

OPTIMIZACIÓN DE TRATAMIENTOS TECNOLÓGICOS APLICADOS EN EL DESARROLLO DE UN ALIMENTO RICO EN ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES PARA MURINOS DE LABORATORIO

Patricia Ruth Romero Vidomlansky*, Narella Antonina Colussi*, Belén Andrea Acevedo**, Juan Pablo Melana Colavita*, Juan Santiago Todaro*, María Victoria Aguirre*

* Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Medicina, UNNE

** Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas, UNNE

RESUMEN

La producción de animales de laboratorio trae aparejado el manejo de dietas para obtener el mejor desempeño metabólico en investigación. Estas dietas deben cumplir cuatro requisitos: ajustarse a las necesidades nutricionales de la especie y edad de los sujetos y ser agradables, permitir su conducta característica de alimentación y estar libres de contaminantes. OBJETIVO: Seleccionar los tratamientos tecnológicos más convenientes para el procesamiento y conservación de cada ingrediente y su mezcla final, en el desarrollo de un alimento rico en ácidos grasos esenciales para ratones de laboratorio. METODOLOGÍA: Se definió una dieta teórica para ratones adultos del Bioterio de la Facultad de Medicina (BBM) mediante tablas de requerimientos nutricionales y composición de alimentos. Se formuló una dieta utilizando ingredientes naturales como fuente de nutrientes específicos. Éstos fueron preparados según tratamiento adecuado al material: esterilización por calor seco (80°C-120')/microondas (100g-1'-1425 MHz)/irradiación UV (254 nm-15') para harina de pescado y alimento final, cocción (100°C-60')/autoclavado (121°C-10') para inactivación de antinutrientes en caupí, molienda/humidificación para solubilización de compuestos bioactivos de semillas. Se elaboró el alimento artesanalmente en forma de pellets, almacenándose hasta su uso. Se analizaron composición centesimal, perfil lipídico y cantidad de antinutrientes. Se realizó el estudio experimental en muestras de ratones Balb/c, contrastando la formulación con dos dietas comerciales para murinos utilizadas habitualmente en el BBM, evaluándose aceptabilidad y desarrollo de los animales por consumo de dieta. Se valoró el crecimiento de los ratones durante 6 semanas, por medición del peso cada siete días. Se pesaron los alimentos ofrecidos al comienzo de la experiencia y una vez por semana para estimar aceptabilidad. Para evaluación del perfil nutricional de los animales se realizaron extracciones de sangre y tejidos. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: Se concluye que el método tecnológico más adecuado para la preparación y esterilización de los pellets es la irradiación UV con envasado al vacío, evitando reacciones de Maillard derivadas de tratamientos con calor seco y microondas. En cuanto al valor nutricional se verificó que el aporte de los distintos nutrientes en el alimento soportó adecuadamente la nutrición de los animales.

Palabras clave: Nutrición animal, Tratamientos tecnológicos, Alimentos funcionales, Bioterio de producción.

ABSTRACT

The production of laboratory animals comes with the diet management, to obtain the best metabolic performance in research. These diets must meet four requirements: adjust to the nutritional needs of the species, the age of the subjects, and be pleasant, allow their normal eating behavior and be contaminant free. OBJECTIVE: Select the most convenient technological treatments for the processing and conservation of each ingredient and its final mixture, in the development of a food rich in essential fatty acids for laboratory mice. METHODOLOGY: A theoretical diet was defined for adult mice of the Bioterium of the Faculty of Medicine (BBM), through tables of nutritional requirements and food composition. A diet was formulated using natural ingredients as a source of specific nutrients. These were prepared according to the appropriate treatment to the material: dry heat sterilization (80 ° C-120 ') / microwave (100g-1'-1425 MHz) / UV irradiation (254 nm-15') for fish meal and final feed, cooking (100 ° C-60 ') / autoclaving (121 ° C-10') for inactivation of antinutrients in cowpea, milling / humidification for solubilization of bioactive seed compounds. The food was elaborated in the form of pellets, stored until its use. Centesimal composition, lipid profile and amount of antinutrients were analyzed. The experimental study was performed on samples of Balb / c mice, contrasting the formulation with two commercial diets for murines habitually used in the BBM, evaluating acceptability and development of the animals by diet consumption. The growth of the mice was assessed for 6 weeks, by measuring the weight every seven days. The food offered was weighed at the beginning of the experience and once a week to estimate acceptability. For the evaluation of the nutritional profile of the animals, blood and tissue extractions were performed. RESULTS AND DISCUSSION: The most suitable technological method for preparation and sterilization of pellets is UV irradiation with vacuum packaging, avoiding Maillard reactions derived from treatments with dry heat and microwaves. Regarding the nutritional value, it was verified that the contribution of different nutrients in the food, support adequately the animal nutrition.

Keywords: Animal nutrition, Technological treatments, Functional food, Productive Bioterio.

INTRODUCCIÓN

La producción de animales de laboratorio trae aparejado el manejo de dietas completas y complejas, tanto en calidad como en cantidad, con el fin de obtener el mejor desempeño metabólico en el trabajo de investigación.⁽¹⁾ Un correcto estado nutricional permite que el animal alcance todo el potencial genético en fases claves, como el crecimiento y la reproducción, y en su longevidad. También le permite presentar respuestas más favorables a factores de estrés ambiental, como pueden ser las situaciones durante un proceso experimental.⁽²⁾

Se deben tener en cuenta cuatro requisitos básicos que deben cumplir las dietas para animales de bioterio: a) deben ajustarse a las necesidades nutricionales de la especie y edad de los sujetos experimentales, b) permitir la manifestación de la conducta característica de alimentación del organismo, c) ser agradables al animal y d) estar libres de contaminantes y toxinas naturales.⁽¹⁾ La formulación de dietas tiene como objetivo fundamental alcanzar las concentraciones ideales de nutrientes -teniendo en cuenta las pérdidas debidas a los procesos tecnológicos de producción y al almacenamiento- las que deben evaluarse mediante el análisis bromatológico del alimento.⁽³⁾

Los resultados de los análisis de calidad de la dieta -tanto los que involucran características del alimento, como los requerimientos de los animales y sus capacidades digestivas y fisiológicas para aprovechar los recursos- permitirían determinar si es necesario adjuntar o disminuir algún nutriente. Igualmente, para que los alimentos puedan certificarse como inocuos, al mismo tiempo de no perder componentes nutricionales esenciales, es necesario realizar distintos tratamientos de esterilización tanto de los ingredientes como de la mezcla elaborada.

Existen varios tipos de dietas que satisfacen los requisitos básicos de alimentación de ratones de laboratorio, las que pueden clasificarse de acuerdo al grado de refinamiento de sus ingredientes. La elaboración de dietas de ingredientes naturales es compleja, ya que se parte de sustancias (alimentarias) con cantidades diferentes de nutrientes.

En su evolución las fórmulas se han solucionado básicamente con dos ingredientes: la harina de maíz y de soja. La harina de pescado permanece como la fuente de proteína más importante, pero se han intensificado las investigaciones para reducir su contribución, aprovechando un mayor número de fuentes vegetales.⁽⁴⁾ Así, la utilización de leguminosas regionales de alto contenido proteico, como los porotos de caupí (*Vigna unguiculata*) variedad colorado, representa una alternativa innovadora en la formulación de un alimento de óptima calidad nutricional.

Las semillas en general, son fuente de compuestos lipídicos. En particular, las semillas de linaza (*Linum usitatissimum*) y chía (*Salvia hispanica*), se caracterizan por un alto contenido de ácido linolénico en su composición.⁽⁵⁾

Sin embargo, la chía, el lino y los porotos de caupí requieren tratamientos tecnológicos previos a su incorporación al alimento, ya sea para aumentar la biodisponibilidad de los componentes bioactivos o para inactivar distintos constituyentes antinutricionales.

Por lo tanto, en el presente estudio se desarrolló un alimento formulado (AF) para ratones de la cepa Balb/c en el Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Medicina, UNNE (LIBiM), se evaluaron las características organolépticas y nutricionales de este AF y sus ingredientes luego de realizar los tratamientos tecnológicos adecuados, y se contrastaron estos resultados con los de dos dietas comerciales para ratas y ratones, utilizadas en forma diaria en el Bioterio de la Facultad de Medicina (BBM).

OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo fue seleccionar el tratamiento tecnológico más conveniente para el procesamiento y conservación de cada ingrediente y su mezcla final, en el desarrollo de un alimento rico en ácidos grasos esenciales de composición controlada para ratones de laboratorio.

Objetivos específicos:

Identificar, a partir de la investigación bibliográfica, las necesidades nutricionales de los ratones albinos.

Determinar el tipo y cantidad de los ingredientes que van a formar el alimento, capaces de ser procesados de manera conveniente y con las proporciones adecuadas de nutrientes, para el crecimiento, reproducción y salud de los ratones del LIBiM.

Lograr el procesado más conveniente de estos ingredientes y la mezcla más eficiente en cantidad y calidad.

Comparar la aceptabilidad y adecuación del alimento formulado con dos dietas comerciales para ratas y ratones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para formular el AF se utilizaron distintos ingredientes naturales, cada uno como fuente de nutrientes específicos: Como fuente de lípidos: Grasa animal*, aceite de girasol*. Ácidos grasos esenciales y fibras: Semillas de chía* y lino* provenientes de Córdoba. Proteínas, minerales y fibras: Harina de pescado de río (Frigorífico Puerto Las Palmas SA), porotos de caupí cultivados en Formosa (Instituto de Tecnología Agropecuaria-INTA), leche descremada en polvo*. Carbohidratos: Almidón de maíz*. *comercial

La secuencia de obtención del alimento fue la siguiente: Se definió una dieta teórica para ratones adultos del BBM, mediante tablas de requerimientos nutricionales y composición química de los ingredientes. Se prepararon y molieron los ingredientes, según tratamiento más conveniente. Seguidamente se pesaron y se mezclaron manualmente con agua (25°C) en cantidades adecuadas, hasta mezcla homogénea. La masa obtenida se porcionó manualmente en forma de pellets de aproximadamente 1 cm de diámetro y 4 cm de largo. Se realizó el secado de los pellets en equipo deshidratador de alimentos (Blanik, 250W) a 55°C durante 20 hs. y se esterilizaron. Se almacenaron hasta su uso en bolsas de plástico selladas, de 0,5 kg. c/u.

Análisis químicos: Se realizaron análisis de composición centesimal en el LIBiM y complementariamente en el Laboratorio de la Dirección de Bromatología del Chaco. El perfil lipídico se analizó por cromatografía gaseosa en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Cs. Veterinarias-UNNE, luego de la extracción lipídica según el método Black and Drier y metilación. La cantidad de antinutrientes de los porotos fue relevada de M.Avanza et al⁽¹⁾, Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UNNE.

Tratamientos tecnológicos utilizados: Esterilización de harina de pescado y AF: Se utilizaron 3 métodos: a) Estufa 80°C-120 min, b) Microondas, 100 g en vaso de precipitado (frecuencia de onda: 1425 MHz) llegando a una temperatura de 95°C en el centro geométrico⁽⁶⁾ y c) Irradiación UV (254 nm) rotando el material cada 15 min para que la luz acceda a toda la superficie. Preparación de semillas de chía y lino: Se compararon 2 métodos: a) sumersión de las semillas en agua 1:2 (P/V), hasta formación del gel mucilaginoso (30 min) y b) molienda de 10 g de semilla seca en molinillo de café eléctrico (Peabody Pe-mc9100-180W) durante 2 min. b) molienda anterior sumada a una hidratación en agua 1:10 (P/V) hasta lograr mezcla homogénea. Inactivación de antinutrientes del caupí: Datos recavados de M.Avanza et al.⁽¹⁾ a) Autoclavado de los porotos 121°-10 min 1:10 (P/V), b) Cocimiento en agua hirviendo (100°C) por 60 min 1:10 (P/V), seguido en ambos casos por un secado en deshidratador de alimentos a 55°C por 20 hs.

Estudio experimental: Se realizó el estudio experimental en distintas pruebas de comparación de formulaciones, en muestras de ratones del BBM, en los que se evaluaron aceptabilidad y desarrollo de los animales por consumo del AF, comparado con dos alimentos comerciales (marcas: Cooperación y Ganave), consumidos diariamente en el Bioterio. De acuerdo a los resultados de cada prueba se realizaron modificaciones en la composición de la dieta, ya sea para aumentar la nutritividad o mejorar la aceptabilidad. El muestreo de los animales se realizó a través de conglomerados por sexo, seleccionando los sujetos al azar simple. Se incluyeron ratones sanos de 28 días que no recibieron ningún tipo de tratamiento o intervención. Los ratones fueron alojados colectivamente en cajas de plástico (n=4/caja) durante el ciclo día/noche, y fueron alimentados ad libitum con el AF y los comerciales. La provisión de agua, previamente autoclavada, se realizó con el mismo regimen. Se evaluó el desarrollo de los ratones durante 6 semanas en cada prueba, por medición del peso una vez por semana. Se pesaron los alimentos ofrecidos al comienzo de la experiencia y luego cada 7 días (aproximación a la centésima de gramo) para, de acuerdo a la cantidad consumida diariamente, estimar aceptabilidad en comparación con las dietas comerciales. Para evaluación del perfil nutricional de los animales se realizaron extracciones de sangre y tejidos. Se analizaron, en laboratorios de la Facultad de Veterinaria: glucemia, colesterol, triglicéridos, HDL,

LDL, proteínas totales, albúmina, globulina, leucocitos y uremia, y se realizaron estudios histopatológicos en muestras de hígado, riñón, estómago e intestino.

RESULTADOS

De acuerdo a la penetración del sistema esterilizante, la irradiación UV no serviría para el caso de la harina de pescado. Sin embargo, para el AF la presentación de reacciones de Maillard tanto en estufa como en microondas la hace el método más eficiente. Así también, para la harina de pescado lo es el calentamiento en microondas.

Tabla 1: Esterilización de harina de pescado y AF.

ESTERILIZACIÓN PARCIAL (HARINA DE PESCADO) Y FINAL DE LA DIETA			
	Estufa 80°C-120 min	Microondas 1425 Hz-1 min	UV 254 nm-15 min
Penetración de la esterilización	Volumen	Volumen	Monocapa
Reacción de Maillard	Si	Aparición tardía	No

Figura 1: Preparación de semillas de chía y lino.

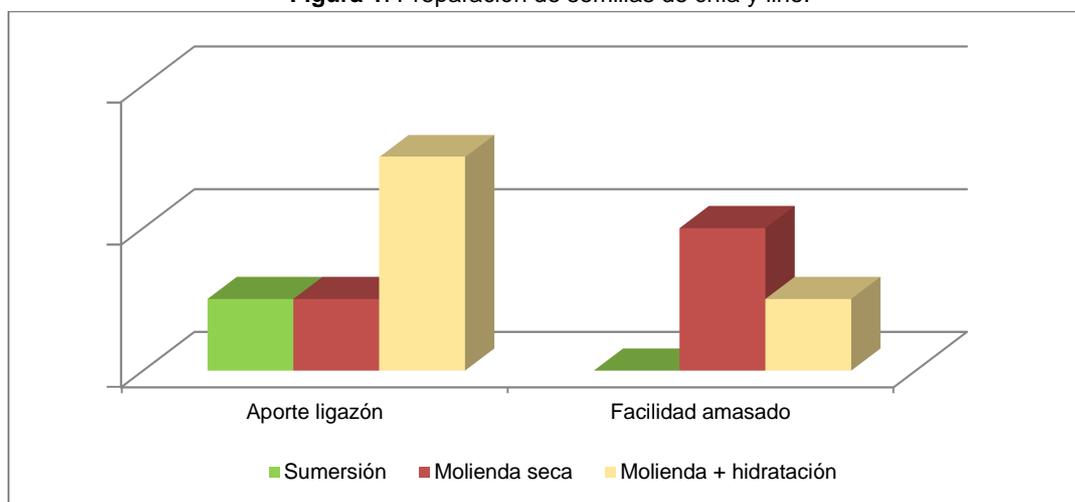


Tabla 2: Inactivación de antinutrientes del caupí.

TRATAMIENTO DE LEGUMBRES (CAUPI)		
	Autoclave 121°C-10 min	Cocción 100°C-60 min
Desprendimiento de cáscara	50%	25%
Solubilización de componentes	30%	10%

A pesar de que ambos procedimientos lograron disminuir significativamente los antinutrientes y la conservación de proteínas fue similar, las pérdidas de fibras y carbohidratos por el autoclavado fue mayor.

Tabla 3: Crecimiento de los animales.

PESO PROMEDIO SEMANAL DE LOS ANIMALES EN LOS TRATAMIENTOS						
	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 5	Sem 6
Com 1	24.7	25.4	27.0	28.0	28.1	28.7
Com 2	29.4	30.8	31.5	32.8	33.6	33.4
Dieta	26.5	27.0	27.7	28.0	28.7	29.1

Tabla 4: Aceptación y adecuación del alimento formulado.

ACEPTACIÓN Y ADECUACIÓN DEL ALIMENTO			
	Dieta (g)	Com 1 (g)	Com 2 (g)
Consumo semanal	112.7 ± 15.6	104.7 ± 14.1	146.2 ± 38.6
Aumento de peso	28.0 ± 0.9	27.0 ± 2.1	33.2 ± 1.0

El consumo de alimento fue similar entre el alimento desarrollado y el comercial 1. Al igual que los análisis bioquímicos e histopatológicos de los ratones, los que indicaron adecuación al crecimiento de los animales. Sin embargo, el alimento comercial 2 fue consumido en mayor cantidad y desarrolló obesidad en los ratones.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Tomando como base las Disposiciones para la Alimentación de Animales de la Red Colombiana de CICUALes, y de acuerdo al tipo y cantidad de ingredientes naturales elegidos para la formulación, el alimento desarrollado cubre los requerimientos nutricionales del ratón Balb/c de manera adecuada y suficiente.

Como expusieron Grau y col. y Avanza y col. en sus investigaciones, luego de realizar diversos tratamientos de esterilización y eliminación de antinutrientes, se tomaron como fuente de proteínas y minerales a la harina de pescado y al caupí para la formulación de este alimento.

Luego de establecer los límites de temperatura admisibles por el material de acuerdo a un trabajo realizado en la Un. Politécnica de Valencia, se destaca la eficiencia de los tratamientos tecnológicos de esterilización por microondas (100g-1 min) para la harina de pescado, de irradiación UV para el alimento elaborado, de molienda + hidratación para las semillas y de cocimiento del caupí (100°C-60 min), lo que resulta en la selección de los mismos para el desarrollo y formulación de esta dieta formulada para murinos de laboratorio.

El alimento desarrollado fue aceptado por los ratones en forma similar a los alimentos comerciales y fue adecuado para mantener su tasa de crecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Red Colombiana de CICUALes. Alimentación de Animales de Laboratorio. Guía para el alojamiento y cuidado de animales. Disposiciones Generales para la Alimentación de Animales. Noticias de la Red. 2015.
2. Ayala Riveros JC, Sarmiento AP, Bernal LA. Evaluación de dos tipos de dieta en la producción de la especie *Mus musculus* en el bioterio del Bioparque Wakatá. Universidad de LaSalle. Colombia. 2015.
3. Jiménez P, Masson L, Quitral V. Composición química de semillas de chía, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Rev Chil Nutr* Vol. 40, Nº2, Junio 2013.
4. Graü de Marín C, Marval H, Zerpa de Marcano A. Utilización de la harina de pescado en la formulación de alimentos para crecimiento y engorde animal. *Elaboración de productos agrícolas*. INIA Divulga 10 ene-dic 2007.
5. Avanza M, Acevedo B, Chaves M, Añón M. Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments: Principal component analysis. *Food Science and Technology* 51 (2013) 148-157.
6. Zona OAT. Aplicaciones de la tecnología de microondas a la desinsectación en los sectores: cárnico y de restauración de bienes culturales. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, 2012. ISBN: 978-84-8363-905-4.