cetônico ($-C=$) dos carboidratos redutores ocorre, mesmo em temperaturas relativamente baixas, em virtude da elevada energia de ativação deste tipo de reação (Sgarbieri, 1996).

A reação inativa principalmente a lisina, uma vez que a ligação deste aminoácido com o composto carbonilo torna a ligação peptídica, adjacente ao composto de adição, desta forma resistente à hidrólise pelas enzimas digestivas. O produto final é o escurecimento do produto verificado nas rações autoclavadas e, devido à produção de pigmentos escuros, a reação é também conhecida como reação de escurecimento não enzimático (Sgarbieri, 1996).

Aburto *et al.* (1998), estudando formas de utilizar o farelo de soja que sofreram superprocessamento em frangos de corte, concluíram que o uso pode ser feito desde que haja suplementação com lisina, sendo que os níveis de suplementação seriam em função dos níveis de proteína solúvel em KOH encontrados.

Hurrel (1990), estudando a influência da reação de Maillard sobre o valor nutricional dos alimentos, concluiu que a acentuada queda da digestibilidade pode ser a ela atribuída.

Nas condições em que o experimento foi conduzido, nas quais ficou evidenciada a redução na performance dos ratos, bem como a diminuição na solubilidade da proteína em KOH, podemos concluir que a autoclavagem da ração produz uma diminuição na disponibilidade de proteína para os animais.

O teste de solubilidade da proteína em KOH aplicado em rações autoclavadas se apresenta como um bom indicador da redução da qualidade nutricional da proteína provocada pela reação de Maillard.

Referências

ABURTO, A. *et al.* Strategies for utilizing overprocessed soybean meal: II. Lysine Supplementation. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 7, no. 2, p. 196-201, 1998.

ANDERSON-HAFERMANN, J.C. *et al.* Effects of Processing on the Nutritional Quality of Canola Meal. *Poult. Sci.*, Savoy, v. 72, no. 326-333, 1993.

ANFAR. Proteína solúvel em KOH. In: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E REFORMA AGRÁRIA *Métodos analíticos de controle de alimentos para uso animal*, 1992. p.1-3.

ARABA, M.; DALE, N.M. Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing soybean meal. *Poult. Sci.*, v. 69, p. 76-83, 1990.

COATES, M.E. Sterilization of diets. the germ-free animal in biomedical research. In: COATES M. E.; GUSTAFSSON, B. E. (Ed.). *Laboratory animal handbook*, 9. London: Churchill Livingstone, p.85-90, 1984.

FORD, D.J. Nutrition and feeding. In: *The ufaw handbook on the care and management of laboratory animals*. 6.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987. p. 35-48

HURREL, R.F. Influence of the maillard reaction on the nutritional value of foods. In: *The Maillard reaction in food processing, human nutritional and physiology*. Basel: Birkhauser Verlag, 1990, p. 245-258.

NEVES, S.P. Nutrição. In: *Manual para técnicos em biotério*. 2.ed. São Paulo: Rothschild, 1996. p. 87-107.

PARSONS, C.M. *et al.* Soybean protein solubility in potassium hydroxide: an in vitro test of in vivo protein quality. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 69, no. 12, p. 2918-2924, 1991.

PARSONS, C.M. *et al.* Effect of overprocessing on availability of amino acids and energy in soybean meal. *Poult. Sci.*, Savoy, v. 71, no. 133-140, 1992

PASTUSZEWSKA, B. *et al.* Protein solubility as indicator of overheating rapeseed oilmeal and cake. *J. Anim. Feed Sci.*, Jablona, v. 7, no. 1, p. 73-82, 1998.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: Propriedades, degradações e modificações. 1.ed. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. SAEG. *Sistema de análises estatística e genéticas*. Viçosa, MG, 1997.

VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. *Estatística experimental*. São Paulo: Atlas, 1989.

ZHANG, Y.E.; PARSONS, C. M. Effects of overprocessing on the nutritional quality of sunflower meal. *Poult. Sci.*, Savoy, v. 73, no. 436-442, 1994.

ZHANG, Y.E. *et al.* Effects of overprocessing on the nutritional quality of peanut meal. *Poult. Sci.*, Savoy, v. 75, p. 514-518, 1996.

ZIMMERMAN, D.R.; WOSTMANN, B.S. Vitamin stability in diets sterilized for germ-free animals. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 79, p. 318-322, 1963.

Received on February 12, 2001.

Accepted on March 09, 2001.