

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO DO PROJETO: “Produtos derivados de banana (*Musa paradisiaca*) e sua influência na tolerância à glicose e na fermentação colônica”.

PESQUISADORA: Giselli Helena Lima Cardenette

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Elizabete Wenzel de Menezes

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP

FINALIDADE DO PROJETO: Doutorado

PARTICIPANTES DA ENTREVISTA: Giselli Helena Lima Cardenette

Júlia Maria Pavan Soler

Lourdes Contreras Montenegro

Lúcia Pereira Barroso

Robson Lunardi

Tathiane Alves Nunes Pereira

Tatiana Terabayashi Melhado

DATA: 29/03/2005

FINALIDADE DA CONSULTA: Discutir o planejamento do experimento e dimensionamento da amostra. Obter auxílio na montagem do banco de dados.

RELATÓRIO ELABORADO POR: Robson Lunardi

Tathiane Alves Nunes Pereira

1. Introdução

Dietas com baixo teor de gorduras e que produzam baixa resposta glicêmica geralmente incluem alto teor de carboidratos como fibra alimentar e amido resistente. Essas dietas diminuem o risco de doenças crônicas como diabetes do tipo 2 e doenças vasculares (ver CERDENETTE, 2004).

O amido resistente parece ter uma função no organismo humano semelhante à da fibra alimentar, isso porque parte dele não é absorvida no intestino delgado. Este amido pode ser encontrado em produtos de banana, como a massa de banana verde (MBV) e o amido de banana verde (ABV).

A fibra alimentar e o amido resistente (AR) fazem parte de uma fração resistente à digestão e absorção no trato gastro-intestinal superior, chamada fração indigerível.

Neste projeto estuda-se o efeito desses produtos derivados de banana em dois tipos de experimentos: o primeiro, *in vitro* (fermentação *in vitro*) é planejado para prever respostas fisiológicas aos carboidratos em estudo e o segundo, *in vivo*, no qual espera-se avaliar o efeito de rações contendo quantidades diferentes de fração indigerível sobre a glicemia, a tolerância à glicose, a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no ceco e seus efeitos locais (parede do ceco) ou sistêmico (quando chega ao sangue e se distribui pelo corpo todo do animal).

O objetivo da consulta foi discutir o dimensionamento da amostra e propiciar auxílio na montagem do banco de dados que armazenará as medidas coletadas.

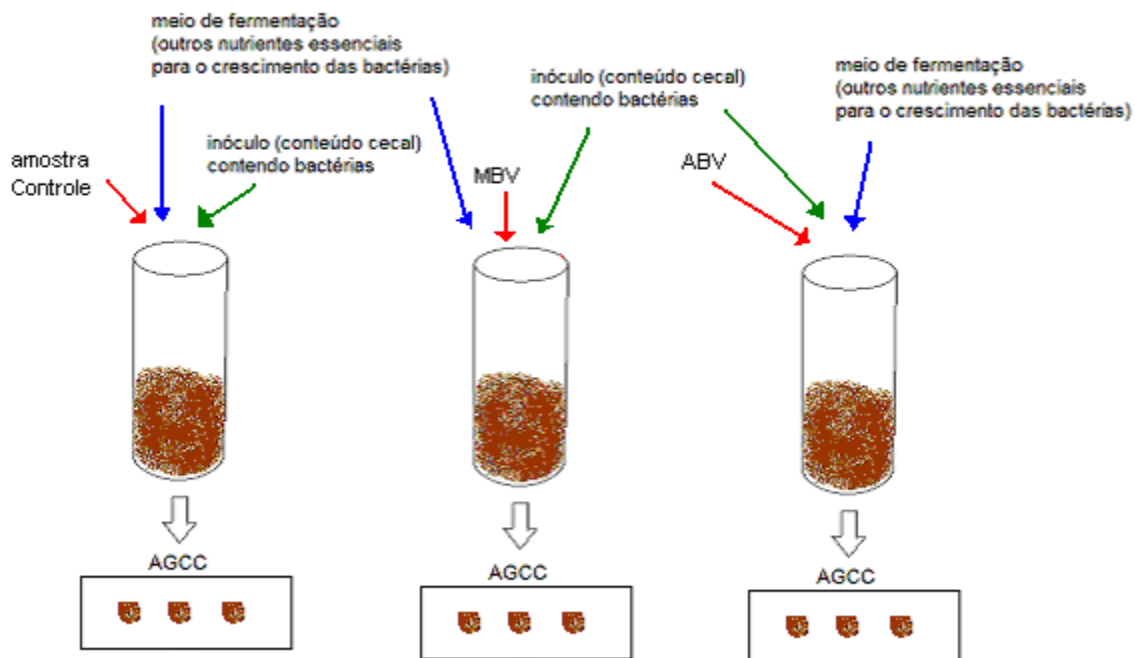
2. Descrição do estudo

O experimento foi dividido em duas partes:

- *in vitro*: a fermentação *in vitro* é avaliada utilizando o conteúdo cecal (inóculo ou fezes) dos ratos com 10 semanas de vida criados com ração comercial sem qualquer controle como fonte de bactérias para fermentar as amostras (MBV e ABV) e produzir o AGCC produzidos.

De 3 ou 4 animais já mortos (os que não participaram do experimento *in vivo*) são colhidas amostras de conteúdo cecal. Dentro de um tubo de ensaio é simulado o organismo do animal, ou seja, é feita a fermentação das amostras utilizando-se reagentes químicos para prever as respostas fisiológicas aos carboidratos em estudo como na Figura1 a seguir.

Figura 1: Simulação do organismo animal.



Em três lâminas são distribuídos triplicatas (três réplicas) para cada grupo de amostra (controle, ABV e MBV) para serem analisadas.

- *in vivo*: por limitações do espaço onde os ratos são alojados, o experimento se repetirá por 2 vezes, ou seja, serão 2 etapas (Etapa I e II) cada uma com 28 dias, iniciando com 48 ratos de aproximadamente 100g e 5 semanas de vida (número de ratos que acredita-se ser maior que o necessário, pois os ratos podem morrer durante o experimento).

Em cada etapa, os 48 ratos selecionados serão divididos em 3 grupos de 16 ratos, sendo que um grupo é alimentado com ração controle, um grupo alimentado com ração

contendo amido resistente de massa de banana verde (MBV) e o outro com ração contendo amido de banana verde (ABV).

As amostras de ABV e MBV serão preparadas e caracterizadas quimicamente com o menor tempo de antecedência possível ao preparo das rações.

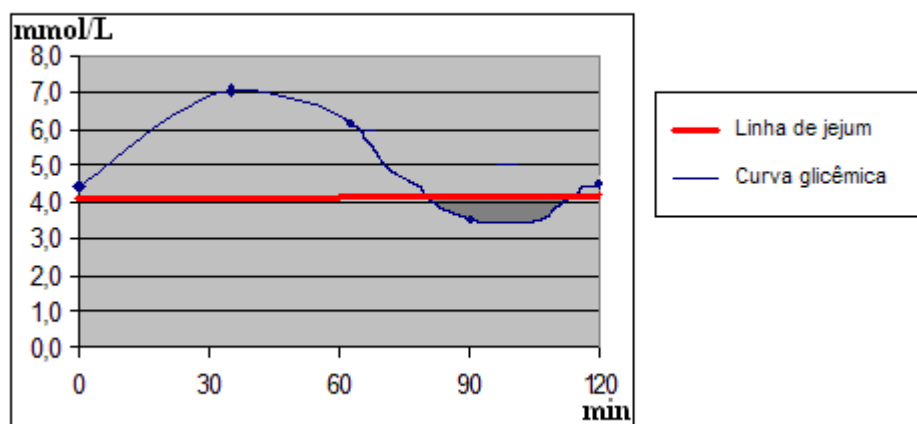
Após uma semana de adaptação aos gaioleiros metabólicos, ainda consumindo ração comercial (rações comuns em biotérios), os animais serão divididos nos 3 grupos de modo que a média do peso de cada grupo seja semelhante e assim receberem as dietas experimentais (com ABV, MBV ou controle).

Nos dias 0 (antes de receber as rações experimentais), 14^o e 28^o, será mensurada a glicemia dos animais nos instantes 0, 30, 60, 90, 120 minutos (ver Apêndice B).

Com os dados de cada tomada de sangue (nos dias 0, 14^o e 28^o dia) é construída uma “curva glicêmica” (ver Figura 2). Após a construção, será calculada a área abaixo desta curva, desconsiderando a área que estiver abaixo da linha de jejum (em tom mais escuro), e assim compará-los.

Espera-se uma diferença nas áreas ao compararmos o grupo controle com os grupos que foram alimentados com MBV (massa de banana verde) e ABV (amido de banana verde).

Figura 2: Exemplo de uma “curva glicêmica” para umas das condições de avaliação.



Na 5ª semana do experimento *in vivo* é realizado um GTT (*glucose tolerance test*), que consiste em construir uma curva glicêmica juntamente com uma curva insulinêmica ao longo de 60 minutos (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60), em resposta a uma dose fixa de glicose por 100g de peso corporal. Também nesta semana é mensurado o perfil lipídico (Colesterol total, Colesterol HDL, TGAs em mmol/L), lembrando que são medidas retiradas do sangue na 5ª semana quando os animais são sacrificados.

A pesagem será feita em dias intercalados.

As fezes serão coletadas nos primeiros 4 dias de cada semana (ver cronograma no Apêndice B) e avaliada a média do seu peso úmido (integral) e seco (após passar por uma estufa por 48 horas a 105°C).

Na 5ª semana os ratos são mortos para realizar o GTT, perfil lipídico (necessita-se de grande quantidade de sangue, por isso o animal é sacrificado). A fermentação com determinação de AGCC produzidos (% e/ou mmol/l) no final do experimento *in vivo* também é medida a partir do conteúdo cecal do animal sacrificado.

Para mais detalhes, ver o cronograma do experimento *in vivo* no Apêndice B.

Por questão de viabilidade, a fermentação *in vitro* será realizada somente no fim do experimento *in vivo*.

3. Descrição das variáveis

As variáveis do projeto estão definidas conforme o tipo de experimento.

Para o experimento *in vitro*, as medidas a seguir são observadas nas amostras (MBV e ABV) antes de fazer a fermentação:

- Teor de amido resistente (%);
- Teor de amido total (%);
- Digestão do amido (%);
- Fração indigerível (mg).

Com a fermentação *in vitro* obtém-se:

- Produção de AGCC produzidos (% e/ou mmol/l).

No experimento *in vivo*, as medidas a seguir são feitas em amostras de sangue do animal vivo:

- Resposta glicêmica (mmol/l).

Na 5ª semana (sacrifício) do experimento *in vivo* tem –se:

- GTT (resposta insulinêmica (mmol/l) e a resposta glicêmica (mmol/l));
- Perfil lipídico (Colesterol total, Colesterol HDL, TGAs) (mmol/l).

Do ceco, serão avaliados:

- Produção de AGCC (% e/ou mmol/l);
- Histologia cecal (figuras e/ou %).

Para evitar variações indesejáveis na medida dessas variáveis será controlada a temperatura (aproximadamente constante a 22°C) no biotério, ciclo claro-escuro a cada 12h, entre outras condições:

- Horário da coleta dos dados;
- Forma de coleta de sangue (da veia do rato anestesiado ou da cauda);
- Consumo ad libitum (“ad libitum” significa “à vontade”, ou seja, os animais podem comer a quantidade que quiserem em gramas);
- Volume de fezes (semana i, onde i = 0, 1, 2, 3 e 4).

4. Situação do projeto

A pesquisa *in vivo* está sendo realizada e encontra-se na segunda etapa. Parte das análises e caracterização química das amostras (ABV e MDV) já foram realizadas e a fermentação *in vitro* será feita ao final da 2ª etapa do experimento *in vivo*. Os dados estão armazenados em diversas planilhas do Excel.

A previsão da conclusão do projeto é entre julho e agosto de 2005.

5. Sugestões do CEA

5.1. Dimensionamento da amostra

Para análise estatística da curva glicêmica e da insulinêmica (área sob a curva) é apropriado adotar um modelo ANOVA para dados longitudinais. O modelo, suas suposições e mais detalhes podem ser encontrados em Andrade e Singer (1986).

Elegendo-se uma variável de interesse principal no estudo, o dimensionamento da amostra neste tipo de experimento tem a finalidade de se obter um tamanho suficientemente grande para que diferenças importantes entre médias desta variável, do ponto de vista biológico, sejam detectadas com alta probabilidade e também se evitar que a amostra seja exageradamente grande (Neter et al., 1996, Seção 26.4).

Tabela 1: Tamanho amostral para cada grupo.

		$\frac{\Delta}{\sigma} = 1$	$\frac{\Delta}{\sigma} = 2$
α	$1-\beta$	n	n
0,1	0,7	13	4
	0,8	17	5
	0,9	22	7
	0,95	27	8
0,05	0,7	17	5
	0,8	21	6
	0,9	27	8
	0,95	32	9
0,01	0,7	25	8
	0,8	30	9
	0,9	37	11
	0,95	43	12

Consideramos os parâmetros: r (número de grupos, neste caso = 3), valor de α (probabilidade do erro tipo I), poder do teste ($1 - \beta$), Δ (diferença mínima das médias da

variável de interesse entre os grupos, a ser detectada com alta probabilidade) e σ o desvio padrão da variável. Podemos também expressar Δ em k desvios padrão.

Calculamos então $\frac{\Delta}{\sigma}$ da seguinte maneira: $\frac{\Delta}{\sigma} = \frac{k \times \sigma}{\sigma} = k$, onde k é a magnitude da diferença mínima especificada em unidades de desvios padrão.

Na Tabela 1, apresentamos diversos tamanhos amostrais calculados para $k=1$ e $k=2$. Cabe à pesquisadora fixar o nível de significância (α) e o poder do teste ($1-\beta$), obtendo assim o tamanho amostral para alcançar o objetivo proposto, considerando as limitações logísticas, operacionais e de custos da coleta dos dados.

Como exemplo, considere $\alpha = 0,01$ e $1-\beta = 0,8$, $k=2$ que resulta no tamanho amostral 9 para cada grupo. Como trata-se de um estudo longitudinal, podendo ocorrer perda de animais ao longo do experimento, recomenda-se incluir alguns animais adicionais.

5.2. Banco de dados

Os dados coletados nos experimentos *in vivo* e *in vitro* podem ser registrados em 2 planilhas cujo formato é sugerido no Apêndice A. Tal formato possibilita armazenar todas as variáveis medidas no estudo permitindo uma possível análise simultânea das diferentes variáveis e etapas do estudo. Sugere-se, por exemplo, os recursos do MS-Excel para inserção dos dados. Se não for possível devido à complexidade do experimento, a pesquisadora pode optar por diferentes planilhas, por exemplo, considerando os dados de cada etapa, mas deve-se ter uma documentação rigorosa para uma posterior união das planilhas.

6. Conclusão

No final do projeto, o mesmo pode ser inscrito no CEA para triagem de trabalho no 2º semestre de 2005.

6. Referências bibliográficas

ANDRADE, D.F. e SINGER, J.M. (1986). **Análise de Dados Longitudinais**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística (7o. Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística).

CERDENETTE, G.H.L. (2004). **Produtos derivados de banana (*Musa paradisíaca*) e sua influência na tolerância à glicose e na fermentação colônica**, São Paulo. Projeto de Pesquisa. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

NETER, J., KUTNER, M.H., NACHTSHEIM, C.J e WASSERMAN, W. (1996). **Applied linear statistical models: regression, analysis of variance and experimental design**, 4.ed. New York: McGraw-Hill. 1408p.

APÊNDICE A

APÊNDICE B

Cronograma - Exemplo de uma Etapa para o experimento *in vivo*.

		semana 0 - Adaptação					
Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
	pesagem		pesagem		pesagem		pesagem
Curva Glicêmica	fezes	fezes	fezes	fezes			
	semana1 - Tratamento						
	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14
		pesagem		pesagem		pesagem	
	fezes	fezes	fezes	fezes			Curva Glicêmica
	semana 2 - Tratamento						
	Dia 15	Dia 16	Dia 17	Dia 18	Dia 19	Dia 20	Dia 21
	pesagem		pesagem		pesagem		pesagem
	fezes	fezes	fezes	fezes			
	semana 3 - Tratamento						
	Dia 22	Dia 23	Dia 24	Dia 25	Dia 26	Dia 27	Dia 28
		pesagem		pesagem		pesagem	
	fezes	fezes	fezes	fezes			Curva Glicêmica
	semana 4 - Tratamento						
	Dia 29	Dia 30	Dia 31	Dia 32	Dia 33	Dia 34	Dia 35
	pesagem		pesagem		pesagem		pesagem
	fezes	fezes	fezes	fezes			
	semana 5 - Sacrifício (coletas e avaliação)						
	Dia 36	Dia 37	Dia 38	Dia 39	Dia 40	Dia 41	Dia 42
	GTT	GTT	GTT	GTT	GTT		
manhã							
12:00							
tarde	Isolamento de Ilhotas	Coleta do tecido cecal Sangue para perfil lipídico		Coleta do tecido cecal Sangue para perfil lipídico			