

200326265

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Marilda Garcia Simões**, aprovada pela Comissão Julgadora em 30 de junho de 2003.

Campinas, 30 de junho de 2003.

  
Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares  
Presidente da Banca

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTÉICA PELO SCORE DE  
AMINOÁCIDOS CORRIGIDO PELA DIGESTIBILIDADE DA  
PROTEÍNA CALCULADO COM O CONTEÚDO FECAL E ILEAL**

Tese apresentada ao Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

**Marilda Garcia Simões**  
*Engenheira de Alimentos*

**Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares**  
*Orientadora*

**Campinas  
2003**

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE**

|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE    | CC                                  |
| Nº CHAMADA | T/UNICAMP                           |
|            | Si 51a                              |
| V          | EX                                  |
| TOMBO BC   | 54984                               |
| PROC.      | 16-124103                           |
| C          | <input type="checkbox"/>            |
| D          | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO      | R\$ 11,00                           |
| DATA       | 05/08/03                            |
| Nº CPD     |                                     |

CM00187030-9

BIB ID 295934

### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP.

Simões, Marilda Garcia.

Si51a Avaliação da qualidade protéica pelo escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade da proteína calculado com o conteúdo fecal e ileal./ Marilda Garcia Simões. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Débora de Queiroz Tavares

Tese (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1.Digestibilidade. 2.Proteínas. 3.Aminoácidos. 4.Ratos. I.Tavares, Débora de Queiroz. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

Errata

Página, 40.

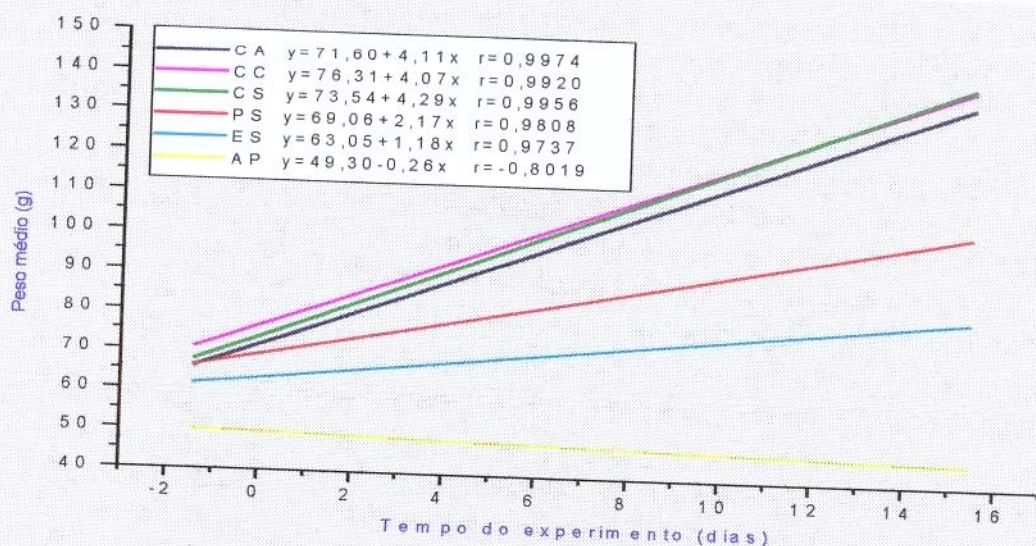
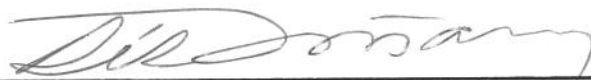


Figura 5 - Regressões lineares para as relações entre o peso médio e o tempo do experimento para os seis grupos do ensaio: AP – Aprotéico CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.

## BANCA EXAMINADORA DA TESE DE MESTRADO



**Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares**

**Orientadora**



**Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo**

**Membro**



**Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka**

**Membro**

---

**Profa. Dra. Flávia Maria Netto**

**Membro**

“Lembre-se com prazer dos momentos em que você sentiu profunda satisfação no trabalho: quando você teve uma idéia brilhante, participou de um grupo de trabalho amigável, descobriu a resposta para uma questão complicada, sentiu o bom cansaço de um dia bem vivido”.

***Daniel Grippio***

***DEDICO ESTA OBRA***

*Com muita ternura e admiração, a você  
Mauro.*

*Agradeço à Profa. Dra. DÉBORA DE QUEIROZ TAVARES, exemplo de dedicação à vida universitária que, com sua presença amiga, dedicada e eficaz orientação, tornou possível a realização deste trabalho. Obrigada Professora.*

*Ao meu marido MAURO, pelo incentivo, colaboração, paciência e por acreditar na minha capacidade e força de vontade. Obrigada querido.*

*Aos meus pais que sempre me direcionaram para os estudos me apoiando nos momentos de grandes decisões. Obrigada papai e mamãe.*

*Aos meus amados filhos Gustavo e Renata por entenderem a ausência da mãe neste período, mas saibam, vocês estavam sempre em meu coração.*

*Aos meus queridos primos Gi e Roger pelos momentos divertidos e agradáveis e pela calorosa hospitalidade.*

*À amiga e colaboradora Prescyla, aluna de Iniciação Científica que, de modo simples, gentil e eficiente tornou nosso trabalho possível e prazeroso. Obrigada Pre.*

*À conjugação harmoniosa da equipe do Laboratório de Microestrutura (LMA), Yara (técnica), Lilia, Camila e Maria Helena (alunas da pós-graduação), pelo companheirismo, disponibilidade e apoio técnico.*

*À querida Susana, responsável pelo Laboratório de Ensaios Biológicos (LEB) que, não medindo sacrifícios, forneceu todo o apoio logístico durante a fase experimental e também pelos divertidos momentos que tornaram mais agradável nossas tarefas. Com você aprendi que a pesquisa não se faz somente com tecnologia, mas também com simplicidade e bom humor.*

Aos profissionais técnicos dos Laboratórios do Departamento de Alimentos e Nutrição da FEA, Eliana, Soely, Carla e Oneida pela colaboração nas análises químicas.

À Universidade Estadual de Campinas. Ter estudado nesta instituição, pela segunda vez, é acima de tudo carregar agora o eterno orgulho de ser professora. Obrigada UNICAMP!

Aos animais de laboratório que, com sua humildade e resignação, inocentemente serviram à esta causa com sacrifício de suas próprias vidas.

E a todos que, mesmo anonimamente, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

|                                                                                             | <b>Pág.</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>RESUMO</b> .....                                                                         | <i>xix</i>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                                                  | 01          |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....                                                       | 05          |
| 2.1. Proteínas.....                                                                         | 07          |
| 2.2. Digestão e absorção protéica .....                                                     | 09          |
| 2.3. Estudo da digestibilidade protéica .....                                               | 11          |
| 2.4. Digestibilidade protéica - fecal e ileal.....                                          | 13          |
| 2.5. PDCAAS - defesa e crítica .....                                                        | 17          |
| 2.6. Proteína de soja .....                                                                 | 18          |
| 2.7. Caseína e caseinatos .....                                                             | 22          |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODO</b> .....                                                           | 25          |
| 3.1. Animais .....                                                                          | 27          |
| 3.2. Grupos .....                                                                           | 27          |
| 3.3. Ensaio biológico .....                                                                 | 28          |
| 3.3.1. Dietas .....                                                                         | 28          |
| 3.3.2. Procedimentos do ensaio <i>in vivo</i> .....                                         | 32          |
| 3.4. Análises nutricionais .....                                                            | 33          |
| 3.5. Análises químicas .....                                                                | 35          |
| 3.5.1. Nível protéico e composição de aminoácidos .....                                     | 35          |
| 3.5.2. Análises centesimais .....                                                           | 35          |
| 3.6. Análise estatística .....                                                              | 35          |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....                                                                  | 37          |
| 4.1. Consumo de dieta e evolução ponderal dos ratos .....                                   | 39          |
| 4.2. Cociente de eficiência alimentar (CEA) .....                                           | 40          |
| 4.3. Cociente de eficiência líquida da proteína (NPR) e relativo (RNPR).....                | 41          |
| 4.4. Digestibilidades das proteínas determinadas com a digesta ileal e a digesta fecal..... | 44          |
| 4.5. Aminoácidos essenciais .....                                                           | 45          |

|                                                                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.6. Digestibilidade dos aminoácidos determinada com a digesta ileal e o conteúdo fecal .....                                                                                    | 49        |
| 4.7. Escore químico de aminoácidos e escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS) calculado pela digesta ileal (Dvi) e o conteúdo fecal (Dvf) ..... | 51        |
| <b>5. DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                        | <b>53</b> |
| 5.1. Animal de experimentação .....                                                                                                                                              | 55        |
| 5.2. Método .....                                                                                                                                                                | 57        |
| 5.3. Evolução ponderal .....                                                                                                                                                     | 58        |
| 5.4. Análises nutricionais .....                                                                                                                                                 | 59        |
| 5.4.1. Cociente de eficiência alimentar (CEA) .....                                                                                                                              | 59        |
| 5.4.2. Cociente de eficiência líquida da proteína (NPR) e relativo (RNPR).....                                                                                                   | 59        |
| 5.4.3. Digestibilidade protéica – ileal e fecal .....                                                                                                                            | 60        |
| 5.4.4. PDCAAS .....                                                                                                                                                              | 62        |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                                                        | <b>65</b> |
| <b>7. SUMMARY .....</b>                                                                                                                                                          | <b>69</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                                                       | <b>73</b> |
| <b>9. ANEXOS .....</b>                                                                                                                                                           | <b>87</b> |

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

---

|       |                                                              |
|-------|--------------------------------------------------------------|
| AAcE  | Aminoácidos essenciais.                                      |
| AIN   | American Institute of Nutrition.                             |
| ANOVA | Análise de Variância.                                        |
| AOAC  | Association of Official Analytical Chemists.                 |
| AP    | Grupo Aprotéico.                                             |
| BBi   | Inibidor Bowman-Birk.                                        |
| BV    | Valor Biológico da Proteína.                                 |
| CA    | Grupo Caseína.                                               |
| CC    | Grupo Caseinato de Cálcio.                                   |
| CEA   | Cociente de Eficiência Alimentar.                            |
| CEMIB | Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica.         |
| Cis   | Cistina.                                                     |
| CV    | Coeficiente de Variação.                                     |
| CS    | Grupo Caseinato de Sódio.                                    |
| DEPAN | Departamento de Alimentos e Nutrição.                        |
| Dv    | Digestibilidade Verdadeira.                                  |
| Dvf   | Digestibilidade Verdadeira determinada com o conteúdo fecal. |
| Dvi   | Digestibilidade Verdadeira determinada com a digesta ileal.  |
| EHS   | Extrato Hidrossolúvel de Soja.                               |
| ES    | Grupo Extrato de Soja.                                       |
| FAO   | Food and Agriculture Organization.                           |
| FDA   | Food and Drug Administration.                                |
| Fen   | Fenilalanina.                                                |
| His   | Histidina.                                                   |
| ICLAS | International Council for Laboratory Animal Science.         |
| IPS   | Isolado Protéico de Soja.                                    |
| Iso   | Isoleucina.                                                  |
| KTI   | Inibidor Kunitz de Tripsina.                                 |
| LEB   | Laboratório de Ensaio Biológicos.                            |
| Leu   | Leucina.                                                     |

|        |                                                                                |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Lis    | Lisina.                                                                        |
| LMA    | Laboratório de Microestrutura de Alimentos.                                    |
| Met    | Metionina.                                                                     |
| MIT    | Massachusetts Institute of Technology.                                         |
| Ne     | Nitrogênio Endógeno.                                                           |
| Nf     | Nitrogênio Fecal/Ileal.                                                        |
| Ni     | Nitrogênio Ingerido.                                                           |
| NPR    | Cociente de Eficiência Líquida da Proteína.                                    |
| NRC    | National Research Council.                                                     |
| NZMP   | New Zealand (Brasil) Ltda.                                                     |
| p      | Nível de Significância Estatística.                                            |
| PDCAAS | Escore de Aminoácidos Corrigido pela Digestibilidade Verdadeira das Proteínas. |
| PER    | Cociente de Eficiência Protéica.                                               |
| PS     | Grupo Produto de Soja.                                                         |
| PTS    | Proteína Texturizada de Soja.                                                  |
| r      | Coefficiente de Correlação de Pearson.                                         |
| RNPR   | Cociente Relativo de Eficiência Líquida da Proteína.                           |
| sAA    | Escore de Aminoácidos.                                                         |
| Tir    | Tirosina.                                                                      |
| Tre    | Treonina.                                                                      |
| UNU    | United Nations University.                                                     |
| Val    | Valina.                                                                        |
| WHO    | World Health Organization.                                                     |

|                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>TABELA 1:</b> Requerimentos de proteínas conforme a faixa etária e o estado fisiológico (FAO/WHO/UNU, 1985 e 1990) .....                                                              | 08 |
| <b>TABELA 2:</b> Requerimentos de aminoácidos essenciais para crianças da pré-escola e adultos .....                                                                                     | 09 |
| <b>TABELA 3:</b> Principais proteases pancreáticas.....                                                                                                                                  | 10 |
| <b>TABELA 4:</b> Comparação da digestibilidade da proteína dietária humana e de animais, determinadas com o conteúdo fecal e a digesta ileal .....                                       | 14 |
| <b>TABELA 5:</b> Valores médios da digestibilidade dos aminoácidos de uma dieta baseada em carne, vegetais e cereais determinada com o conteúdo fecal e a digesta ileal, em adultos..... | 15 |
| <b>TABELA 6:</b> Valores da digestibilidade de aminoácidos essenciais de leite desnatado e de produto de soja .....                                                                      | 16 |
| <b>TABELA 7:</b> Valores da digestibilidade da proteína da soja nos diferentes produtos .....                                                                                            | 21 |
| <b>TABELA 8:</b> Composição dos nutrientes das seis dietas experimentais: o ajuste protéico (10%) foi compensado com ajustes calóricos de amido.....                                     | 29 |
| <b>TABELA 9:</b> Composição da mistura vitamínica, conforme a AIN-93G .....                                                                                                              | 30 |
| <b>TABELA 10:</b> Composição da mistura mineral utilizada, conforme a AIN-93G.....                                                                                                       | 31 |
| <b>TABELA 11:</b> Composição centesimal das seis dietas experimentais .....                                                                                                              | 32 |

|                   |                                                                                                                                                                      |    |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>TABELA 12:</b> | Valores médios do consumo diário de dieta, consumo total de dieta, ganho diário de peso, ganho total de peso e peso final, em gramas, nos seis grupos do ensaio..... | 39 |
| <b>TABELA 13:</b> | Índices de qualidade protéica das cinco dietas: NPR e RNPR .....                                                                                                     | 42 |
| <b>TABELA 14:</b> | Cálculo da digestibilidade verdadeira das proteínas com o conteúdo fecal e ileal das cinco dietas experimentais .....                                                | 44 |
| <b>TABELA 15:</b> | Aminoácidos essenciais das fontes protéicas do experimento.....                                                                                                      | 46 |
| <b>TABELA 16:</b> | Aminoácidos essenciais da digesta ileal e do conteúdo fecal dos seis grupos experimentais .....                                                                      | 47 |
| <b>TABELA 17:</b> | Digestibilidades dos aminoácidos essenciais das cinco dietas experimentais calculadas pela digesta ileal (Dvi) e conteúdo fecal (Dvf).....                           | 49 |
| <b>TABELA 18:</b> | Cálculo do escore químico dos aminoácidos das cinco dietas experimentais.....                                                                                        | 51 |
| <b>TABELA 19:</b> | Escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS) considerando a digesta ileal e o conteúdo fecal das cinco dietas experimentais .....       | 52 |
| <b>TABELA 20:</b> | Evolução dos requerimentos de aminoácidos essenciais para crescimento de ratos. A coluna FAO/WHO estabelece os requerimentos propostos para humanos.....             | 56 |

|                                                                                                                                                                                                                                                               | <i>Pág.</i> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>FIGURA 1:</b> Porcentagem da atividade das hidrolases da bordadura em escova (em verde) e hidrolases citoplasmáticas (em cinza) no intestino delgado. Apud, Caspary, W. F., 1987 .....                                                                     | 11          |
| <b>FIGURA 2:</b> Exemplo de fluxograma do processamento do EHS (Oliveira INDL. S.A.) .....                                                                                                                                                                    | 20          |
| <b>FIGURA 3:</b> Efeito do tratamento térmico sobre a atividade do inibidor de tripsina e sobre o cociente de eficiência protéica de um produto de soja. Apud, Rackis (1974) .....                                                                            | 22          |
| <b>FIGURA 4:</b> A. Animal laparotomizado com exposição das estruturas intestinais. B. Segmento do íleo terminal e ceco, após retirada (notar o conteúdo da digesta ileocecal) .....                                                                          | 33          |
| <b>FIGURA 5:</b> Regressões lineares para as relações entre o peso médio e o tempo do experimento para os seis grupos do ensaio: AP – Aprotéico CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja. .... | 40          |
| <b>FIGURA 6:</b> Valores de CEA para os cinco grupos do ensaio. CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja. ....                                                                                 | 41          |
| <b>FIGURA 7:</b> Relação linear da proteína ingerida e ganho de peso dos cinco grupos do ensaio, ou demonstração gráfica do NPR.....                                                                                                                          | 43          |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 8:</b>  | Comparação da digestibilidade verdadeira das proteínas com o conteúdo fecal e ileal das cinco dietas experimentais. CA – Caseína. CC – Caseinato de cálcio. CS – Caseinato de sódio. PS – Produto de soja. ES – Extrato de soja. *Teste <i>t</i> ( $p < 0,05$ ): as mesmas letras representam igualdade estatística entre grupos..... | 45 |
| <b>FIGURA 9:</b>  | Comparação dos valores médios dos aminoácidos essenciais (mgAAcE/g proteína) presentes na digesta ileal e no conteúdo fecal para os seis grupos do ensaio .....                                                                                                                                                                       | 48 |
| <b>FIGURA 10:</b> | Comparação da digestibilidade verdadeira dos aminoácidos essenciais (%) determinada com a digesta ileal e conteúdo fecal, das cinco dietas do ensaio .....                                                                                                                                                                            | 50 |



## **RESUMO**

A avaliação da qualidade das proteínas exige aprimoramento constante dos métodos utilizados para determinar o real aproveitamento das mesmas. Em razão disto, é empregado o Escore de Aminoácidos Corrigido pela Digestibilidade Verdadeira das Proteínas (PDCAAS), mediante estudos com ratos, pois considera o escore químico de aminoácidos e também suas digestibilidades, o que possibilita a determinação do primeiro aminoácido limitante. No presente estudo, avaliou-se produtos contendo proteínas de origem animal e vegetal pelo PDCAAS, em dois segmentos do fluxo digestivo, íleo e reto, para determinar a quantidade de aminoácidos não absorvidos. A hipótese do trabalho é que possa haver similaridade de biodisponibilidade entre aminoácidos essenciais de origem vegetal e de origem animal. Foram testados dois produtos contendo proteína de soja, onde apenas um (produto PS) era fortificado com 0,3% de metionina e comparados com dietas à base de caseína (comercial, caseinato de sódio, caseinato de cálcio). As dietas foram ministradas a 5 grupos formados por 10 ratos, machos, Wistar, recém-desmamados. Um sexto grupo foi alimentado com dieta aprotéica para estimar as perdas endógenas de nitrogênio. Os grupos sob dietas à base de caseína e caseinatos apresentaram acentuadas semelhanças: ingesta, ganho ponderal, nitrogênio fecal, fornecendo valores coesos para estimativa de Digestibilidade Verdadeira (Dv) e Escore de Aminoácidos  $\geq 1,0$ , ou seja, PDCAAS = Dv para estes grupos. Quanto aos dois grupos sob dieta à base de soja, denominados PS e ES, as ingestas foram 65% e 41%, respectivamente em relação aos controles, embora as dietas tenham sido igualmente balanceadas e flavorizadas. A Dv fecal e ileal para os três grupos controles foram estatisticamente semelhantes e dentro do intervalo 90 a 93%. O grupo PS foi significativamente semelhante aos controles quanto a Dv fecal e 3% abaixo dos controles em relação à Dv ileal. Este primeiro resultado demonstra que a proteína de soja está próxima de atingir a Dv obtida para caseína e derivados. Quanto ao escore químico dos aminoácidos essenciais do grupo PS foi  $\geq 1,0$  e 0,56 para o grupo ES, obtido do escore de metionina/cisteína, o que resultou em PDCAAS 84% para PS e 39% para ES, o que indica que um produto de soja (45% de concentração protéica) fortificado em aminoácidos sulfurados alcança um valor

expressivamente próximo ao desempenho da dieta à base de caseína. Comprovou-se que no íleo a digestibilidade dos aminoácidos essenciais das dietas à base de caseína é em média semelhante a dos aminoácidos das dietas com a proteína de soja. A digestibilidade fecal é menor sob dieta protéica vegetal, confirmando que existe um estado de fisiologia colônica diferente sob dieta vegetal. Considerando que a digestibilidade da proteína de soja é satisfatória conforme mencionado acima, pode-se afirmar que dentro de consumos adequados, a proteína de soja é nutricionalmente correta, quando devidamente fortificada em aminoácidos sulfurados e proveniente de um produto de soja com 45% de proteína, valor usualmente atingido na presente década para produto protéico de soja.



## **1. INTRODUÇÃO**

A proteína representa 11 a 14% do total de calorias da ingestão diária do adulto saudável. Sendo um total aparentemente pequeno em relação a outro macronutriente, torna-se importante à questão da qualidade protéica.

A maior parte das proteínas que mantêm o balanço nitrogenado provém de fontes exógenas e por esta razão, são estudadas suas propriedades e elaborados parâmetros que analisem o seu aproveitamento (Sleisenger & Kim, 1979).

Vários procedimentos baseados em crescimento: Cociente de Eficiência Alimentar (CEA), Cociente de Eficiência Líquida (NPR) ou Relativa da Proteína (RNPR) são indicados para avaliar a qualidade protéica. Outros associam a Digestibilidade Verdadeira ao Escore de Aminoácidos (PDCAAS). Todos os procedimentos utilizam ratos como animais de experimentação, e são penalizados por várias críticas. Por exemplo, sabe-se que o método com base em crescimento pode subestimar a qualidade de várias proteínas. Em razão da maior velocidade de crescimento do rato em relação aos humanos, torna-se maior a quantidade de aminoácidos essenciais para atender o seu crescimento. Também o requerimento por aminoácidos sulfurados é 50% maior para ratos que para humanos. A diferença entre os requerimentos por outros aminoácidos é relativamente menor (Liu, 1999; Darragh & Hodgkinson, 2000), o que sustenta ainda a posição do rato como modelo experimental em assuntos de nutrição.

O PDCAAS vem sendo empregado na avaliação da qualidade protéica, pelo fato de considerar o escore químico dos aminoácidos e suas respectivas digestibilidades. Deste modo, determina a sequência de aminoácidos essenciais limitantes, permitindo uma provável indicação para futura fortificação dos mesmos (Schaafsma, 2000).

Outra crítica, e desta vez, relativa aos metabólitos protéicos das fezes, é que os métodos anteriores ao PDCAAS não consideravam a atividade bacteriana do intestino grosso sobre as proteínas dietárias, assim como não consideravam a síntese de novos aminoácidos. Admite-se que acima de 80% do nitrogênio encontrado nas fezes é de origem microbiana e, apenas pequena quantidade de

aminoácidos está relacionada com o fluxo de aminoácidos não digeridos e ainda provenientes da ingesta (Taverner & Farrel, 1981; Low & Zebrowska, 1989; Rutherford & Moughan, 1998; Darragh & Hodgkinson, 2000; Metges, 2000).

O presente trabalho utiliza ratos como animal de experimentação e, avalia o PDCAAS de fontes protéicas, utilizando conteúdo fecal e ileal para determinar as digestibilidades das proteínas nos dois segmentos dos intestinos.

As digestibilidades serão avaliadas sobre o balanço do nitrogênio total e discriminadas por aminoácidos essenciais. Outrossim, serão comparados produtos distintos oriundos da mesma fonte protéica e, finalmente a comparação destes produtos com outros de origem vegetal.



## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1. PROTEÍNAS

Macromoléculas biológicas, produzidas por microorganismos e tecidos vegetais e animais (Navam & Uruthira, 1999), são constituídas por 20 aminoácidos primários, dos quais nove são essenciais para humanos. Combinados em suas diversas formas caracterizam-se pelas ligações peptídicas formando compostos de alto peso molecular. As células sintetizam suas proteínas internas e aquelas de exportação; umas e outras regulam toda a vida intracelular e harmonizam as funções dos tecidos e dos indivíduos. O aporte dos aminoácidos essenciais e do nitrogênio para as respectivas sínteses exige uma alimentação diária adequada dos mesmos (Pellett, 1990).

A recomendação diária de ingesta protéica deve satisfazer as necessidades fisiológicas dos indivíduos de determinada faixa etária e, manter o equilíbrio nitrogenado e o crescimento normal de indivíduos saudáveis (Marchini et al., 1993; Young & Borgonha, 2000), deste modo, as necessidades protéicas do homem não permanecem constantes ao longo da vida. Em ocasiões onde há formação ou crescimento de órgãos e tecidos (infância, gravidez, lactação), o requerimento diário de proteínas aumenta consideravelmente. Apresenta-se estes valores na Tabela 1.

**Tabela 1 - Requerimentos de proteínas conforme a faixa etária e o estado fisiológico (FAO/WHO/UNU, 1985 e 1990).**

| Grupo                 | Idade<br>(anos) | Peso<br>(Kg) | Requerimentos |           |
|-----------------------|-----------------|--------------|---------------|-----------|
|                       |                 |              | (g / Kg)      | (g / dia) |
| <b>Ambos os Sexos</b> | 0 – 0,5         | 6            | 2,2           | 13        |
|                       | 0,5 – 1         | 9            | 1,6           | 14        |
|                       | 1 – 3           | 13           | 1,2           | 16        |
|                       | 4 – 6           | 20           | 1,1           | 24        |
|                       | 7 – 10          | 28           | 1,0           | 28        |
| <b>Homens</b>         | 11 – 14         | 45           | 1,0           | 45        |
|                       | 15 – 18         | 66           | 0,9           | 59        |
|                       | 19 – 24         | 72           | 0,8           | 58        |
|                       | 25 – 50         | 79           | 0,8           | 63        |
|                       | > 50            | 77           | 0,8           | 63        |
| <b>Mulheres</b>       | 11 – 14         | 46           | 1,0           | 46        |
|                       | 15 – 18         | 55           | 0,8           | 44        |
|                       | 19 – 24         | 58           | 0,8           | 46        |
|                       | 25 – 50         | 63           | 0,8           | 50        |
|                       | > 50            | 65           | 0,8           | 50        |
| <b>Gestantes</b>      | 1º trimestre    |              |               | +10       |
|                       | 2º trimestre    |              |               | +10       |
|                       | 3º trimestre    |              |               | +10       |
| <b>Puérperas</b>      | 1º semestre     |              |               | +15       |
|                       | 2º semestre     |              |               | +12       |

O valor nutricional das proteínas dietárias para humanos depende da sua habilidade em fornecer nitrogênio e aminoácidos para o crescimento e manutenção, mas a quantidade e os requerimentos desses aminoácidos para humanos nem sempre são claros (Millward & Pacy, 1995). As estimativas dos requerimentos dos aminoácidos reportados pela FAO/WHO/UNU, 1990, são, usadas internacionalmente, e são baseadas no balanço de nitrogênio de Rose, 1957. Em 1999, Milward propôs requerimentos de aminoácidos também baseados neste método, com exceção das estimativas para lisina, entretanto, sua validade e suas interpretações, têm recebido críticas. Nos últimos anos os laboratórios do Clinical Research Center do Massachusetts Institute of Technology (MIT),

desenvolveram um novo método para estimar os requerimentos de aminoácidos essenciais (Young & El-Khoury, 1996). Os requerimentos anteriormente citados, os quais, podem ser utilizados como referência padrão de aminoácidos estão na Tabela 2.

**Tabela 2 - Requerimentos de aminoácidos essenciais para crianças da pré-escola e adultos.**

| Aminoácido   | Pré-escola (mgAAcE/g proteína) |                       | Adultos (mgAAcE/g proteína) |                       |                  |
|--------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------|
|              | FAO/WHO/UNU <sup>1</sup>       | Millward <sup>2</sup> | FAO/WHO/UNU <sup>1</sup>    | Millward <sup>2</sup> | MIT <sup>3</sup> |
| Isoleucina   | 28                             | 33                    | 13                          | 27                    | 35               |
| Leucina      | 66                             | 51                    | 19                          | 44                    | 65               |
| Lisina       | 58                             | 39                    | 16                          | 31                    | 50               |
| Sulfurados   | 25                             | 29                    | 17                          | 27                    | 25               |
| Aromáticos   | 63                             | 41                    | 19                          | 33                    | 65               |
| Treonina     | 34                             | 30                    | 9                           | 26                    | 25               |
| Triptofano   | 11                             | 8                     | 5                           | 6                     | 10               |
| Valina       | 35                             | 28                    | 13                          | 23                    | 35               |
| <b>Total</b> | <b>320</b>                     | <b>259</b>            | <b>111</b>                  | <b>217</b>            | <b>310</b>       |

1 - 1985 2 - 1999 3 - 1995

A qualidade de uma proteína é determinada pela presença dos aminoácidos essenciais e, a falta ou quantidade reduzida de um destes diminui seu valor biológico, definido como a quantidade de proteína que fica retida no organismo, em relação ao conteúdo protéico ingerido. Somente um pequeno número de fontes protéicas é ingerido isoladamente, por exemplo, o leite materno; as outras, são ingeridas como parte de uma mistura alimentar. Assim, a quantidade de proteína no alimento não reflete, a qualidade protéica da dieta, uma vez que a mesma está, sobretudo sujeita à sua digestibilidade, à composição, à concentração de aminoácidos (Torun, 1988).

## 2.2. DIGESTÃO E ABSORÇÃO PROTÉICA

O processo digestivo inicia-se pela ação das pepsinas no meio ácido do estômago, quando pequena quantidade de aminoácidos livres é obtida e boa

quantidade de polipeptídios vai para o duodeno. O alimento no duodeno estimulará as secreções de colecistocinina e secretina, as quais provocarão a produção de bicarbonato e proteases pancreáticas (liberadas no intestino na forma inativa - zimogênios). Os aminoácidos liberados no lúmen que forem L-isômeros serão absorvidos por receptores de membrana dos enterócitos, requerendo a presença de íons sódio, como também requerem as moléculas de glicose (Caspary, 1992; Baker, 1995).

O conhecimento da digestão e absorção dos nutrientes evoluiu muito nas últimas décadas, sobretudo porque explicam muitas patologias de ordem nutricional e não adentrar-se-á pelo assunto. A Tabela 3 e a Figura 1 elucidam as ações das hidrolases da bordadura em escova, para trazer o conceito de que a digestão depende das secreções do estômago e do pâncreas, além de depender destas hidrolases e finalmente de receptores de membrana.

**Tabela 3 - Principais proteases pancreáticas.**

| Enzimas        |                           | Ação                                                                                                                                                                                            |
|----------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Endopeptidases | <b>Tripsina</b>           | Hidrolisa interior das ligações peptídicas de aminoácidos básicos, arginina, lisina e cistina, formando produtos com aminoácidos básicos no C-terminal.                                         |
|                | <b>Quimotripsina</b>      | Hidrolisa interior das ligações peptídicas de aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina), leucina, glutamina e metionina formando produtos com este aminoácido no C-terminal. |
|                | <b>Elastase</b>           | Hidrolisa interior das ligações peptídicas dos aminoácidos alifáticos neutros, leucina, isoleucina, treonina, metionina, etc., formando produtos com este aminoácido no C-terminal.             |
| Exopeptidases  | <b>Carboxipeptidase A</b> | Atua no C-terminal das ligações peptídicas dos aminoácidos neutros, alifáticos e aromáticos.                                                                                                    |
|                | <b>Carboxipeptidase B</b> | Atua no C-terminal das ligações peptídicas dos aminoácidos básicos.                                                                                                                             |

Apud, Johson L. R., 1985.

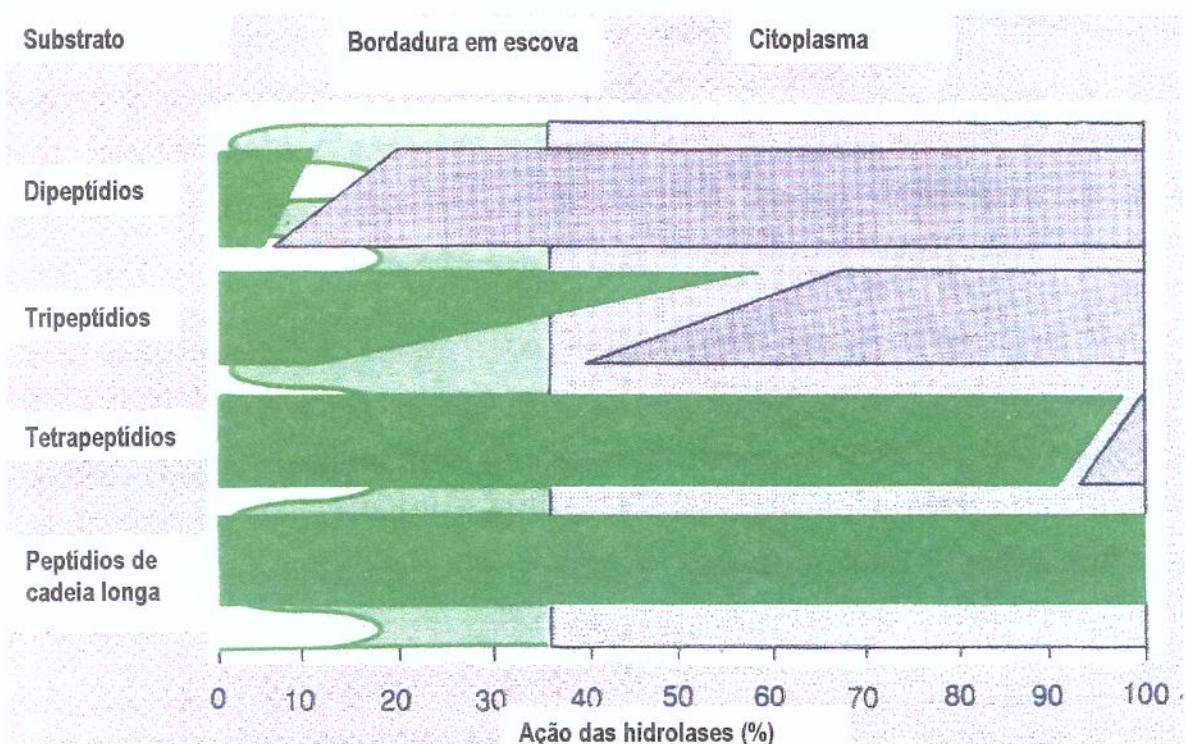


Figura 1 - Porcentagem da atividade das hidrolases da bordadura em escova (em verde) e hidrolases citoplasmáticas (em cinza) no intestino delgado. Apud, Caspary, W. F., 1987.

### 2.3. ESTUDO DA DIGESTIBILIDADE PROTÉICA

A digestibilidade protéica é definida como a porcentagem de proteína absorvida em relação ao conteúdo protéico total da ingesta, e está relacionada a biodisponibilidade dos aminoácidos, sendo esta o melhor indicador da qualidade protéica, uma vez que, muitos aminoácidos podem estar presentes na dieta, mas não necessariamente disponíveis para o organismo e, portanto, para a nutrição (Liu, 1999).

Os diferentes valores da digestibilidade das diversas fontes protéicas podem ser explicados por vários fatores, como por exemplo, as diferenças intrínsecas de sua estrutura molecular. Os tecidos animais não utilizam D-aminoácidos, o que obriga, antes da sua utilização a conversão para a forma L. Alguns aminoácidos são totalmente convertidos, outros não fazem a inversão. As aves geralmente,

com exceção do triptofano, invertem D-aminoácidos com maior eficiência que mamíferos (Baker, 1995). A presença de outros fatores dietéticos como fibras, polifenóis e reações químicas que alteram a liberação dos aminoácidos por processo enzimático podem diminuir a biodisponibilidade das proteínas (FAO/WHO/UNU, 1985).

Vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a digestibilidade e a qualidade protéica (Young & Scrimshaw, 1978; Bodwell & Marable, 1981; Kim & Barbeau, 1991). Os métodos podem enquadrar-se em três categorias: químicos; *in vivo*, utilizando animais ou humanos e *in vitro*, com o emprego de proteinases ou microorganismos (Lewis & Bayley, 1995). A diferença fundamental entre os métodos químicos e biológicos é que, neste último, a digestão protéica ocorre no interior do organismo vivo e não depende apenas da existência do aminoácido na proteína. Os métodos químicos são rápidos, mas não refletem a complexidade biológica (Angelis, 1981). Entretanto, há renovado interesse na aplicação de ensaios *in vitro* para avaliar a qualidade protéica quando se utilizam sistemas de enzimas proteolíticas, procurando imitar, inclusive, as condições de acidez ou pH, características do estômago e do intestino. Esta tendência ocorre, em razão do alto custo e da longa duração dos ensaios com humanos ou animais (Sgarbieri, 1996; Liu, 1999).

Para avaliar qualidade protéica, ensaios biológicos utilizam ratos jovens, alimentados com dieta contendo 8% a 10% de proteína, com a obtenção de resultados semelhantes se comparados a humanos, concluindo que, neste animal, a capacidade de digerir as proteínas dos alimentos é similar a do homem (Sarwar, 1987; Bodwell et al., 1980; Young, 1991).

É necessário reconhecer que métodos para estimar a qualidade protéica são mais adequados quando envolvem organismos superiores. Entretanto os ensaios realizados com ratos não são inteiramente apropriados para testar qualidade de proteínas consumidas por humanos, mas, até novas informações, bioensaios com animais são usados, em razão de problemas de ordem prática associadas com estudos em humanos, que em oposição aos ensaios com ratos, consomem dietas

complexas contendo várias fontes protéicas, ou seja, o esforço de análise de digestibilidade estará modificado devido ao complexo protéico ingerido.

## **2.4. DIGESTIBILIDADE PROTÉICA – FECAL E ILEAL**

A estimativa da digestibilidade compara a proteína ingerida com a proteína não digerida nas fezes. Uma outra variante pode ser utilizada, isto é, a digesta presente no íleo terminal.

O PDCAAS desde a sua indicação pela FAO, 1990, como método para avaliar qualidade protéica de ingesta, tem sido reavaliado quanto suas vantagens e desvantagens (Hooydonk, 1993; Barth & Schaafsma, 1995; Fenwick et al., 1995; Sarwar, 1997; Darragh et al., 1998).

A determinação corrente do PDCAAS usa o coeficiente de digestibilidade verdadeira, considerando o nitrogênio fecal, em ratos, o qual é corrigido pelo nitrogênio das fezes de um grupo de animais sob dieta aprotéica. Entretanto uma outra metodologia para determinar a digestibilidade verdadeira com utilização do nitrogênio ileal passou a ser proposta porque se reconhecia que a estimativa pelo conteúdo fecal continha incertezas acerca das “perdas endógenas” de nitrogênio no intestino grosso. Outros autores propunham que avaliar a digestibilidade ileal seria interessante para obter correções oriundas de algumas proteínas, peptídeos e aminoácidos, presentes no íleo, e livres da digestão bacteriana do intestino grosso (Wrong et al., 1981; Low & Zebrowska, 1989; Rutherford & Mougham, 1998; Darragh & Hodgkinson, 2000; Clapper et al., 2001).

Em razão da degradação bacteriana e da síntese de aminoácidos que ocorre intestino grosso, o coeficiente de digestibilidade fecal tende a superestimar ou subestimar a disponibilidade dos aminoácidos da proteína dietária, (Just, 1980 e Rérat, 1981).

Há estudos que mostram atividade microbiana no intestino delgado em menor proporção, causando interferência no resultado da digestibilidade protéica,

porém, deverá ser muito menor comparado ao intestino grosso (Knudsen & Jensen, 1991; Jorgensen & Jensen, 1994; Darragh & Hodgkinson, 2000).

O impacto da degradação da digesta pela ação microbiana no intestino grosso foi observado em espécies monogástricas com diferenças sobre os resultados da digestibilidade fecal e ileal e está apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4 - Comparação da digestibilidade da proteína dietária humana e de outros animais, determinada com o conteúdo fecal e a digesta ileal.**

| Vertebrados  | Digestibilidade absoluta |       |
|--------------|--------------------------|-------|
|              | Fecal                    | Ileal |
| homem adulto | 0,89                     | 0,87  |
| porco jovem  | 0,97                     | 0,90  |
| bezerros     | 0,94                     | 0,88  |
| galinhas     | 0,86                     | 0,78  |
| ratos jovens | 0,78                     | 0,69  |

**Apud Moughan & Donkoh, 1991.**

A diferença entre os coeficientes de digestibilidade fecal e ileal não é constante entre os aminoácidos, alguns, são mais afetados pela degradação bacteriana do intestino grosso que outros, como mostra a Tabela 5.

**Tabela 5 - Valores médios da digestibilidade dos aminoácidos de uma dieta baseada em carne, vegetais e cereais determinada com o conteúdo fecal e a digesta ileal, em adultos.**

| Aminoácidos  | Digestibilidade             |                            | Significância Estatística <sup>3</sup> |
|--------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------------|
|              | Conteúdo fecal <sup>1</sup> | Digesta ileal <sup>2</sup> |                                        |
| Lisina       | 0,93                        | 0,94                       | NS                                     |
| Arginina     | 0,93                        | 0,90                       | *                                      |
| Histidina    | 0,92                        | 0,90                       | NS                                     |
| Aspartato    | 0,90                        | 0,87                       | *                                      |
| Serina       | 0,92                        | 0,87                       | ***                                    |
| Treonina     | 0,89                        | 0,85                       | **                                     |
| Glutamato    | 0,95                        | 0,94                       | NS                                     |
| Prolina      | 0,95                        | 0,90                       | **                                     |
| Glicina      | 0,87                        | 0,72                       | ***                                    |
| Alanina      | 0,88                        | 0,88                       | NS                                     |
| Valina       | 0,91                        | 0,90                       | NS                                     |
| Isoleucina   | 0,91                        | 0,91                       | NS                                     |
| Leucina      | 0,93                        | 0,92                       | NS                                     |
| Tirosina     | 0,90                        | 0,89                       | NS                                     |
| Fenilalanina | 0,91                        | 0,90                       | ***                                    |
| Cisteína     | 0,91                        | 0,86                       | NS                                     |
| Metionina    | 0,83                        | 0,93                       | ***                                    |
| Triptofano   | 0,83                        | 0,77                       | *                                      |

Apud Rowan et al., 1994. <sup>1</sup>n = 6, <sup>2</sup>n = 5, <sup>3</sup>NS, p> 0,05; \* p< 0,05; \*\* p< 0,01; \*\*\* p< 0,001.

Quando se compara o coeficiente de digestibilidade considerando o balanço total de nitrogênio e o balanço dos aminoácidos individuais, presentes nas proteínas dietárias, há a possibilidade de obtenção de resultados conflitantes como se observa na Tabela 6. Nesta, o coeficiente de digestibilidade para o leite desnatado considerando o nitrogênio total, poderá subestimar a disponibilidade do triptofano, enquanto, a disponibilidade para vários aminoácidos da proteína da soja deverá ser superestimada. Na verdade, talvez seja mais apropriada a determinação de coeficientes de digestibilidade para cada aminoácido quando se calcula o PDCAAS para as proteínas (Darragh & Hodgkinson, 2000).

**Tabela 6 - Valores da digestibilidade de aminoácidos essenciais do leite desnatado e de produto de soja.**

| Proteínas       | Total | Digestibilidade (%) |           |          |          |            |
|-----------------|-------|---------------------|-----------|----------|----------|------------|
|                 |       | Lisina              | Metionina | Cisteína | Treonina | Triptofano |
| Leite Desnatado | 95    | 96                  | 92        | 94       | 95       | 98         |
| Produto de Soja | 90    | 87                  | 82        | 82       | 84       | 89         |

Adaptação FAO/WHO, 1990.

Há, porém certa resistência quanto ao uso da digestibilidade considerando a digesta ileal, no cálculo do PDCAAS, principalmente pelo fato de seus valores geralmente serem menores quando comparados com os valores da digestibilidade fecal, resultando em valores menores dessa análise nutricional.

Além do mais, a abordagem de digestibilidade ileal vai requerer uma técnica invasiva para a coleta de amostras da digesta, enquanto que, a determinação da digestibilidade fecal envolve procedimentos simples para a coleta das fezes. Estudos mostram vários métodos para coleta de amostras da digesta ileal em animais. Quando são adotados ratos como animais de experimentação, a coleta é realizada após o sacrifício dos mesmos, enquanto que a canulação ileal ou o bypass do intestino grosso pela anastomose ileorectal ou pela ileostomia, são mais comuns em porcos. Há vantagens e desvantagens associadas a cada um desses métodos (Rutherford & Moughan, 1998; Darragh & Hodgkinson, 2000).

Amostragens após o sacrifício têm vantagens, pois envolve interrupção mínima das funções digestivas antes da coleta, mas, em razão, da limitada quantidade da digesta coletada há a possibilidade de um viés nos resultados, pois as amostras podem não ser representativas (Butts et al., 1991; vanWijk et al., 1998). Este método é mais econômico e, quando os animais são alimentados antes do sacrifício a variabilidade dos dados não é tão grande quanto os encontrados em animais com cânulas (Donkoh et al., 1994).

## 2.5. PDCAAS – DEFESA E CRÍTICA

A Conferência da FAO/WHO, 1990, em conjunto com representantes da FDA (Food and Drug Administration), preocupados com os procedimentos para avaliar a qualidade nutricional das proteínas vegetais, aliás, controladas pelo “Codex Committee on Vegetable Proteins”, verificaram a necessidade de desenvolver um escore de aminoácidos corrigido pela sua respectiva digestibilidade. Sarwar & McDonough, 1990 têm especialmente dedicado a esta questão.

Nesta Conferência, determinou-se padronizar um método para a avaliação dos requerimentos e digestibilidade de aminoácidos para humanos. Ressaltou-se que a idade pré-escolar é a adequada para ser tomada como padrão para análise dos requerimentos de aminoácidos, servindo de referência para os outros grupos etários, exceto recém-nascidos. Reconheceu também a similaridade da digestão dos alimentos de humanos e ratos, concluindo que a digestibilidade verdadeira da proteína crua é uma aproximação razoável da digestibilidade verdadeira de muitos aminoácidos a qual é determinada pelo balanço nitrogenado, considerando o conteúdo fecal, em ratos, sendo este um modelo adequado para predizer a digestibilidade da proteína em humanos (Sarwar, 1987). Concluiu-se que o PDCAAS pode ser adotado para avaliar a qualidade protéica e, baseia-se na comparação da concentração do 1º aminoácido essencial limitante da proteína teste com a concentração do mesmo aminoácido da proteína padrão de referência (requerimentos de aminoácidos essenciais de crianças da pré-escola). O escore químico obtido é corrigido digestibilidade verdadeira (em todo trato digestivo) da proteína teste. Os valores de PDCAAS que excedem a 100% não são considerados e o menor valor do PDCAAS reflete o aminoácido essencial limitante da proteína, determinando sua qualidade nutricional.

Após mais de 10 anos de experiência com o PDCAAS, críticas têm sido levantadas pela comunidade científica com relação ao seu uso: 1- Validade dos requerimentos de aminoácidos para crianças da pré-escola. Poucos estudos comprovam estes requerimentos, há necessidade de informações da validade dos mesmos. A escolha deste padrão exclui os aminoácidos não essenciais que

também contribuem para o valor nutricional das proteínas. 2- Validade da correção do escore de aminoácidos pela Dvf. Há forte evidência que a Dvi e não a Dvf deva ser o parâmetro certo para esta correção. O uso da Dvf pode sobrestimar ou subestimar a qualidade de algumas proteínas, em razão da atividade da microflora bacteriana existente no intestino grosso. 3- Validade da truncção dos valores do PDCAAS em 100. Este fato, só pode ser defendido em poucas situações em que a proteína é usada como única fonte protéica da dieta. Para avaliar qualidade das proteínas como parte de uma mistura, a truncção não deve ser usada (Schaafsma, 2000).

## **2.6. PROTEÍNA DE SOJA**

Os alimentos à base de soja foram introduzidos pelo oriente no mundo ocidental no início do século XX e, alguns desses produtos já são bem aceitos, ao passo que outros, demandarão tempo para aceitação como fonte de proteína alimentar e as barreiras a serem vencidas são de ordem gustativa ou cultural.

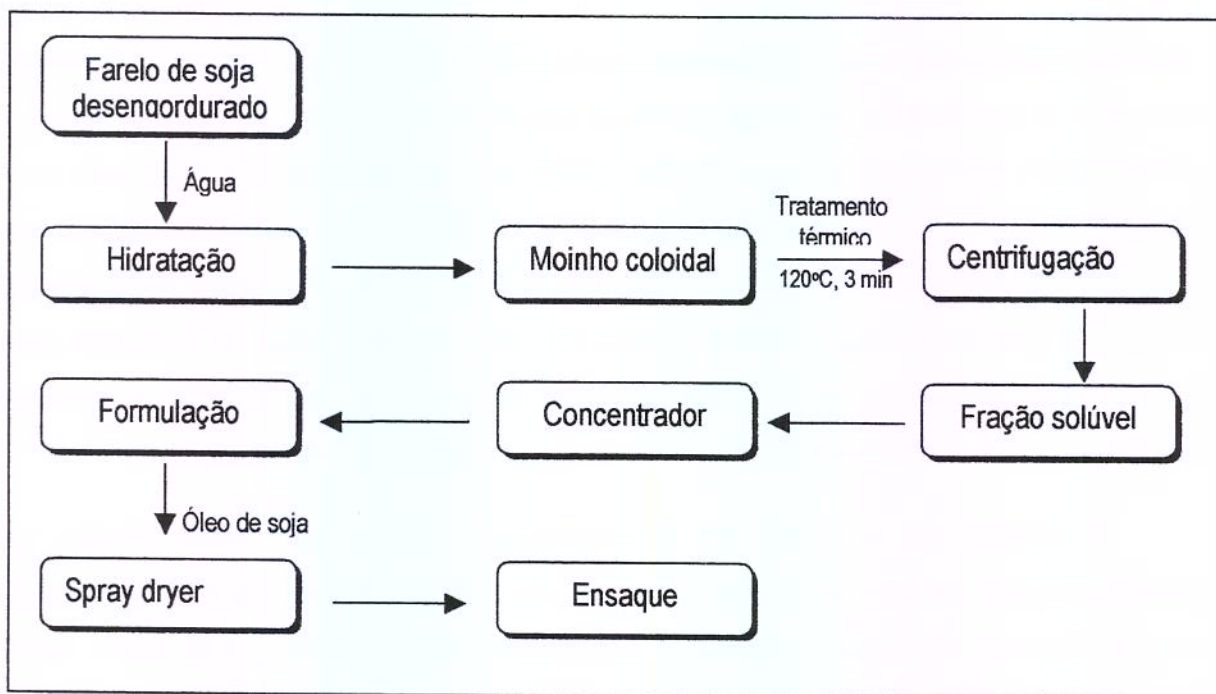
A soja tem sido a maior fonte protéica para milhões de pessoas nos países orientais e, a conversão direta da sua proteína em alimentos, no resto do mundo, é muito pequena quando comparada com o óleo, que ocupa larga fatia de mercado, a proteína, ainda é direcionada em grande parte para o consumo animal. Óleo e farelo, produtos resultantes do processamento da soja, já representam commodities no mercado nacional e internacional, sendo comercializados nas bolsas de mercadorias e futuro.

Atualmente, devido ao crescimento populacional e a busca por alimentos saudáveis, nota-se um grande incentivo para o uso da proteína de origem vegetal, esta com custo atraente, alta disponibilidade e com qualidade nutricional elevada. Assim, a indústria de alimentos está estimulada a desenvolver novos produtos de soja e, dentre estes, o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) (Navam & Uruthira, 1999).

outros produtos de soja, na alimentação humana, já representam uma demanda atraente e ganha interesse no mercado brasileiro. Portanto pesquisas sobre a composição aminoacídica e a biodisponibilidade desta proteína ocorrerão com frequência (Clapper, 2001). É conhecido (Linder, 1991) que entre populações com ingesta vegetariana exclusiva, o total de aminoácidos essenciais está abaixo daquelas que consomem dietas mistas ou não vegetarianas. A indústria está ciente da necessidade de complementação na dieta do consumidor, e, procura utilizar o EHS em fórmulas onde fortifica e/ou suplementa o produto.

O extrato de soja em pó é empregado como ingrediente básico, ou complementar, na fabricação de alimentos de alto valor nutritivo e relativo baixo custo. Quanto às características nutricionais e organolépticas do EHS, estas dependem ainda do melhoramento genético de novos cultivares e de controle adequado dos fatores que envolvem as fases de produção (Travaglini, 1981; Liu, 1999).

A expressão “leite de soja” é usada inadequadamente para designar produtos de soja prontamente dispersíveis em água e, que podem conter, além da fração solúvel da soja, outros componentes insolúveis, protéicos ou não. A Figura 2 apresenta um fluxograma do processamento para obtenção do “extrato hidrossolúvel de soja” a partir do farelo de soja desengordurado, utilizado pela indústria Olvebra, fornecedora das amostras dos produtos com a proteína de soja, utilizados no presente estudo. Portanto, a partir do farelo de soja é extraído o extrato hidrossolúvel de soja, contendo 44% de proteína. O produto de soja é uma fórmula elaborada com este extrato, com cerca de 25% de proteína.



**Figura 2 - Exemplo de fluxograma do processamento do EHS (Oliveira INDL. S.A.).**

De acordo com a resolução 14/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões de Alimentos<sup>1</sup>, o EHS pode conter os seguintes ingredientes opcionais: açúcares, dextrinas, amidos, aminoácidos, sais minerais, vitaminas e outros produtos comestíveis autorizados, geralmente associados às propriedades organolépticas. As características químicas: umidade - mínimo - 3%, proteínas - mínimo - 41,5%, carboidratos - máximo - 34,6%, cinzas - máximo - 7,0%, devem constar na rotulagem do produto (Anexo 2).

Fatores intrínsecos, composição aminoacídica, elementos nutricionais, estrutura molecular da proteína, processamento térmico e de purificação afetam a digestibilidade do EHS (Esteves et al., 1995; Miyagi et al., 1997). Estudos revelam que a digestibilidade da soja cozida ou tostada é sempre menor em relação a outros produtos de soja devido à resistência a embebição pós ingestão e a resistência da estrutura celular dos grãos após tratamento térmico. O aumento da digestibilidade da proteína isolada de soja indica os efeitos benéficos da purificação da proteína. Estes fatores, explicam a variação da digestibilidade de

<sup>1</sup> Compêndio de Normas e Padrões para Alimentos da Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação.  
Revisão da literatura

distintos produtos de soja, conforme a Tabela 7.

**Tabela 7 - Valores da digestibilidade da proteína da soja nos diferentes produtos.**

| <b>Produtos de soja</b>          | <b>Digestibilidade (%)</b> |
|----------------------------------|----------------------------|
| Soja cozida*                     | 65,3                       |
| Soja torrada*                    | 65,3                       |
| Queijo de soja (Tofu)*           | 92,7                       |
| Leite de soja*                   | 92,6                       |
| Farinha de soja integral**       | 75,0 – 92,0                |
| Farinha de soja desengordurada** | 84,0 – 90,0                |
| Proteína isolada de soja**       | 93,0 – 97,0                |

\* Watanabe *et al.*, 1971; \*\* Bressani, 1981.

Efeitos adversos são presenciados em mamíferos e aves após a ingestão da soja crua, em razão da presença de lectinas e fatores antinutricionais como os inibidores de enzimas digestivas e hemaglutininas. Estes inibidores incluem o inibidor de tripsina, Kunitz (KTI), inibidor Bowman-Birk (BBI) o qual atua sobre a tripsina e quimotripsina e outras enzimas de menor ação (Friedman, 1986).

Para minimizar possíveis danos ao homem e melhorar a qualidade nutricional dos produtos de soja, estes inibidores são inativados por tratamento térmico durante o processamento ou removidos, porém, 5-20% não são desativados, interferindo na digestibilidade dessas proteínas. Portanto, o tratamento térmico envolvendo controle de temperatura, tempo e umidade, tem significativo efeito sobre a digestibilidade da proteína da soja. Outra alternativa para melhorar o valor nutricional da soja se baseia no desenvolvimento de cultivares com menor concentração de inibidores de tripsina (Domalgalski *et al.*, 1992). A Figura 3 ilustra como a ação do inibidor de tripsina é controlada pelo tempo.

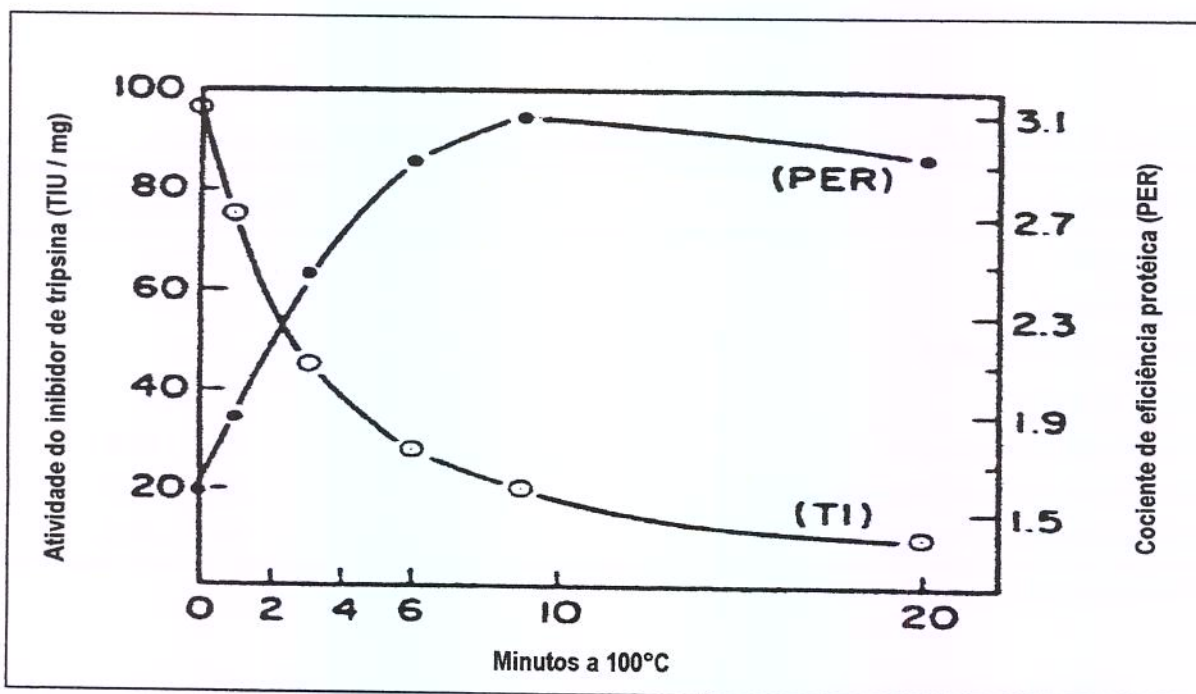


Figura 3 - Efeito do tratamento térmico sobre a atividade do inibidor de tripsina e sobre o cociente de eficiência protéica de um produto de soja. Apud, Rackis (1974).

Um outro fator que diminui a digestibilidade da proteína da soja, são as ligações dissulfídicas que estabilizam a estrutura molecular. A redução destas ligações otimizará a ação das enzimas proteolíticas a nível intestinal (Rothenbuhler & Kinsella, 1986; Friedman & Gumbman, 1986).

## 2.7. CASEÍNA E CASEINATOS

A caseína é produzida comercialmente desde o início do século XIX sendo utilizada como cola, papel, adesivos, tintas, vernizes etc. Posteriormente foi aumentada sua produção e utilização em alimentos. Hoje, cerca de 80% da produção mundial é utilizada na composição de produtos alimentícios e, suas demais aplicações industriais mereceram outros substitutos de custo mais baixo. Há dois métodos principais para a preparação da caseína em escala industrial: a precipitação isoeletrica e a coagulação enzimática; um número considerável de revisões sobre o assunto pode ser consultado (Fox, 1989; Mulvihill, 1992; Fox &

Mulvihill, 1992).

A caseína é produzida pela acidificação do leite desnatado com ácido clorídrico ou por fermentação com *Lactococcus* a um pH de 4.6 a 20°C (Mulvihill, 1992); é insolúvel em água, mas, caseinatos solúveis podem ser formados pela adição de NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, KOH ou NH<sub>3</sub> com ajuste do pH para 6,5 - 7,0, para produzir caseinato de sódio, cálcio, potássio e amônio, respectivamente. Portanto caseinatos são sais de caseína largamente usados no processamento de outros alimentos em razão do alto valor nutricional e propriedades funcionais (Fox & Mcsweeney, 1998).

O caseinato de sódio é mais empregado na indústria de alimentos, mas a necessidade de produtos com baixos teores de sódio tem intensificado os estudos sobre os caseinatos de cálcio e de magnésio, os quais podem ser utilizados como componentes de fórmulas para neonatos, idosos e pessoas com doenças metabólicas (Giese, 1994).

Neste estudo, caseína, caseinato de cálcio e caseinato de sódio proteínas de alto valor biológico foram consideradas, como parâmetros de avaliação e de comparação de proteína animal e proteína vegetal.



### **3. MATERIAL E MÉTODO**

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Ensaaios Biológicos (LEB) e Laboratório de Microestrutura de Alimentos (LMA), do Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN). O manejo dos ratos seguiu o protocolo aprovado pela Comissão de Ética de Experimentação Animal, com certificado número 347-2, de 07 de junho de 2002, (Anexo 8).

### 3.1. ANIMAIS

Neste experimento, foram utilizados 60 ratos machos, recém desmamados, com 21 dias da linhagem Wistar/Uni (CEMIB<sup>1</sup> UNICAMP, Campinas, SP), com pesos entre 59,27±7,68g. Os animais foram mantidos em gaiolas metálicas individuais, em condições ambientais controladas quanto à luminosidade, com <sup>2</sup>ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura (20 -22°C) e umidade (40 - 50%).

### 3.2. GRUPOS

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos de 10 animais, sendo, submetidos a cinco dias de adaptação (Bricker & Mitchell, 1974), sob respectivas seis dietas de ensaio, oferecidas *ad libitum*. Os grupos foram identificados com uma sigla que se refere à fonte protéica consumida.

- Grupo Aprotéico (**AP**) – Ratos sob dieta balanceada, porem isenta de proteína;
- Grupo Caseína (**CA**) – Ratos sob dieta balanceada, sendo a fonte protéica a Caseína suplementada com 0,3% de cistina;
- Grupo Caseinato de Cálcio (**CC**) – Ratos sob dieta balanceada, sendo a fonte protéica o Caseinato de Cálcio;

---

<sup>1</sup> Certificado pelo International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS).

- Grupo Caseinato de Sódio (**CS**) - Ratos sob dieta balanceada, sendo a fonte protéica o Caseinato de Sódio;
- Grupo Produto de Soja (**PS**) - Ratos sob dieta balanceada, sendo a fonte protéica o Extrato de Soja, produto comercial (Olivebra), suplementado com 0,3% de metionina;
- Grupo Extrato de Soja (**ES**) - Ratos sob dieta balanceada, sendo a fonte protéica o Extrato de Soja (Olivebra) sem suplementação com metionina.

### 3.3. ENSAIO BIOLÓGICO

#### 3.3.1. Dietas

As dietas foram formuladas para conter 10% de proteína e quando analisadas apresentaram teor protéico médio de  $10,54 \pm 0,39\%$ , seguindo teor recomendado pelo PER (AOAC, 1975), apresentando, portanto aproximadamente 1,6% de nitrogênio. Estes valores foram utilizados para o cálculo da digestibilidade das proteínas testes e índices de sua qualidade. A fração lipídica constituiu 10% do valor calórico. Os demais itens seguiram a padronização de "American Institute of Nutrition", AIN-93G (Reeves et al., 1993), para ratos em crescimento. As composições dos nutrientes das dietas, de acordo com o grupo de animais estudados, estão nas Tabelas 8, 9, 10.

**Tabela 8 - Composição dos nutrientes das seis dietas experimentais: o ajuste protéico (10%) foi compensado com ajustes calóricos de amido.**

| <b>Composição Grupos<br/>(g/kg da dieta)</b> | <b>AP</b> | <b>CA</b> | <b>CC</b> | <b>CS</b> | <b>PS</b> | <b>ES</b> |
|----------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Amido de milho</b>                        | 467,50    | 408,10    | 418,8     | 419,0     | 381,30    | 270,00    |
| <b>Amido dextrinizado</b>                    | 191,30    | 132,00    | 132,0     | 132,0     | 132,00    | 132,00    |
| <b>Sacarose</b>                              | 140,60    | 140,60    | 140,6     | 140,6     | 140,60    | 140,60    |
| <b>Óleo de soja</b>                          | 100,00    | 100,00    | 100,0     | 100,0     | 41,8      | –         |
| <b>Fibra</b>                                 | 50,00     | 50,00     | 50,0      | 50,0      | 47,20     | 50,00     |
| <b>Mix mineral</b>                           | 35,00     | 35,00     | 35,0      | 35,0      | 28,90     | 27,50     |
| <b>Mix vitamínico</b>                        | 10,00     | 10,00     | 10,0      | 10,0      | 10,00     | 9,80      |
| <b>Cistina</b>                               | 3,00      | 3,00      | 3,0       | 3,0       | 3,00      | 3,00      |
| <b>Colina</b>                                | 2,50      | 2,50      | 2,5       | 2,5       | 2,50      | 2,50      |
| <b>Ter, But, Hidroquinona</b>                | 0,10      | 0,10      | 0,1       | 0,1       | 0,10      | 0,10      |
| <b>Caseína<sup>1</sup></b>                   | –         | 118,70    | –         | –         | –         | –         |
| <b>Caseinato de cálcio<sup>2</sup></b>       | –         | –         | 108,0     | –         | –         | –         |
| <b>Caseinato de sódio<sup>2</sup></b>        | –         | –         | –         | 107,8     | –         | –         |
| <b>Extrato de soja<sup>3</sup></b>           | –         | –         | –         | –         | 223,80    | –         |
| <b>Produto de Soja<sup>3</sup></b>           | –         | –         | –         | –         | –         | 397,10    |

AP – Aprotéico CA – Caseína CC – Caseinato de Cálcio CS - Caseinato de Sódio PS – Produto de Soja ES – Extrato de Soja.

1 - M. Cassab Com. Ind. Ltda. (Anexo1).

2 - New Zealand (Brasil) Ltda. (Anexo 1).

3 - Produtos Olvebra INDL. S.A. (Anexo2).

**Tabela 9 - Composição da mistura vitamínica, conforme a AIN-93G.**

| <b>Vitaminas</b>                                             | <b>Quantidade (g / Kg da mistura)</b> |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Ácido nicotínico                                             | 3,000                                 |
| Pantotenato de cálcio                                        | 1,600                                 |
| Piridoxina-HCl                                               | 0,700                                 |
| Tiamina-HCl                                                  | 0,600                                 |
| Riboflavina                                                  | 0,600                                 |
| Ácido Fólico                                                 | 0,200                                 |
| D-Biotina                                                    | 0,020                                 |
| Vitamina B <sub>12</sub> (cianocobalamina) (0,1% em manitol) | 2,500                                 |
| Vitamina E (acetato de $\alpha$ -tocoferol) (500 UI/g)       | 15,000                                |
| Vitamina A (palmitato de retinol) (500.000 UI/g)             | 0,800                                 |
| Vitamina D <sub>3</sub> (colecalfiferol) (400.000 UI/g)      | 0,250                                 |
| Vitamina K (menaquinona)                                     | 0,075                                 |
| Sacarose, q.s.p.                                             | 974,655                               |

**Tabela 10 - Composição da mistura mineral utilizada, conforme a AIN-93G.**

| <b>Elementos minerais essenciais</b>                      | <b>Quantidade<br/>(g/Kg da mistura)</b> |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Carbonato de cálcio, anidro, 40,04% Ca                    | 357,00                                  |
| Fosfato de potássio, monobásico, 22,76% P, 28,73% K       | 196,00                                  |
| Citrato de potássio, tripotássio, monohidratado, 36,16% K | 70,78                                   |
| Cloreto de sódio, 39,34% Na, 60,66% Cl                    | 74,00                                   |
| Sulfato de potássio, 44,87% K, 18,39% S                   | 46,60                                   |
| Óxido de magnésio, 60,32% Mg                              | 24,00                                   |
| Citrato férrico, 16,50% Fé                                | 6,060                                   |
| Carbonato de zinco, 52,14% Zn                             | 1,650                                   |
| Carbonato de manganês, 47,79% Mn                          | 0,630                                   |
| Vitamina D <sub>3</sub> (colecalciferol) (400.000 UI/g)   | 0,250                                   |
| Carbonato cúprico, 57,47% Cu                              | 0,300                                   |
| Iodato de Potássio, 59,30% I                              | 0,010                                   |
| Selenito de sódio, anidro, 41,79% Se                      | 0,010                                   |
| Paramolibdato de amônia, 54,34% Mo                        | 0,007                                   |
| <b>Elementos minerais potencialmente benéficos</b>        |                                         |
| Metassilicato de sódio, 9,88% Si                          | 1,450                                   |
| Sulfato crômico de potássio, 10,42% Cr                    | 0,275                                   |
| Cloreto de lítio, 16,38% Li                               | 0,017                                   |
| Ácido bórico, 17,50% B                                    | 0,081                                   |
| Fluoreto de sódio, 45,24% F                               | 0,063                                   |
| Carbonato de níquel, 45,00% Ni                            | 0,032                                   |
| Vanadato de amônia, 43,55% V                              | 0,007                                   |
| Sacarose q.s.p.                                           | 221,026                                 |

As composições centesimais das dietas experimentais foram determinadas conforme item 3.5, e apresentadas na Tabela 11.

**Tabela 11 – Composição centesimal das seis dietas experimentais<sup>1</sup>.**

| Componentes (%)               | AP         | CA         | CC         | CS         | ES         | PS         |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Umidade                       | 6,86±0,26  | 7,32±0,17  | 7,31±0,09  | 7,28±0,01  | 7,66±0,04  | 5,40±0,06  |
| Proteína bruta                | 0,86±0,05  | 10,67±0,71 | 10,98±0,16 | 10,89±0,31 | 10,56±0,16 | 9,96±0,14  |
| Lipídios totais               | 9,77±0,04  | 9,20±0,15  | 9,22±0,26  | 9,64±0,18  | 9,08±0,23  | 9,15±0,17  |
| Cinzas                        | 2,36±0,29  | 2,45±0,16  | 2,86±0,13  | 2,67±0,06  | 3,27±0,09  | 3,87±0,03  |
| Carboidratos                  | 80,15±0,01 | 70,36±0,85 | 69,63±0,34 | 69,52±0,29 | 69,43±0,18 | 71,62±0,24 |
| Nitrogênio                    | 0,15       | 1,67       | 1,71       | 1,70       | 1,84       | 1,74       |
| Valor energético <sup>2</sup> | 409,70     | 409,70     | 409,70     | 409,70     | 410,3      | 409,10     |

AP - Aprotéico CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de Soja ES – Extrato de soja.

1 - Os quatro primeiros componentes foram determinados (item 3.5). Valores são média de triplicatas. Carboidratos foram estimados por diferença. Valor Energético = (Carboidratos x 4) + (Proteínas x 4) + (Lípides x 9).

2 - Kcal, 100g.

### 3.3.2. Procedimentos do Ensaio *in Vivo*

Para evitar influências sobre o ritmo circadiano dos ratos, os procedimentos ocorreram nos mesmos horários com a mesma equipe. A água foi ministrada *ad libitum*. As dietas foram oferecidas, duas vezes ao dia, durante uma hora, no início da manhã e ao final da tarde, e foram precedidas por uma pré-alimentação constituída com 0,5g de sacarose e 0,5g da dieta especificada para cada grupo, durante 15 minutos (Benito et al., 1997, 1998). Durante o experimento, foi efetuado o controle dos resíduos das dietas após a alimentação. Os ratos foram pesados a cada dois dias. As fezes foram coletadas nos últimos sete dias do experimento, secadas em estufa, pesadas, moídas e analisadas quanto ao teor de nitrogênio e perfil de aminoácidos. O ensaio terminou ao 14º dia quando, após 5 horas de jejum da primeira alimentação diária, os ratos foram sacrificados para retirada de 20cm de íleo, imediatamente anterior à junção ileocecal juntamente com o ceco (Figura 4).

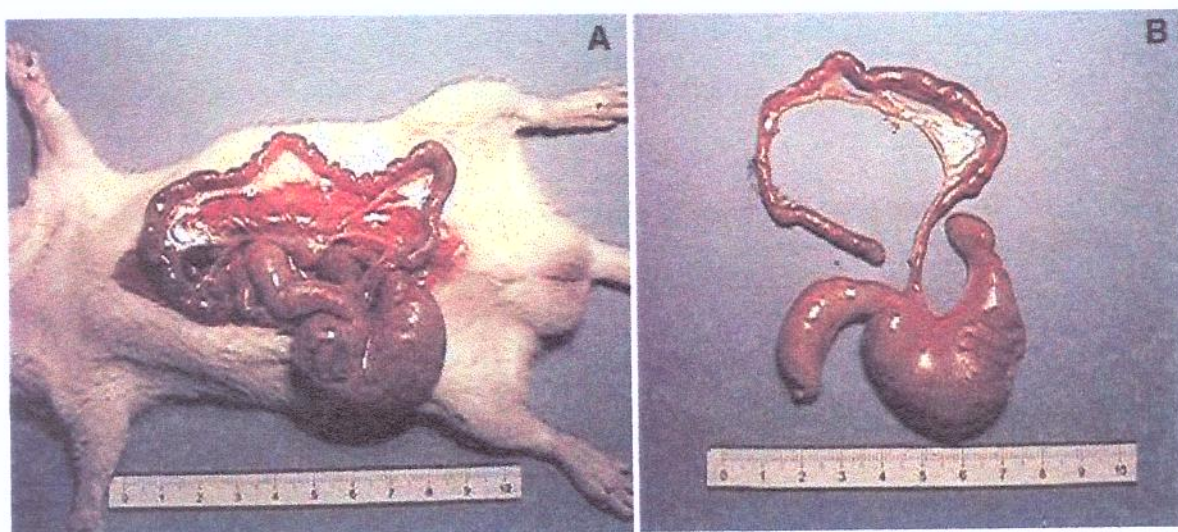


Figura 4 – A. Animal laparotomizado com exposição das estruturas intestinais. B. Segmento do íleo terminal e ceco, após retirada (notar o conteúdo da digesta ileocecal).

Os segmentos foram limpos externamente e foi retirada a digesta ileal para ser secada em estufa, pesada e moída para as análises químicas posteriores (Rutherford & Moughan, 1998; Darragh & Hodgkinson, 2000).

### 3.4. ANÁLISES NUTRICIONAIS

Os parâmetros ganho de peso, consumo de dieta e quantidade de fezes, permitiram avaliar as relações abaixo, determinadas para todos os animais.

- Quociente de eficiência alimentar (Pellet & Young, 1980).

$$CEA = \frac{\text{Ganho de peso do animal (g)}}{\text{Dieta consumida (g)}}$$

- Quociente de eficiência líquida da proteína (Miller & Bender, 1955).

$$NPR = \frac{\text{Ganho de peso do animal (g)} + \text{Média da perda de peso do grupo Aprotéico (g)}^2}{\text{Proteína consumida pelo animal teste(g)}}$$

- Quociente relativo de eficiência líquida da proteína (Pellett & Young, 1980).

$$RNPR = \frac{\text{NPR do grupo do ensaio}}{\text{NPR do grupo referência}^3} \times 100$$

- Digestibilidade verdadeira da proteína (Sarwar & Peace, 1988).

$$Dv = \frac{Ni - (Nf - Ne)}{Ni} \times 100$$

Onde: Ni = Nitrogênio ingerido  
Nf = Nitrogênio fecal / ileal  
Ne = Nitrogênio endógeno<sup>4</sup>

- Escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade verdadeira (Sarwar & McDonough, 1990).

$$PDCAAS = Dv \times sAA$$

Onde: sAA = Escore de aminoácidos essenciais, ou seja:

$$sAA = \frac{\text{mg AAce / g da proteína teste}}{\text{mg do mesmo AAce / g da proteína padrão}^5}$$

<sup>2</sup> Quantidade de proteína necessária para a manutenção do animal.

<sup>3</sup> Para a determinação do RNPR foi usada como padrão de referência à proteína do Grupo CC (caseinato de cálcio).

<sup>4</sup> O nitrogênio e os aminoácidos endógenos presentes no íleo e respectivos conteúdo fecal dos ratos alimentados com dieta aprotéica são usados para estimar o metabolismo endógeno e para corrigir as estimativas da digestibilidade aparente para se obter a digestibilidade verdadeira (Sarwar & Peace, 1988).

<sup>5</sup> A proteína padrão de referência é hipotética, os requerimentos em aminoácidos devem atender crianças da pré-escola, faixa etária 2 - 5 anos (FAO/WHO/UNU, 1990).

### 3.5. ANÁLISES QUÍMICAS

#### 3.5.1. Nível Protéico e Composição de Aminoácidos

A proteína bruta foi determinada pelo método semimicro Kjeldahl (AOAC, 1975) para: dietas, fezes, conteúdo ileal, em triplicata. A conversão de nitrogênio utilizado foi 5,71 para proteína da soja (Mossé, 1990), e 6,38 para a caseína (AOAC, 1995).

O perfil aminoacídico das dietas, fezes, conteúdo ileal foi determinado em duplicata por cromatografia de troca iônica (Spackman et al., 1958) e reação pós-coluna, com ninhidrina, utilizando o analisador Thermo - Separation Products Vacuum Membrane Degasser P4000, reactor PCX 3100, da Pickering Laboratories. Para os conteúdos ileal e fecal a análise utilizou um “pool” de amostras relativas a cada grupo (Sarwar et al., 1989a).

#### 3.5.2. Análises Centesimais

Lípides Totais foram determinados segundo Bligh & Dyer (1958). A proteína bruta determinada pelo método semimicro Kjeldahl. Umidade obtida até ponto constante após 105<sup>0</sup>C (Pearson, 1976). Cinzas determinadas em mufla a 550<sup>0</sup>C (Less, 1979). Carboidratos determinados por diferença.

### 3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se estratégia de alocação sistemática garantindo a homogeneidade dos grupos (Jekel et al., 1999).

Procedida à análise descritiva dos parâmetros dos grupos (06) de ensaio efetuou-se a Análise de Variância (ANOVA de um critério - teste F) e, nas diferenças entres os grupos, aplicou-se o método de Student-Newman-Kuels; para comparação entre dois grupos utilizou-se o teste *t* de Student, programa PRIMER – versão 1.0 (McGraw – Hill Libri Itália, 1988). O Coeficiente de Correlação de Pearson foi utilizado para definir as equações das retas da evolução ponderal dos

animais e NPR, nas diferentes dietas. As análises estatísticas foram processadas para caracterização do nível de significância que foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).



## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. CONSUMO DE DIETA E EVOLUÇÃO PONDERAL DOS RATOS

Todos os ratos permaneceram saudáveis durante o ensaio, não apresentaram disfunções fisiológicas, não praticaram coprofagia, pelo menos na última noite e não houve óbitos. O peso médio dos ratos no início do ensaio foi  $59,28 \pm 2,14\text{g}$ , não havendo diferença significativa ( $p= 0,581$ ) entre os seis (06) grupos constituídos para o ensaio (Anexo 3). O peso médio de cada grupo ao final do 14<sup>o</sup> dia está apresentado na Tabela 12. No consumo de dietas e ganho de peso, foram verificadas diferenças significativas entre os grupos, exceto para aqueles cujas fontes protéicas foram a caseína e seus derivados, caseinato de cálcio e caseinato de sódio (Tabela 12).

**Tabela 12 – Valores médios do consumo diário de dieta, consumo total de dieta, ganho diário de peso, ganho total de peso e peso final, em gramas, nos seis grupos do ensaio<sup>1</sup>.**

| Grupos               | AP <sup>2</sup> | CA                      | CC                      | CS                      | PS                      | ES                     |
|----------------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| <b>Consumo / Dia</b> | 1,4±0,6         | 9,9±0,7                 | 9,6±2,6                 | 9,6±1,1                 | 6,2±1,4                 | 3,9±0,7                |
| <b>Consumo total</b> | 18,9±8,5        | 139,0±10,3 <sup>a</sup> | 133,7±36,6 <sup>a</sup> | 134,6±16,1 <sup>a</sup> | 86,7±20,3 <sup>b</sup>  | 54,6±10,4 <sup>c</sup> |
| <b>Ganho / Dia</b>   | -0,3±0,1        | 4,2±0,3 <sup>a</sup>    | 4,1±0,3 <sup>a</sup>    | 4,5±0,6 <sup>a</sup>    | 2,5±0,5 <sup>b</sup>    | 1,3±0,2 <sup>c</sup>   |
| <b>Ganho peso</b>    | -4,5±1,8        | 59,1±3,8 <sup>a</sup>   | 57,8±4,7 <sup>a</sup>   | 63,1±7,5 <sup>a</sup>   | 34,8±4,9 <sup>b</sup>   | 18,8±2,6 <sup>c</sup>  |
| <b>Peso final</b>    | 44,7±3,0        | 129,4±8,6 <sup>a</sup>  | 133,7±12,1 <sup>a</sup> | 133,3±13,5 <sup>a</sup> | 100,3±10,9 <sup>b</sup> | 79,9±7,0 <sup>c</sup>  |

AP – Aprotéico CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.

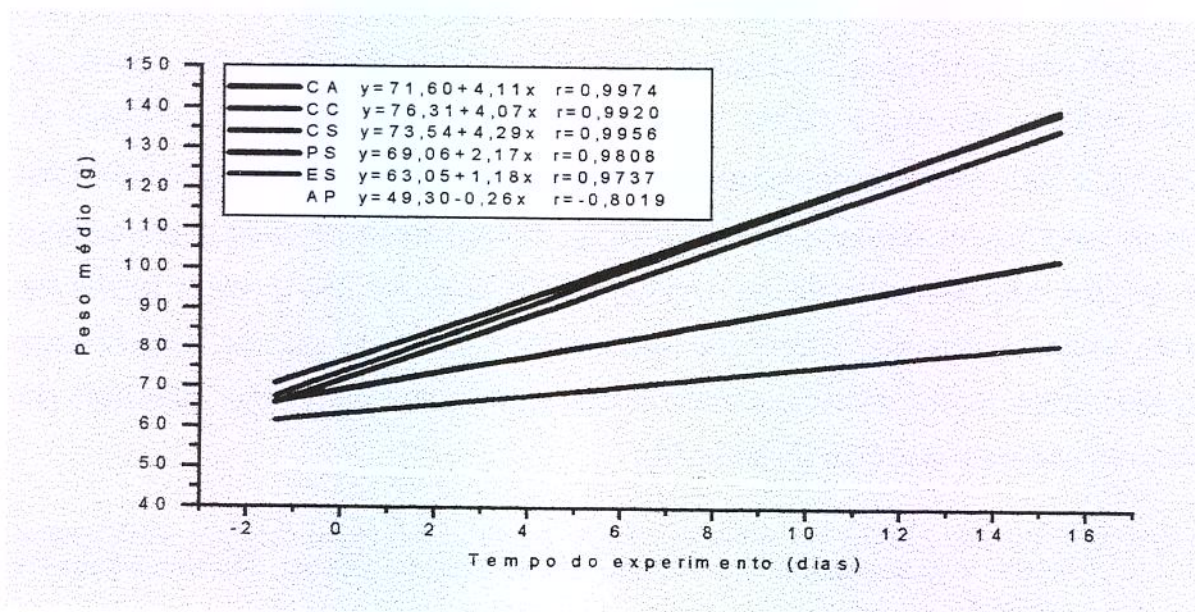
1 - Valores são média de 10 (n=10).

2 - AP: não foi utilizado para comparação estatística.

ANOVA para as linhas ( $p < 0,05$ ): as mesmas letras representam igualdade estatística entre grupos.

Na Figura 5 está apresenta a relação linear entre o ganho de peso dos ratos e o tempo decorrido, nas respectivas dietas experimentais. Estas relações foram fortes e positivas, com Coeficientes de Correlação de Pearson próximos à unidade, exceto para o grupo Aprotéico. Durante o período de adaptação (05) dias, os ratos alimentaram-se sem restrição de horário. No período experimental (14 dias) os ratos alimentaram-se a intervalos de tempo, conforme item 3.3.1. O anexo 4 mostra a evolução ponderal para cada um dos seis grupos durante o

período de adaptação e experimental.



**Figura 5 - Regressões lineares para as relações entre o peso médio e o tempo do experimento para os seis grupos do ensaio: AP – Aprotéico CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.**

#### 4.2. COCIENTE DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR (CEA)

O Cociente de Eficiência Alimentar (Ganho de Peso / Consumo de Dieta) avaliou a eficiência de cinco dietas (Figura 6). A dieta aprotéica é por definição ineficiente. No anexo 5 estão apresentados os valores do CEA para as dietas experimentais.

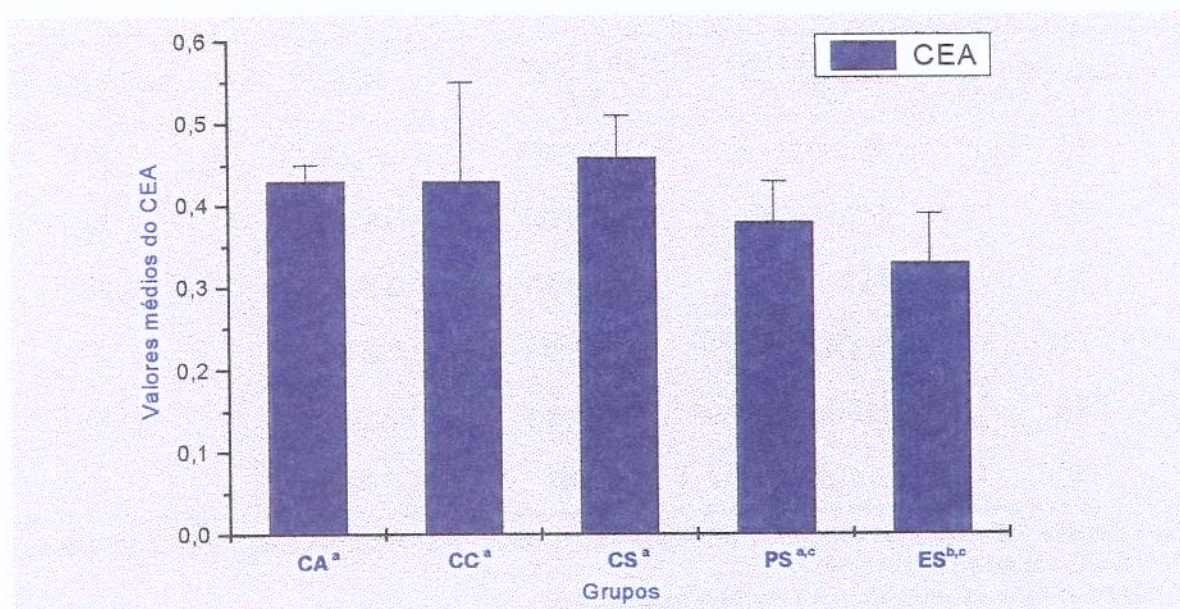


Figura 6 – Valores de CEA para os cinco grupos do ensaio. CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.

#### 4.3. COCIENTE DE EFICIÊNCIA LÍQUIDA DA PROTEÍNA (NPR) E RELATIVO (RNPR)

Os dados necessários para a determinação dos valores do NPR e RNPR, índices de qualidade das proteínas baseados no crescimento de ratos, das cinco dietas experimentais estão apresentados na Tabela 13, e seus histogramas estão representados nos anexos 6 e 7 respectivamente.

**Tabela 13 – Índices de qualidade protéica das cinco dietas: NPR e RNPR.**

| Grupos | Ganho de peso (g) <sup>1</sup> | Proteína ingerida (g) <sup>1</sup> | NPR <sup>1,2</sup>     | RNPR (%) <sup>1,3</sup> |
|--------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| CA     | 59,12±3,81 <sup>a</sup>        | 14,73±1,09 <sup>a</sup>            | 3,71±0,17 <sup>a</sup> | 93                      |
| CC     | 57,80±4,73 <sup>a</sup>        | 15,06±1,76 <sup>a</sup>            | 3,61±0,75 <sup>a</sup> | 90                      |
| CS     | 63,15±7,82 <sup>a</sup>        | 14,44±1,60 <sup>a</sup>            | 3,99±0,35 <sup>a</sup> | 100                     |
| PS     | 34,83±7,64 <sup>b</sup>        | 9,92±1,24 <sup>b</sup>             | 3,07±0,47 <sup>b</sup> | 77                      |
| ES     | 18,81±3,55 <sup>c</sup>        | 5,76±1,09 <sup>c</sup>             | 2,50±0,32 <sup>c</sup> | 63                      |
| P*     | < 0,001                        | < 0,001                            | < 0,001                |                         |

CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.  
1 – Valores são média de 10 (n=10).

2 - Média da perda de peso dos ratos em dieta aprotéica 4,5g.

3 – Proteína padrão de referência, caseinato de sódio - ensaio, NPR =3,99.

ANOVA para as colunas (p< 0,05): as mesmas letras representam igualdade estatística entre grupos.

Os valores do RNPR das dietas elaboradas com a proteína da soja, Grupo PS e Grupo ES são menores. Estes resultados serão discutidos no item 5.4.2.

Na Figura 7 está apresentada, para cada grupo, a regressão linear (Coeficiente de Correlação de Pearson) entre o consumo de proteína e o ganho de peso dos animais, durante os 14 dias do ensaio.

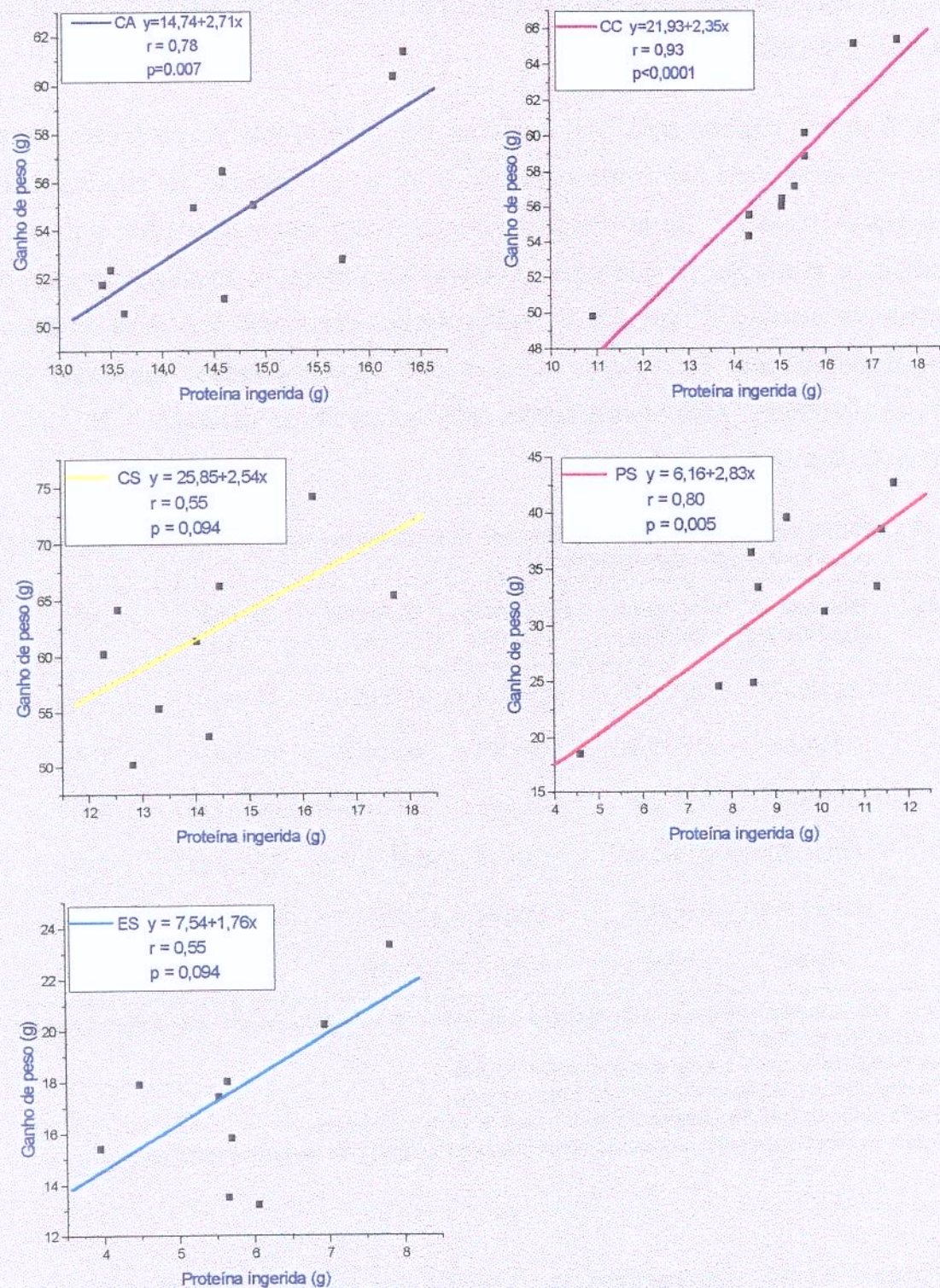


Figura 7 – Relação linear da proteína ingerida e ganho de peso dos cinco grupos do ensaio, ou demonstração gráfica do NPR.

#### 4.4. DIGESTIBILIDADES DAS PROTEÍNAS DETERMINADAS COM A DIGESTA ILEAL E A DIGESTA FECAL

Ao final do experimento, as medidas da digestibilidade verdadeira das proteínas considerando todo trato digestivo (Dvf) e, o conteúdo da digesta ileal (Dvi), portanto exclusão da atividade colônica, foram calculadas para posterior comparação e avaliação da qualidade protéica. Na Tabela 14 está apresentada a quantidade de nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal e nitrogênio ileal para os cinco grupos experimentais. Os valores médios das digestibilidades, baseados no balanço de nitrogênio, estão nesta tabela após aplicação da razão  $Dv = (Ni - (Nf - Ne)) / Ni \times 100$  (item 3.4).

**Tabela 14 - Cálculo da digestibilidade verdadeira das proteínas com o conteúdo fecal e ileal das cinco dietas experimentais<sup>1</sup>.**

| Grupos         | Nitrogênio ingerido (g) | Nitrogênio fecal (g) | Nitrogênio ileal (g) | Dv fecal <sup>2</sup> (%) | Dv ileal <sup>3</sup> (%) | P <sup>4</sup> |
|----------------|-------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| CA             | 2,31±0,17 <sup>a</sup>  | 0,24±0,06            | 0,20±0,04            | 91,25±2,47 <sup>a</sup>   | 93,17±1,54 <sup>a</sup>   | 0,056          |
| CC             | 2,30±0,63 <sup>a</sup>  | 0,25±0,05            | 0,20±0,04            | 89,64±5,53 <sup>a</sup>   | 91,83±4,71 <sup>a</sup>   | 0,353          |
| CS             | 2,30±0,27 <sup>a</sup>  | 0,22±0,04            | 0,19±0,04            | 92,24±1,76 <sup>a,b</sup> | 93,36±1,83 <sup>a</sup>   | 0,180          |
| PS             | 1,51±0,40 <sup>b</sup>  | 0,26±0,06            | 0,23±0,06            | 85,42±3,19 <sup>a,c</sup> | 87,17±2,64 <sup>b</sup>   | 0,198          |
| ES             | 1,01±0,19 <sup>c</sup>  | 0,26±0,07            | 0,17±0,04            | 77,36±8,01 <sup>b,d</sup> | 86,72±3,68 <sup>b</sup>   | 0,004          |
| P <sup>5</sup> | < 0,001                 | 0,349                | 0,068                | < 0,001                   | < 0,001                   | --             |

CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.

1 - Valores são média de 10 (n=10).

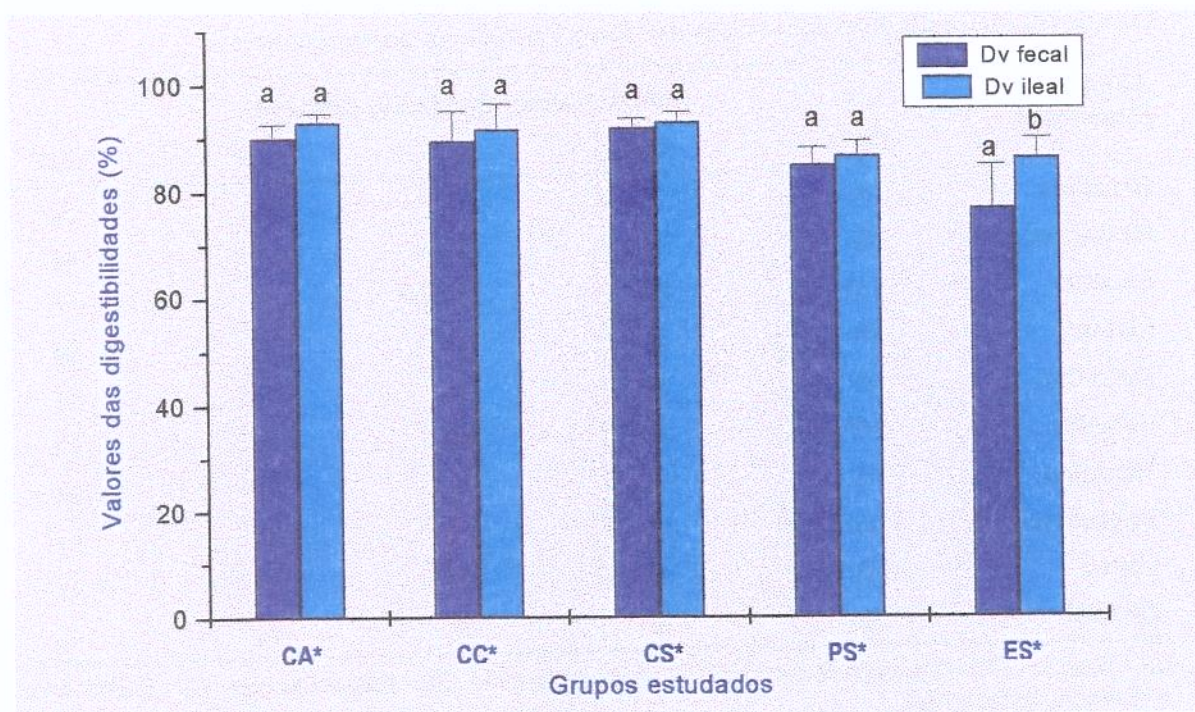
2 - Média do nitrogênio endógeno fecal, grupo aprotéico = 0,04g.

3 - Média do nitrogênio endógeno ileal, grupo aprotéico = 0,04g.

4 - Teste t, para as linhas (p<0,05) compara Dv fecal x Dv ileal para cada grupo.

5 - ANOVA para as colunas (p<0,05): as mesmas letras representam igualdade estatística entre grupos.

A figura 8 ilustra, detalhadamente, a média dos valores das digestibilidades verdadeiras das proteínas, determinadas com a digesta ileal e fecal dos cinco grupos de ensaio. A análise do N ingerido, N fecal e ileal serão discutidas no item 5.4.3. Da mesma forma as Dvi e Dvf serão avaliadas quanto à capacidade de melhor evidenciar a utilização do nitrogênio.



**Figura 8 - Comparação da digestibilidade verdadeira das proteínas com o conteúdo fecal e ileal das cinco dietas experimentais. CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.**  
 \* Teste *t* ( $p < 0,05$ ): as mesmas letras representam igualdade estatística entre grupos.

#### 4.5. AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS

Na Tabela 15 estão representados os dados da composição de aminoácidos essenciais das fontes protéicas envolvidas no ensaio. O aminograma dos caseinatos, CC e CS foram fornecidos pelo fabricante; para o perfil aminoacídico da caseína, CA, foi utilizado um perfil de aminoácidos com o mesmo teor protéico total (Sarwar, 1983). Quanto aos aminogramas dos produtos de soja, PS e ES, são idênticos, com exceção da metionina que fortifica o produto PS.

**Tabela 15 - Aminoácidos essenciais das fontes protéicas do experimento.**

| Aminoácidos<br>Essenciais | Aminograma(mg AAcE/g proteína) |                 |                 |                 |                 |
|---------------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                           | CA <sup>1</sup>                | CC <sup>2</sup> | CS <sup>2</sup> | PS <sup>3</sup> | ES <sup>3</sup> |
| Histidina                 | 30                             | 27              | 27              | 30              | 30              |
| Isoleucina                | 54                             | 48              | 48              | 44              | 44              |
| Leucina                   | 102                            | 85              | 85              | 71              | 71              |
| Lisina                    | 84                             | 77              | 77              | 64              | 64              |
| Met.+Cis.                 | 35                             | 30              | 30              | 26              | 14              |
| Fen.+Tir.                 | 115                            | 103             | 103             | 79              | 79              |
| Treonina                  | 46                             | 48              | 48              | 34              | 34              |
| Triptofano                | 13                             | 11              | 11              | 11              | 11              |
| Valina                    | 69                             | 60              | 60              | 42              | 42              |
| CP (%) <sup>4</sup>       | 86                             | 92              | 92              | 25              | 45              |

CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.

1 - Caseína, Sarwar, 1983.

2 - Fornecidos pelo fabricante – NPMZ (Brasil).

3 - Fornecida por CBO Assessoria e Análise. Valores são média de 2 (n=2). Triptofano analisado separadamente após hidrólise alcalina.

4 - Concentração Protéica.

A hidrólise ácida (alcalina para o triptofano) do conteúdo ileocecal e fezes dos seis grupos está apresentada na Tabela 16, assim como na Figura 9.

**Tabela 16 - Aminoácidos essenciais da digesta ileal e do conteúdo fecal dos seis grupos experimentais.**

| Aminoácidos<br>Essenciais | Aminograma (mg AAcE / g proteína) <sup>1</sup> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------|------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                           | AP                                             |       | CA    |       | CC    |       | CS    |       | PS    |       | ES    |       |
|                           | Ileal                                          | Fecal | Ileal | Fecal | Ileal | Fecal | Ileal | Fecal | Ileal | Fecal | Ileal | Fecal |
| Histidina                 | 5                                              | 14    | 14    | 29    | 36    | 26    | 10    | 10    | 10    | 20    | 17    | 12    |
| Isoleucina                | 26                                             | 26    | 50    | 18    | 52    | 36    | 36    | 23    | 30    | 56    | 52    | 55    |
| Leucina                   | 8                                              | 30    | 54    | 23    | 64    | 59    | 62    | 38    | 43    | 76    | 75    | 74    |
| Lisina                    | 21                                             | 19    | 39    | 16    | 34    | 34    | 3     | 19    | 34    | 58    | 55    | 50    |
| Met.+Cis.                 | 12                                             | 15    | 38    | 14    | 31    | 28    | 24    | 19    | 25    | 82    | 33    | 36    |
| Fen.+Tir.                 | 20                                             | 23    | 51    | 21    | 45    | 39    | 32    | 30    | 40    | 20    | 59    | 74    |
| Treonina                  | 19                                             | 18    | 33    | 16    | 36    | 26    | 27    | 28    | 23    | 30    | 53    | 44    |
| Triptofano <sup>2</sup>   | 5                                              | 0     | 9     | 10    | 3     | 0     | 6     | 0     | 3     | 0     | 14    | 4     |
| Valina                    | 19                                             | 18    | 47    | 16    | 46    | 33    | 32    | 25    | 32    | 53    | 52    | 54    |

AP – Aprotéico CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.

1 - Valores são média de 2 (n=2).

2 - Triptofano analisado separadamente após hidrólise alcalina.

A diferença entre a quantidade dos aminoácidos essenciais presentes na digesta ileal e no conteúdo fecal dos ratos alimentados com as cinco dietas experimentais não foi constante, sendo que alguns foram mais afetados pela degradação bacteriana que outros.

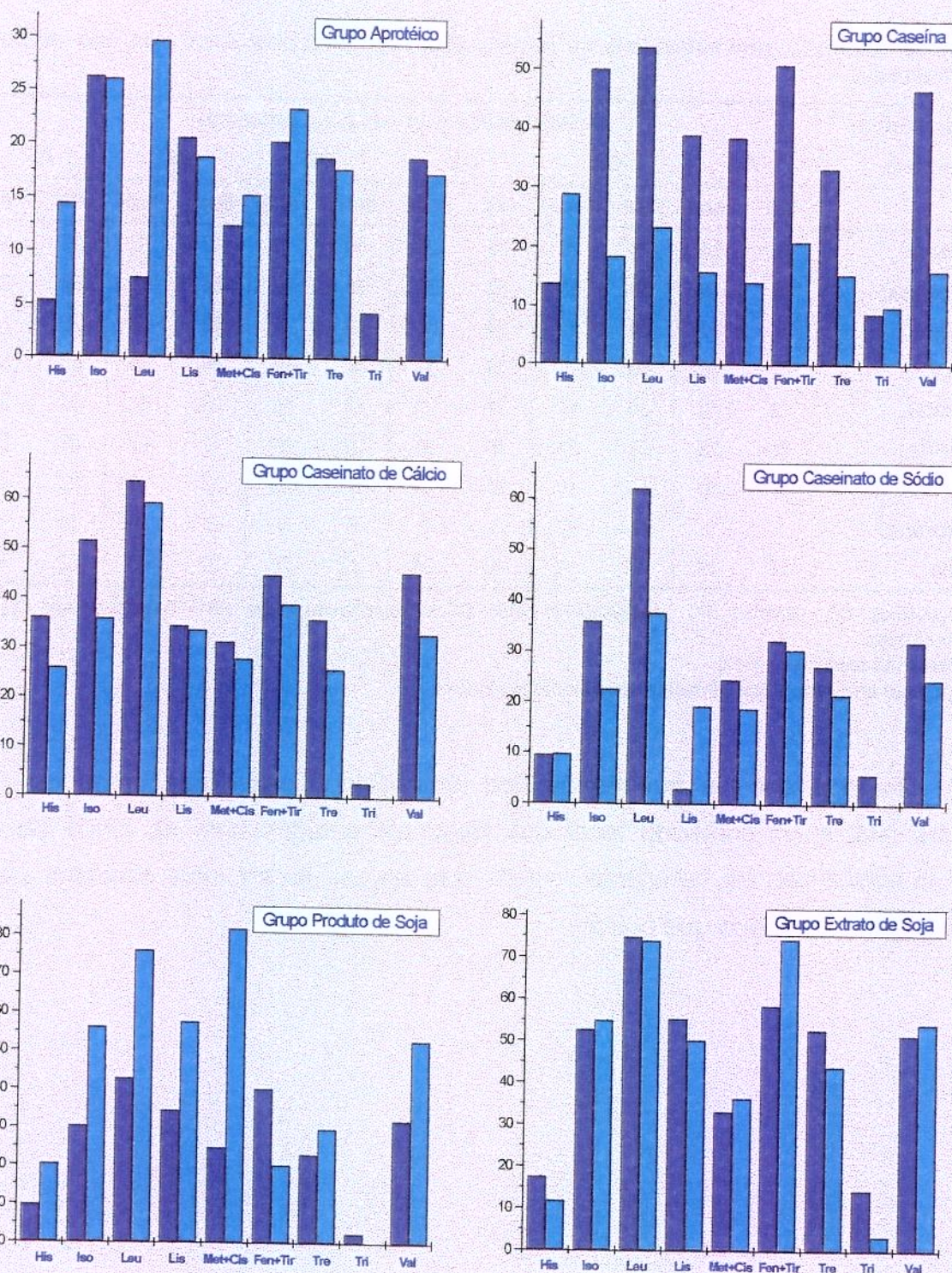


Figura 9 – Comparação dos valores médios dos aminoácidos essenciais (mgAAcE/g proteína) presentes na digesta ileal(■) e no conteúdo fecal (■) para os seis grupos do ensaio.

#### 4.6. DIGESTIBILIDADE DOS AMINOÁCIDOS DETERMINADA COM A DIGESTA ILEAL E O CONTEÚDO FECAL

Os valores da digestibilidade dos aminoácidos essenciais das cinco dietas experimentais, baseada no balanço de nitrogênio de ratos em crescimento, foram determinados com os dados representados nas Tabelas 15 e 16, os quais foram aplicados na fórmula de Dv (item 3.4), estes valores estão apresentados na Tabela 17.

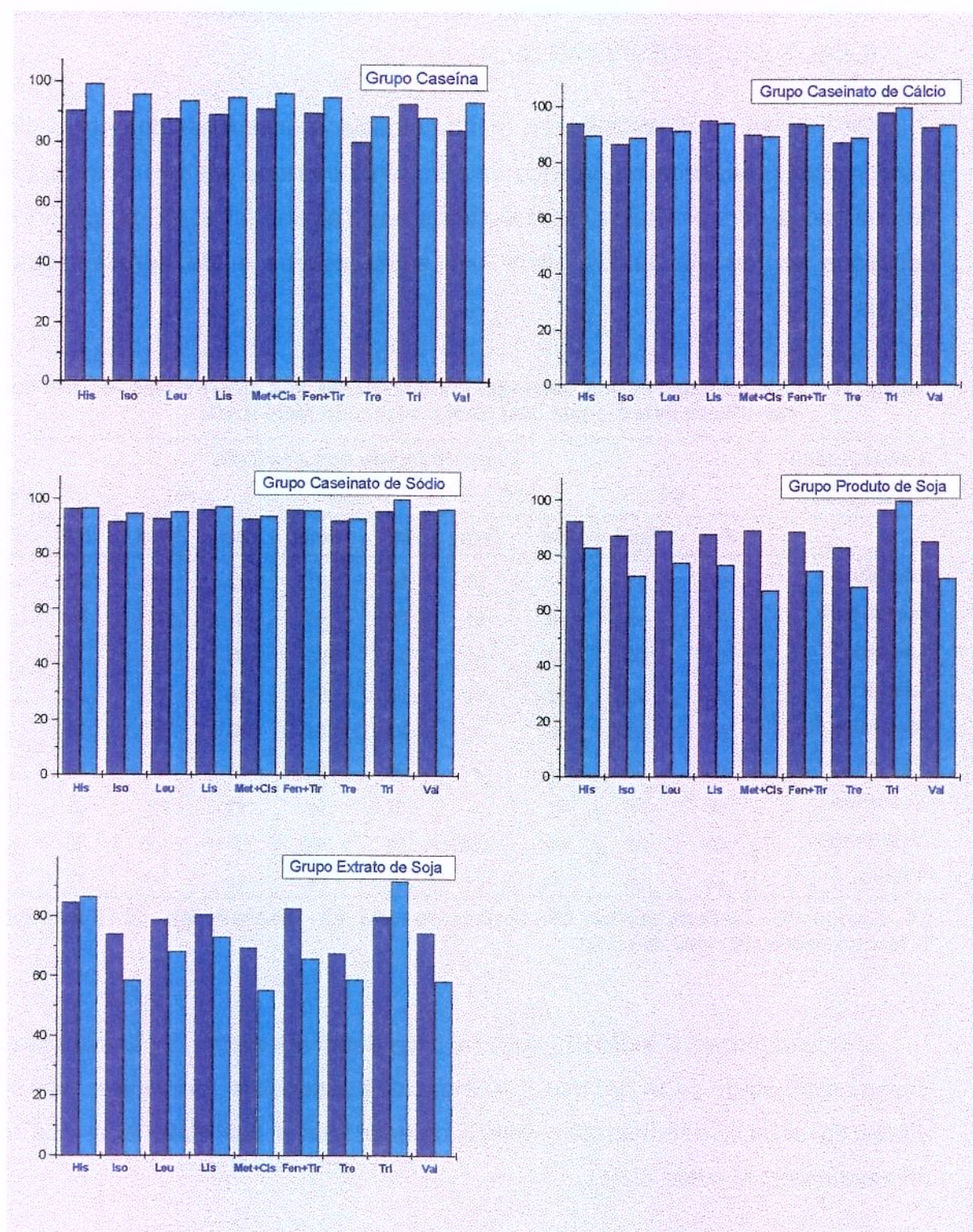
**Tabela 17 - Digestibilidades dos aminoácidos essenciais das cinco dietas experimentais calculadas pela digesta ileal (Dvi) e conteúdo fecal (Dvf).**

| Aminoácidos<br>Essenciais | Digestibilidade dos AAce (%) <sup>1</sup> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------|-------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                           | CA                                        |       | CC    |       | CS    |       | PS    |       | ES    |       |
|                           | Ileal                                     | Fecal | Ileal | Fecal | Ileal | Fecal | Ileal | Fecal | Ileal | Fecal |
| <b>Histidina</b>          | 91                                        | 92    | 94    | 90    | 96    | 97    | 92    | 80    | 85    | 87    |
| <b>Isoleucina</b>         | 90                                        | 96    | 86    | 89    | 92    | 95    | 87    | 73    | 74    | 59    |
| <b>Leucina</b>            | 88                                        | 94    | 92    | 91    | 93    | 95    | 89    | 77    | 79    | 68    |
| <b>Lisina</b>             | 89                                        | 95    | 95    | 94    | 96    | 97    | 88    | 77    | 81    | 73    |
| <b>Met.+Cis.</b>          | 91                                        | 96    | 90    | 89    | 93    | 94    | 89    | 67    | 70    | 55    |
| <b>Fen.+Tir.</b>          | 90                                        | 95    | 94    | 94    | 96    | 96    | 89    | 75    | 83    | 66    |
| <b>Treonina</b>           | 80                                        | 89    | 87    | 89    | 92    | 93    | 83    | 69    | 68    | 59    |
| <b>Triptofano</b>         | 93                                        | 88    | 98    | 100   | 96    | 100   | 97    | 100   | 80    | 92    |
| <b>Valina</b>             | 84                                        | 93    | 93    | 94    | 96    | 96    | 85    | 72    | 75    | 59    |

CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.

1 - Item 3.5, valores são média de 2 (n=2).

Os histogramas (Figura10), ilustram mais detalhadamente, a comparação das digestibilidades de cada um dos 8 aminoácidos essenciais presentes nas cinco dietas do ensaio, determinadas com a digesta ileal e conteúdo fecal dos ratos alimentados com estas dietas.



**Figura 10 - Comparação da digestibilidade verdadeira dos aminoácidos essenciais (%) determinada com a digesta ileal (■) e conteúdo fecal (■), das cinco dietas do ensaio.**

#### 4.7. ESCORE QUÍMICO DE AMINOÁCIDOS E ESCORE DE AMINOÁCIDOS CORRIGIDO PELA DIGESTIBILIDADE DA PROTEÍNA (PDCAAS) CALCULADO PELA DIGESTA ILEAL (Dvi) E O CONTEÚDO FECAL (Dvf).

Os escores químicos dos aminoácidos essenciais das cinco dietas experimentais foram calculados de acordo com o item 3.4., considerando o padrão de proteína FAO/WHO/UNU, 1990. Estes valores são mostrados na Tabela 18.

**Tabela 18 - Cálculo do escore químico dos aminoácidos das cinco dietas experimentais.**

| Aminoácidos Essenciais | Padrão FAO <sup>1</sup> | Escore de Aminoácidos(%) <sup>2,3,4.</sup> |     |     |  |
|------------------------|-------------------------|--------------------------------------------|-----|-----|--|
|                        |                         | CA, CC, CS                                 | PS  | ES  |  |
| Histidina              | 14                      | 100                                        | 100 | 100 |  |
| Isoleucina             | 28                      | 100                                        | 100 | 100 |  |
| Leucina                | 66                      | 100                                        | 100 | 100 |  |
| Lisina                 | 58                      | 100                                        | 100 | 100 |  |
| Met.+Cis.              | 25                      | 100                                        | 100 | 56  |  |
| Fen.+Tir.              | 63                      | 100                                        | 100 | 100 |  |
| Treonina               | 34                      | 100                                        | 100 | 100 |  |
| Triptofano             | 11                      | 100                                        | 100 | 100 |  |
| Valina                 | 35                      | 100                                        | 100 | 100 |  |

CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.

1 - FAO/WHO/UNU (mgAAcE / g proteína), 1990: 2 – 5 anos.

2 - Cálculo de sAA está no item 3.4.

3 - Ver tabela 15 para valores de AAcE das fontes protéicas.

4 - Valores superiores a 100, são considerados 100.

Na Tabela 19 encontra-se os valores do PDCAAS para as cinco dietas experimentais calculados com a digestibilidade verdadeira da proteína determinada com a digesta ileal e com o conteúdo fecal.

**Tabela 19 - Escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS) considerando a digesta ileal e o conteúdo fecal das cinco dietas experimentais.**

| Aminoácidos<br>Essenciais | PDCAAS (%) <sup>1,2,3</sup> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                           | CA                          |       | CC    |       | CS    |       | PS    |       | ES    |       |
|                           | Ileal                       | Fecal | Ileal | Fecal | Ileal | Fecal | Ileal | Fecal | Ileal | Fecal |
| Histidina                 | 91                          | 92    | 94    | 90    | 96    | 97    | 92    | 80    | 85    | 87    |
| Isoleucina                | 90                          | 96    | 87    | 89    | 92    | 95    | 87    | 73    | 74    | 59    |
| Leucina                   | 88                          | 94    | 93    | 91    | 93    | 95    | 89    | 78    | 79    | 68    |
| Lisina                    | 89                          | 95    | 95    | 94    | 96    | 97    | 88    | 77    | 81    | 73    |
| Met.+Cis.                 | 91                          | 96    | 90    | 90    | 93    | 94    | 89    | 68    | 39    | 31    |
| Fen.+Tir.                 | 90                          | 95    | 94    | 94    | 96    | 96    | 89    | 75    | 83    | 66    |
| Treonina                  | 80                          | 89    | 87    | 89    | 92    | 93    | 84    | 69    | 68    | 59    |
| Triptofano                | 93                          | 88    | 98    | 100   | 96    | 100   | 97    | 100   | 80    | 92    |
| Valina                    | 84                          | 93    | 93    | 94    | 96    | 97    | 85    | 72    | 75    | 59    |
| Valor médio               | 88                          | 93    | 92    | 92    | 94    | 94    | 89    | 77    | 73    | 66    |

CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.

1 - Cálculo, item 3.5 (PDCAAS= sAA x Dv).

2 - Valores da digestibilidade verdadeira dos aminoácidos Dv (ileal e fecal), tabela17.

3 - Valores dos escores de aminoácidos das proteínas, sAA, tabela 18.



## **5. DISCUSSÃO**

Este trabalho está vinculado à necessidade da Avaliação da Qualidade Protéica de produto de mercado, por solicitação de firma brasileira para certificação de qualidade de seu produto. Caseína, Caseinato de cálcio e Caseinato de sódio, proteínas de alto valor biológico foram consideradas, para constituírem parâmetros de avaliação e de comparação de proteína animal e proteína vegetal. A avaliação da qualidade das fontes protéicas se baseou em bioensaio de crescimento e de balanço nitrogenado, utilizando ratos recém-desmamados (McDonough et al., 1990).

### **5.1. ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO**

Os estudos quando usados sobre populações humanas são demorados e de custo elevado (Knudsen et al., 1994). Diversas espécies de animais são empregadas em pesquisas na área da nutrição, visando à avaliação do valor nutricional das proteínas dos alimentos e também melhor conhecimento de disfunções nutricionais.

Neste trabalho, a escolha do rato como animal de experimentação, independente da facilidade de obtenção, tamanho adequado e natureza dócil, considerou o fato de ser onívoro, e adaptação às diversas dietas experimentais, assim como pela semelhança com humanos no que tange à fisiologia do sistema digestivo, representando, portanto um modelo próximo do ideal (Baker et al., 1979; Boin et al., 1998).

Ensaio biológico baseado em crescimento ponderal de ratos foram muito utilizados para avaliar a qualidade das proteínas nos alimentos, (Pellett & Young, 1980; Sarwar et al., 1984). Estes animais, em razão da velocidade de crescimento, requerem relativamente grande quantidade de aminoácidos essenciais. Sabe-se, que os requerimentos de aminoácidos sulfurados são 50% mais altos para ratos em relação a humanos, o que é, sobretudo devido à pelagem. Os outros aminoácidos têm diferenças relativamente pequenas (Steinke, 1979; Sarwar et al., 1985b). Existem renovados estudos do metabolismo do rato para aprimorar os

valores de seus requerimentos em aminoácidos, e por consequência redimensionam-se os requerimentos em aminoácidos para humanos. A Tabela 20 mostra a evolução dos requerimentos ocorridos durante 30 anos de estudo em ratos.

**Tabela 20 – Evolução dos requerimentos de aminoácidos essenciais para crescimento de ratos. A coluna FAO/WHO estabelece os requerimentos propostos para humanos.**

| <b>Aminoácidos Essenciais</b> | <b>NRC<sup>1</sup><br/>(1972)</b> | <b>NRC<sup>1</sup><br/>(1978)</b> | <b>NRC<sup>1</sup><br/>(1995)</b> | <b>FAO/WHO<sup>2</sup><br/>(1990)</b> |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Histidina                     | 30                                | 30                                | 19                                | 14                                    |
| Isoleucina                    | 55                                | 50                                | 41                                | 28                                    |
| Leucina                       | 75                                | 75                                | 71                                | 66                                    |
| Lisina                        | 90                                | 70                                | 61                                | 58                                    |
| Met.+Cis.                     | 60                                | 60                                | 65                                | 25                                    |
| Fen.+Tir.                     | 80                                | 80                                | 68                                | 63                                    |
| Treonina                      | 50                                | 50                                | 41                                | 34                                    |
| Triptofano                    | 15                                | 15                                | 13                                | 11                                    |
| Valina                        | 60                                | 60                                | 49                                | 35                                    |

1 – National Research Council.

2 – Faixa etária 2-5 anos.

Como no homem, o duodeno do rato recebe a quase totalidade da ingesta protéica, porque é mínima a digestão das proteínas no estômago. É no duodeno que as atividades enzimáticas da tripsina, quimotripsina e elastase, clivam as proteínas em oligopeptídeos, contendo 2 a 6 resíduos de aminoácidos, que seguirão para a porção absorptiva do jejuno, podendo haver alguma absorção no íleo proximal e medial. No íleo distal, ou seja, no último segmento do intestino delgado considera-se ser mínima a absorção de aminoácidos. A retirada de água da digesta ileal e, as fermentações da microflora bacteriana acontecem a nível colônico (Metges, 2000).

No rato e em humanos, a proporção de oligopeptídeos e aminoácidos formados no processo digestivo, varia de acordo com o tipo da proteína, sendo o processo considerado eficiente. Estudos revelam que, apenas 2 a 5% da proteína ingerida pode escapar do primeiro terço da área absorptiva estudos mostraram que podem ser encontradas proteínas no jejuno distal e íleo proximal (Linder, 1991).

Existe dificuldade em estabelecer um tamanho médio para o intestino delgado do rato. Diâmetro entre 2,5mm a 7,0 mm é aceito como padrão, ao passo que o comprimento atinge 100cm a 140cm no animal adulto. Entretanto, há diferenças na fisiologia do intestino de ratos e homem. O rato pode praticar a coprofagia, se privado de alimento balanceado e possui um ceco proporcionalmente maior, o que pode influenciar na degradação bacteriana das fibras dietárias e na absorção das proteínas (Knudsen et al., 1994).

No estudo da digestibilidade protéica, os ratos são utilizados em razão da sua similaridade digestiva com humanos, o que é reconhecido também pela FAO/WHO/UNU, 1990 (Bodwell et al., 1980; Sarwar, 1987).

## **5.2. MÉTODO**

Foi adotado o método do balanço nitrogenado, em duas tomadas do fluxo digestivo para estimar a quantidade de aminoácidos não absorvidos: na digesta ileal e no conteúdo fecal (Darragh & Hodgkinson, 2000; Clapper et al., 2001).

Quanto à caseína, esta é a proteína referência em ensaios biológicos. A escolha dos caseinatos ocorreu em função da seguinte hipótese: utilizando um produto mais elaborado do que a caseína comercial poder-se-ia ter melhor digestibilidade?

As dietas contendo proteína animal foram comparadas com duas dietas elaboradas com Extrato Hidrossolúvel de Soja. Sendo neste estudo o EHS oriundo do Farelo de Soja, justifica-se um novo estudo de biodisponibilidade.

O período de ensaio, 14 dias permitiu determinar o NPR e correlato RNPR, assim como digestibilidade.

Em relação às dietas utilizadas, no que tange à concentração protéica, muitos estudos utilizam 8% (Sarwar & Peace, 1994) para aferir com a proteína de caseína ou ovo. Neste trabalho as dietas experimentais foram elaboradas com

10% de concentração protéica para fornecer talvez, adequação relativa à menor qualidade nutricional da proteína vegetal (Angelis, 1981).

Quanto ao método de administração das dietas a técnica de alimentação intermitente (Benito et al., 1997,1998) que consistia em uma pré-refeição de 15 minutos antes da refeição, com duração de uma hora (ofertada duas vezes ao dia), teve a finalidade de aumentar e condicionar o tempo de refeição e estimular um consumo similar para todas as dietas, o que realmente ocorreu para as dietas CA, CC e CS. As dietas PS e ES tiveram consumos semelhantes dentro do grupo, porém não são comparadas entre si.

Com respeito ao trecho intestinal escolhido para análise da digesta, a escolha do íleo distal e ceco foi embasada na literatura (Knudsen & Jensen, 1991, Jorgensen & Jensen, 1994). É importante salientar que, Knudsen et al., 1994, considera o ceco o principal órgão fermentativo do rato, em contraste com o homem onde a fermentação mais significativa ocorre no cólon. Neste trabalho, optou-se pela retirada do conteúdo cecal, para se conseguir quantidade suficiente de digesta, porque o íleo no rato não armazenava alimento não digerido, mas acumulava-o posteriormente no ceco.

### **5.3. EVOLUÇÃO PONDERAL**

Os grupos CA, CC, CS tiveram consumo médio diário semelhante (9,9g, 9,6g e 9,6g). A aceitação do alimento foi menor nas dietas formuladas com proteína de soja (PS e ES). O grupo ES apresentou o menor consumo médio diário (Tabela 11).

O ganho médio de peso dos grupos de ratos foi em torno de 10 a 12g/semana, o que está de acordo com Sarwar e Peace, 1994, os quais consideram ser este o aumento de peso de ratos em crescimento.

A figura 5 apresenta evolução ponderal superior para os ratos sob proteína animal (CA, CC e CS) em relação aos que receberam a proteína da soja. Os

grupos, PS e ES, obtiveram menor peso, o que não significa necessariamente menor desenvolvimento corporal. Resultados semelhantes foram relatados por Esteves et al., 1996, em experimentos, utilizando bezerros como animal de experimentação.

Curiosamente, o Grupo AP, sob dieta isenta de proteína apresentou acentuada perda de peso no início do experimento e posterior tendência a uma adaptação; resultado semelhante foi relatado por Angelis, 1981.

## **5.4. ANÁLISES NUTRICIONAIS**

### **5.4.1. Cociente de eficiência alimentar (CEA)**

Para o CEA, não foi encontrada diferença qualitativa ( $p < 0,05$ ) com relação à natureza da fonte protéica, com exceção do grupo ES que não diferiu do grupo PS ( $p > 0,05$ ), mas diferiu dos demais ( $p < 0,05$ ), o que já era esperado, em razão do baixo consumo de sua dieta experimental (Figura 6, Anexo 5).

### **5.4.2. Cociente de Eficiência Líquida da proteína (NPR) e relativo (RNPR)**

A literatura enfatiza o NPR e o RNPR como o método mais adequado, baseado no crescimento de ratos, para avaliar qualidade protéica de alimentos (Pellett & Young, 1980; Sarwar et al., 1984).

Neste trabalho, os valores de NPR estão relacionados com a fonte protéica, ou seja, em dietas contendo proteína do leite, CA, CC e CS, os valores são estatisticamente semelhantes, entre 3,6 a 4,0, e estão dentro da faixa de valores apresentada pela literatura consultada (Sarwar, 1997). O NPR para PS ainda tem bom índice (3,1) para proteína de origem vegetal e, menor em relação à proteína animal (Tabela13).

É necessário reiterar que sendo a ingesta de PS e ES relativamente menor em relação aos grupos CA, CC e CS, é evidente que o NPR seriam menores para

PS e ES, visto que tiveram menor ingesta. Estes fatos permearão todo trabalho, sem invalidá-lo conforme se demonstrará ao longo da discussão.

Os dados sugerem que o NPR pode ser melhor apreciado quando se analisa a Regressão Linear (Figura 7). Os valores da proteína ingerida e ganho ponderal dos três grupos sob dieta CA, CC e CS, como já foi citado são estatisticamente semelhantes ao NPR. O Coeficiente de Regressão Linear ( $r$ ) para a dieta do grupo CC (Caseinato de Cálcio) é 0,93 e 0,80 para o grupo PS (Produto de Soja), ou seja, analisando todos os coeficientes de regressão linear, são estas duas dietas as que obtiveram maiores coeficientes.

Outro fato importante é a evolução ponderal apresentada pelo grupo PS. Esta dieta tem suplementação com metionina e quando comparada com o grupo ES não suplementado, demonstrou o esperado melhor desempenho e, semelhante à de Mitchell & Jenkins, 1985 e Harris & Burns, 1988, os quais relataram 81% a 93% de RNPR para dietas com EHS.

#### **5.4.3. Digestibilidade protéica - ileal e fecal**

Estudos recentes enfatizam que as variações dos coeficientes de digestibilidade fecal e ileal não são constantes entre aminoácidos das dietas, porque alguns aminoácidos são mais afetados pela degradação bacteriana no intestino grosso. Portanto, a determinação de coeficiente de digestibilidade para cada aminoácido quando se calcula o PDCAAS poderia ser mais apropriada (Darragh & Hodgkinson, 2000).

A Tabela 14 apresenta os valores de Dvf e Dvi para iniciar a discussão de digestibilidade. Como se poderia esperar a Dv de proteína animal (CA, CC e CS) é estatisticamente semelhante ( $p \geq 0,05$ ) para íleo e reto. O presente resultado difere daqueles levantados por Moughan & Donkoh, 1991, apresentado no item 2.4., Tabela 4: sem citar as dietas, os autores mostraram que entre cinco animais (ratos e humanos inclusos) a amostra fecal é mais completa em relação a ileal. Um fato é relevante: não ocorrendo citação sobre as dietas, é provável que as análises de

digestibilidade sejam obtidas de misturas protéicas, o que não ocorre no presente trabalho.

A análise dos valores de aminoácidos essenciais da digesta na região ileocecal e no reto (Tabela 16, Figura 9) não apresenta diferenças consideráveis, o que significa não ter obtido no íleo e no reto, evidências de melhor absorção de proteína (CA, CC, CS) animal.

Quando se calcula a digestibilidade de cada aminoácido essencial no íleo obtém-se uma evidência: a digestibilidade dos aminoácidos essenciais é alta para a proteína animal e também o é para as dietas contendo proteína vegetal (Tabela 17).

Por outro lado a digestibilidade média obtida da soma das digestibilidades parciais dos aminoácidos essenciais de cada uma das dietas é semelhante a digestibilidade obtida, quando se efetuou a determinação da digestibilidade total.

A digestibilidade dos aminoácidos essenciais (Tabela 17 e Figura 10) é idêntica para os três grupos de produtos lácteos (CA, CC e CS). A caseína comercial (CA) chega ao íleo com 90% a 95% de digestibilidade, a qual será cerca de 100% a nível de reto. Quanto aos caseinatos CC e CS, estes apresentam melhor digestibilidade já a partir do íleo. A digestibilidade ileal para estes é muito semelhante a digestibilidade fecal, o que permite concluir que não haveria a necessidade de acessar o íleo.

Estes dados estão em concordância com Rutherford & Moughan, 1998, que também se dedicaram a analisar a proficiência da digestibilidade ileal e fecal utilizando seis produtos lácteos e dois produtos de soja. No presente trabalho, os histogramas de digestibilidade de aminoácidos (Figura 10) demonstram superioridade de digestibilidade para a proteína do leite. Com referência aos produtos de soja, Rutherford & Moughan (1998), utilizando proteínas de concentrações distintas, (mas dietas isoprotéicas) também obtiveram resultados de digestibilidade discretamente menores nas fezes como ocorreram no presente trabalho.

#### 5.4.4. PDCAAS

O escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade verdadeira das proteínas (PDCAAS) é usado como rotina para avaliar a qualidade nutricional das proteínas e foi oficializado pela FAO/WHO, desde 1991. Considera não somente a composição de aminoácidos das proteínas, comparada com um padrão, como também suas digestibilidades.

Neste trabalho, as dietas à base de caseína e caseinatos (CA, CC e CS) e produto de soja (PS) apresentaram Escore de Aminoácidos  $\geq 1,0$  (Tabela 18), ou seja, para estes grupos os valores de PDCAAS dependeram somente dos valores da Dv (PDCAAS = Dv).

Na literatura consultada, os autores sugerem que possíveis variações no resultado da composição de aminoácidos de uma mesma fonte protéica (Coeficiente de Variação – CV) sejam consideradas, quando se calcula parâmetros nutricionais para alimentos (Sarwar et al., 1983).

Portanto, neste modelo experimental, considerando CV – 10% para caseína e caseinatos verifica-se, similaridade entre os valores do PDCAAS calculado com digesta ileal e conteúdo fecal para as dietas elaboradas com a proteína animal (Tabela 19). Para os grupos alimentados com dietas com a proteína da soja, o valor do PDCAAS calculado com a digesta ileal foi sempre maior que o calculado com o conteúdo fecal.

Os resultados permitem afirmar que a absorção ileal é eficiente para caseínas e proteína de soja. Quanto ao cólon, os fenômenos de digestão microbiana e/ou a entrada de células colônicas descamadas para as fezes foram muito pequenas. O balanço destas pequenas intervenções favorece a hipótese aqui defendida, isto é: para proteína de alto valor biológico a absorção e, portanto digestibilidade ileal é perfeita. Todavia não há necessidade de mudar o método de coleta de fezes, porque demonstraram-se valores equivalentes para proteína animal.

Quanto à proteína vegetal a digestibilidade ileal é também perfeita, a média, 89% é equivalente àquela obtida para proteína animal, isto é, 92%. A digestibilidade fecal é menor sob dieta protéica vegetal, o que permite inferir um estado de fisiologia colônica diferente sob dieta vegetal.

Na Tabela 19, os cálculos dos PDCAAS demonstraram similaridades com aqueles encontrados por Sarwar & Peace, 1994. Estes, com um modelo experimental semelhante determinaram valores do PDCAAS entre 86 – 93% para dietas à base de caseína e caseinatos. Para a dieta elaborada com a proteína vegetal, o valor de PDCAAS 77 – 89% se enquadra na faixa relatada por Sarwar & McDonough, 1990.



## **6. CONCLUSÃO**

Os três grupos de ratos sob as dietas controles à base de caseína e derivados obtiveram o mesmo consumo, evolução ponderal e Cociente de Eficiência Alimentar, o que não era esperado, visto que para caseinatos poderia ocorrer desempenho superior em relação à caseína comercial.

Quanto às dietas contendo Produto de Soja e Extrato de Soja, os consumos foram respectivamente 35% e 59% menores em relação ao controles. Estes consumos foram adequados para Produto de Soja, mas para Extrato de Soja a baixa ingesta interferiu nos índices de qualidade protéica.

Os valores de Cociente de Eficiência Líquida da Proteína foram relacionados à fonte protéica, ou seja, nas três dietas controles (Caseína, Caseinato de Cálcio e Caseinato de Sódio) os valores estão entre 3,6 a 4,0. Para o grupo sob dieta do Produto de Soja, o NPR é 3,1. Entretanto quando efetuada a Análise de Regressão Linear entre as variáveis ganho ponderal e proteína ingerida, o grupo Produto de Soja alcança  $r = 0,80$ , comparável ao grupo à base de caseína comercial e próximo do grupo Caseinato de Cálcio que obteve  $r = 0,93$ . O bom resultado do Cociente de Eficiência Líquida da Proteína (3,1) para o grupo Produto de Soja sugere que a menor ingesta (35%) abaixo do grupo controle não afetou a avaliação desta análise nutricional.

A Digestibilidade Verdadeira para os três grupos controles (Caseína, Caseinato de Cálcio, Caseinato de Sódio) foram semelhantes para íleo e reto, o que permite concluir que não há necessidade de acessar o íleo para proteínas animais de alta digestibilidade. Quanto ao grupo Produto de Soja os resultados indicam que no íleo e no reto as digestibilidades são em média próximas as digestibilidades das dietas a base de caseína. Todavia a Digestibilidade Verdadeira determinada com o conteúdo fecal é menor sob dieta protéica vegetal, confirmando que existe um estado de fisiologia colônica diferente sob dieta vegetal.

A fortificação de produtos de soja com 45% de proteína em aminoácidos sulfurados aumenta sua qualidade nutricional, e apenas sob esta condição, aproxima o seu desempenho ao da dieta à base de caseína.

Desta forma, pode-se afirmar que dentro de consumos adequados, a proteína de soja é nutricionalmente correta, quando devidamente fortificada em aminoácidos sulfurados e proveniente de um produto de soja com 45% de proteína, valor usualmente atingido na presente década para produto protéico de soja.

Fica evidenciada a superioridade da composição aminoacídica dos caseinatos em relação à proteína de soja.

## 7. SUMMARY



The evaluation of the protein's quality requires a constant improvement of the used methods for a more accurate determination of their real use. For this reason, the Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS), through the study with rats is employed for this evaluation, for it counts not only for the chemical score of the amino acid, but also for their digestibility, what makes possible to find the first limiting amino acid. The present study, products containing soy protein was evaluated by the PDCAAS, on two takes of the digestive flow to estimate the amount of non absorbed amino acid: fecal contents and digested ileal. This evaluation is done by determining the quantity of essential amino acids of the protein being studied, referred to as FAO/WHO hypothetical standard (1990). The hypothesis of the work is that it may be bioavailability similarities between essential amino acids of vegetable and animal sources. The products containing soy protein were tested, where only one (product PS) was fortified with 0,3% of methionine and compared to a diet based on casein (commercial, sodium caseinate, calcium caseinate) the diets were administered to five groups made up of 10 Wistar male Weaning rats. A sixth group was feed with a protein diet to estimate endogenous losses of nitrogen. The group under the casein and caseinates diet presented accented similarities: ingest, pondered gains, fecal nitrogen providing similar values to the true digestibility (Dv) estimate, and amino acids score  $\geq 1,0$ , that is PDCAAS = Dv for these groups. As for the two groups under soy diet, called PS and ES, the ingest were 65% and 41%, respectively in relation to the control even though the diets were equally balanced and flavored. The Dv fecal and ileal for the three control groups were statistically similar and on interval of 90 to 93%. As for the PS groups was significantly similar to the control, as for the Dv fecal, and 3% below the control in relation to the Dv ileal. This first result shows that the soy protein in small scale does not get at the Dv obtained for casein and derived. As for the chemical score of essential amino acids was  $\geq 1,0$  to the PS group and to the ES group 0,56 was obtained from the methionine/cysteine score, what resulted in a PDCAAS 84% to PS, and 39% to ES, what indicates that a soy product (45% protein concentration) fortified by amino acids sulfurs reaches a expressive value and close to the performance of the casein based diet. It shows on the ileo the bioavailability of the essential amino acid of the caseins diet are similar to the

bioavailability of the amino acid on a soy protein diet. Considering that up to the ileo the digestion of amino acid are satisfactory, it can be said that with in a adequate consumption, the soy protein is nutritially correct, when properly fortified in amino acid sulfurs and coming from a soy product with a 45% protein, a value usually aquired on the present decade to soy protein product.



## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANGELIS, R. C. Digestibilidade e eficiência da proteína de uma mistura de arroz e feijão. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 127-131, Jul. - Set., 1981.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. Edição W. Horwitz. 12. ed. Washington, D.C., 1975. p. 857.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. Edição Patrícia Cunnif. 16. ed. Arlington, 1995. v. 1.

BAKER, H. J. Utilization of precursors for L-amino acids. In: D'Mello, J. P. F. (Ed.). **Amino acids in farm animal nutrition**. Wallingford: CAB International, 1995. Chap. 3, p. 37-61.

BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R.; WEISBROTH, S. H. **The laboratory rat: biology and diseases**. New York: Academic Press, 1979. v. 1, 115 p.

BARTH, C. A.; SCHAAFSMA, G. A critical assessment of the PDCAAS, a protein evaluation system, issued by FAO/WHO/UNO in 1990/1991. **IDF Nutrition Newsletter**, Brussels, n. 143, p. 39 - 40, 1995.

BENITO, P.; HOUSE, W.; MILLER, D. Influence of iron supplementation frequency on absorption efficiency and mucosal ferritin in anemic rats. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 78, n. 3, p. 469-477, 1997.

BENITO, P.; HOUSE, W.; MILLER, D. Comparison of oral and intraperitoneal iron supplementation in anemic rats: a re-evaluation of the mucosal Block theory of iron absorption. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 79, n. 6, p. 533-540, 1998.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911 - 917, 1958.

BODWELL, C. E.; MARABLE, N. L. Effectiveness of methods for evaluating the nutritional quality of soybean protein. **Journal of American Oil Chemists Society**.

Champaign, v. 58, n. 3, p. 475 - 483, 1981.

BODWELL, C. E.; SATTERLEE, L. D.; HACKLER, L. R. Protein digestibility of the same protein preparation by human and rat assays and by vitro enzymic digestion methods. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 33, n. 3, p. 677-686, Mar., 1980.

BOIN, I. F. S. F.; SILVA JR, O. C.; LEONARDI, L. S. Isquemia Hepática experimental. In: SILVA JR, O. C.; ZUCOLOTO, S.; BEER JR, A. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo: Robe, 1998. p. 465 - 474.

BRESSANI, R. The role of soybeans in food systems. **Journal American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 58, n. 3, p. 392-400, 1981.

BRICKER, M. L.; MITCHELL, H. H. The protein requirements of the adult rat in the terms of the protein contained in egg, milk and soy flour. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 34, n.5, p. 491-505, 1947.

BUTTS, C. A.; MOUGHAN, P. J.; SMITH, W. C.; CARR, D. H. Endogenous amino acid flow at the terminal ileum of the rat determined under conditions of peptide alimentation. **Journal Science Food Agriculture**, London, v. 55, n. 2, p. 175-187, 1991.

CASPARY, W. F. **Structure and function of the small intestine**. Amsterdam: Excerpta Medica, 1987. 162 p.

CASPARY, W. F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 55, n. 1, p. 299 - 308, 1992. Supplement.

CLAPPER, G. M.; GRIESHOP, C. M.; MERCHEN, N. R.; RUSSETT, J. C.; BRENT, JR. J. L.; FAHEY, JR., G. C. Ileal and total tract nutrient digestibilities and fecal characteristics of dogs as affected by soybean protein inclusion in dry, extruded diets. **Journal Animal Science, Savoy**, v. 79, n. 6, p. 1523-1532, June, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Document Alimentarius 85/30, working groups report to the third session of CCPV on methods for evaluating protein quality. Joint FAO/WHO. Rome & Geneva, 1984, p. 32-33.

DARRAGH, A. J.; SCHAAFSMA, G.; MOUGHAN, P. J. Impact of amino acid availability on the protein digestibility corrected amino acid score. **Bulletin. International Dairy Federation**, Brussels, n. 336, p. 46 - 50, 1998.

DARRAGH, A. J.; HODGKINSON, S. M. Quantifying the digestibility of dietary protein. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 7, p. 1850-1856, July, 2000. Supplement.

DOMALGALSKI, J. M.; KOLLIPARA, K. P.; BATES, A. H.; BRANDON, D. L.; FRIEDMAN, M.; HYMOWITZ, T. Nulls for the major Bowman-Birk inhibitor in the genus *Glicine*. **Crop Science**, Madison, v. 32, p. 1502-1505, 1992.

DONKOH, A.; MOUGHAN, P. J.; SMITH, W. C. Comparison of the slaughter method and simple T-piece cannulation of the terminal ileum for determining ileal amino acid digestibility in meat and meal for the growing pig. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 49, n. 1/2, p. 43-56, 1994.

ESTEVEES, S. N.; PENTEADO, M. D. V. C.; ORTOLANI, E. L. Alimentação de bezerros com extrato hidrossolúvel de soja. I. Desenvolvimento e digestibilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 96 -100, 1995.

ESTEVEES, S. N.; PENTEADO, M. D. V. C.; ORTOLANI, E. L.; SINHORINI, I. L. Alimentação de bezerros com extrato hidrossolúvel de soja.II.Produção de anticorpos e distúrbios intestinais. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 286 -289, 1996.

FAO. **Protein quality evaluation**: report of the Joint FAO/WHO/UNI Expert Consultation, Bethesda, MD, USA. Rome: United Nations, 1990. (FAO, paper 51)

- FAO/WHO/UNI. **Necesidades de energía y de proteínas**. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1985. 220 p.
- FENWICK, R. M.; KNIGHTON, D. R.; MOUGHAN, P. J. Protein quality measurement by the PDCAAS technique. **IDF Nutrition Newsletter**, Brussels, v. 4, p. 40 - 43, 1995.
- FOX, P. F. **Developments in dairy chemistry: functional milk proteins**. London: Elsevier Science, 1989. v. 4.
- FOX, P. F.; MULVIHILL, D. M. Developments in milk protein processing. **Food Science Technology Today**, v. 7, p. 152 - 161, 1992.
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Chapman & Hall, 1998. p. 210 - 227.
- FRIEDMAN, M. (Ed.). Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in foods. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York, v.199, 572 p, 1986.
- FRIEDMAN, M.; GUMBMAN, M. R. Nutritional improvement of legume proteins through disulfide interchange. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 199, p. 357-389, 1986.
- GIESE, J. Proteins as ingredients: type functions, applications. **Food Technology**, Chicago, v. 10, n. 10, p. 50-60, 1994.
- HARRIS, D. A.; BURNS, R. A. Evaluation of infant formula protein quality: comparison of in vitro methods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v. 71, n. 2, p. 353-357, 1988.
- HOOYDONK, A. C. M. Definition of the nutritional value of dietary proteins. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Protein definition**; Proceedings of 1<sup>st</sup> IDF Symposium. Minneapolis, MN, 1993. Brussels: FIL/IDF, 1994. p. 56-65.
- JHONSON, L. R. **Gastrointestinal physiology**. St. Louis: The C. V. Mosby

Company, 1985. 114 p.

JORGENSEN, H; JENSEN, B. B. The effect of dietary fiber on digestibility, microbial activity, and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 6, p. 1897-1904, 1994.

JUST, A. Ileal digestibility of protein: applied aspects. In: LOW, A. G.; PARTRIDGE, I. G. (Ed). **Current concepts of digestion and absorption in the pig**. Shinfield: National Institute for Research in Dairying, 1980. p. 66 -72.

KIM, Y. A.; BARBEAU, W. E. Evaluation of SDS-Page method for estimating protein digestibility. **Journal Food Science**, Chicago, v. 56, n. 4, p. 1082 -1086, 1991.

KNUDSEN, K. E. B.; JENSEN, B. B. Effect of source and level of dietary fibre on microbial fermentation in the large intestine of pigs. In: HUISMAN, J.; DEN HARTOG, L. A.; VERSTEGEN, M. W. A. (Ed.). **Digestive physiology in pigs**; Proceedings of the 5 th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs. Wageningen: Center for Agricultural, 1991. p. 389-394.

KNUDSEN, K. E. B.; WISKER, E.; DANIEL, M.; FELDHEIM, W.; EGGUM, B. O. Digestibility of energy, protein, fat and non-starch polysaccharides in mixed diets: comparative studies between man and the rat. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 71, n. 4, p. 471- 87, 1994.

LESS, R. **Manual de análisis de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1979. p. 124-125.

LEWIS, A. J.; BAYLEY, H. S. Amino acid bioavailability. In: AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H.; LEWIS, A. J. (Ed). **Bioavailability of nutrients for animals: amino acids, minerals, and vitamins**. San Diego: Academic Press, 1995. Chap. 2, p. 35-65.

LINDER, M. C. **Nutritional biochemistry and metabolism**. 2.ed. Connecticut: Appleton & Lange. 1991. 603 p.

- LIU, K. **Soybeans chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1999. 532 p.
- LOW, A. G.; ZEBROWSKA, T. Digestion in pigs. In: BOCK, H. D.; EGGUN, B.O.; LOW, A. G.; SIMON, O.; ZEBROWSKA, T. **Protein metabolism in farm animals**. Oxford: Oxford Univ Press, 1989. p. 53 -121.
- MARCHINI, J. S.; CORTIELLA, J.; HIRAMATSU, T.; CHAPMAN, T. E.; YOUNG, V. R. Requirements for indispensable amino acids in adult humans: longer-term amino acid kinetic study with support for the adequacy of the Massachusetts Institute of Technology amino acid requirement pattern. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, v. 58, n. 5, p. 670-683, 1993.
- MCDONOUGH, F. E.; STEINKE, F. H.; SARWAR, G.; EGGUM, B. O.; BRESSANI, R.; HUTH, P. J.; BARBEAU, W.E.; MITCHELL, G. V.; PHILLIPS, J. G. – In vivo rat assay for true digestibility: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, New Orleans, v. 73, n. 5, p. 801-5, Sept.-Oct., 1990.
- METGES, C. C. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 7, p. 1857-1864, 2000. Supplement.
- MILLER, D. S.; BENDER, A. E. The determination of the net utilization of protein by a shortened method. **British Journal of Nutrition**, Edinburgh, v. 9, n. 8, p. 382-389, Sept., 1955.
- MILLWARD, D. J.; PACY, P. J. Postprandial protein utilization and protein quality assessment in man. **Clinical Science**, London, v. 88, n. 6, p. 597-606, Jun., 1995.
- MILLWARD, D. J. The nutritional value of plant-based diets in relation to amino acid and protein requirements. **Proceedings of the Nutrition Society**, Wallingford, v. 58, n. 2, p. 249-260, 1999.

MITCHELL, G. V.; JENKINS, M. Y. Assessment of protein quality methodology for infant formulas. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v. 68, n. 4, p. 680-683, 1985.

MIYAGI, Y.; SHINJO, S.; NISHIDA, R.; MIYAGI, C.; TAKAMATSU, K.; YAMAMOTO, T.; YAMAMOTO, S. Trypsins inhibitor activity in commercial soybean products in Japan. **Journal Nutrition Science Vitaminol**, Tokyo, v. 43, n. 5, p. 575-580, Oct., 1997.

MOSSÉ, J. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seeds protein contents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v. 38, n. 1, p. 18 -24, Jan.- Feb., 1990.

MOUGHAN, P. J.; DONKOH, A. Amino acid digestibility in non-ruminants: a review. In: MOUGHAN, P. J.; DONKOH, A.; FARRELL, D. J. (Ed.). **Recent advances animal nutrition**. Armidale: University of New England, 1991. p. 172-184.

MULVIHILL, D. M. Production, functional properties and utilization of milk proteins. In: FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**. London: Chapman & Hall, 1992. v. 1, p. 369 - 404.

NAVAM, H.; URUTHIRA, K. Soybean protein products. In: LIU, K. **Soybeans chemistry, technology, and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1999. p. 379 - 411.

NUTRIENT REQUIREMENTS OF LABORATORY ANIMALS.14 Ed. Washington, D. C.: National Academy Press.1995. 173 p.

PEARSON, D. **Técnicas de laboratório para el análisis de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1976. p. 62 - 68.

PELLETT, P. L. Protein requirements in humans. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, v. 51, n. 5, p. 723 - 737, May, 1990.

PELLETT, P. L.; YOUNG, V. R. (Ed.). **Nutritional evaluation of protein foods**. Tokyo: The United Nations University, 1980. 154 p.

RACKIS, J. J. Biological and physiological factors in soybeans. **Journal American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 51, n. 1, p. A161-A174, 1974.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. 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-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov., 1993.

RÉRAT, A. A. Digestion and absorption of nutrients in the pig. **World Review Nutrition and Dietetics**, Basel, v. 37, p. 229 - 87, 1981.

ROSE, W. C. The amino acid requirements of adult man. **Nutrition Abstract Review**, Wallingford, v. 27, p. 631-667, 1957.

ROWAN, A. M.; MOUGHAN, P. J.; WILSON, M.N.; MAHER, K.; TASMAN-JONES, C. Comparison of the ileal and faecal digestibility of dietary amino acids in adult humans and evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. **British Journal Nutrition**, Wallingford, v. 71, n. 1, p. 29-42, 1994.

ROTHENBUHLER, E.; KINSELLA, J. E. Disulfide reduction and molecular dissociation improves the proteolysis of soy glycinin by pancreatin *in vitro*. **Journal Food Science**, Chicago, v. 51, n. 6, p. 1479, 1986.

RUTHERFURD, S. M.; MOUGHAN, P. J. The digestible amino acid composition of several milk proteins: application of a new bioassay. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 4, p. 909 - 917, Apr., 1998.

SARWAR, G. Digestibility of protein and bioavailability of amino acids in foods: effects on protein quality assessment. **World Review of Nutrition and Dietetics**, Basel, v. 54, p. 26 - 70, 1987.

SARWAR, G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly

digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 127, n. 5, p. 758 - 764, May. 1997.

SARWAR, G.; PEACE, R. W.; BOTTING, H. G.; BRULÉ, D. Digestibility of protein and amino acid in selected foods as determined by a rat balance method. **Plant Foods Human Nutrition**, Dordrecht, v. 39, n.1, p. 23 - 32, Mar., 1989.

SARWAR, G.; CHRISTENSEN, D. A.; FINLAYSON, A. J.; FRIEDMAN, M.; HACKLER, L. R.; MACKENZIE, S. L.; PELLET, P. L.; TRACHUK, R. Inter and intra laboratory variation in amino acid analysis of food proteins. **Journal Food Science**, Chicago, v. 48, n. 2, p. 526 - 531, 1983.

SARWAR, G.; BLAIR, R.; FRIEDMAN, M.; GUMBMAN, M. R.; HACKLER, L. R.; PELLET, P. L.; SMITH, T. K. Inter and intra laboratory variability in rat growth assays for estimating protein quality of foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v. 67, n. 5, p. 976 - 981, Sept.- Oct., 1984.

SARWAR, G.; PEACE, R. W.; BOTTING, H. G. Corrected relative net protein ratio (CPNPR) method based on differences in rat and human requirements for sulfur amino acids. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v. 68, n. 4, p. 689-693, July-Aug., 1985.

SARWAR, G.; PEACE, R. W. Comparisons between true digestibility of total nitrogen and limiting amino acids in vegetable proteins fed to rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 116, n. 7, 1172-1184, 1988.

SARWAR, G.; McDONOUGH, F. E. Evaluation of protein digestibility corrected amino acid score method for assessing protein quality of foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v. 73, n. 3, p. 347 - 356, May -Jun., 1990.

SARWAR, G.; PEACE, R. W. The protein quality of some enteral products is inferior to that of casein as assessed by rat growth methods and digestibility -

- corrected amino acid scores. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 124, n. 11, p. 2223 -2232, Nov., 1994.
- SCHAAFSMA, G. The protein digestibility – corrected amino acid score. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.130, n.7, p.1865 -1867, July, 2000. Supplement.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.
- SLEISENGER, M. H.; KIM, Y. S. Protein digestion and absorption. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 300, n. 2, p. 659 - 663, Mar., 1979.
- SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 30, n. 3, p.1190 -1206, 1958.
- STEINKE, F. H. In: WILCKE, H. L.; HOPKINS, D. T.; WAGGLE, D. H. (Ed.). **Soy protein and human nutrition**. New York: Academic Press, 1979. p. 307-312.
- TAVERNER, M. R.; FARELL, D. J. Availability to pigs of amino acids in cereal grains. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 46, n.1, p. 173 -180, Feb., 1981.
- TORUN, B. Proteínas y aminoácidos, características y satisfacción de requerimientos con dietas latinoamericanas. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 38, n. 3, p. 483 - 505, Sept., 1988.
- TRAVAGLINI, D. A. Extrato de soja em pó. In: MYASAKA S.; MEDINA, J. C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 986 -998.
- VANWIJK, H. J.; MOUGHAN, P. J.; HODGKINSON, S. M.; JANSEN, P. P.; PEARSON, G. Variation in apparent and true ileal amino acid digestibility in barley using a rat model. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 76, n. 1/2, p. 9-22, Dec., 1998.

WATANABE, D. J.; EBINE, H. O.; OHDA, D. O. **Soybean foods**. Tokyo, Kohrin Shoin, 1971. 438 p.

WRONG, O. M.; EDMONDS, C. J.; CHADWICK, V. S. **The large intestine: its role in mammalian nutrition and homeostasis**. Lancaster: United Kingdom, MTP Press Ltd, 1981. 347 p.

YOUNG, V. R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 91, n. 7, p. 828 -835, Jul., 1991.

YOUNG, V. R.; SCRIMSHAW, N. S. Nutritional evaluation of protein and protein requirements. In: MILNER, N.; SCRIMSHAW, N. S.; WANG, D. I. C. **Protein resources and technology**. Westport: AVI, 1978. p.136-173.

YOUNG, V. R.; EI - KHOURY, A. E. Human amino acid requirements: a re-evaluation. **Food and Nutrition Bulletin**, Tokyo, v. 17, n. 3, p. 191-203, 1996.

YOUNG, V. R.; BORGONHA, S. Nitrogen and amino acid requirements: The Massachusetts Institute of Technology Amino Acid requirement pattern. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 7, p. 1841-1849, Jul., 2000. Supplement

OBS – Referências bibliográficas de acordo com a ABNT – NBR 6023.



## 9. ANEXOS

**ANEXO 1 - Composição centesimal aproximada da caseína, caseinato de sódio e caseinato de cálcio.**

| <b>Componentes<br/>(%)</b> | <b>Caseína<sup>1</sup><br/>(M.Cassab)</b> | <b>Caseinato de sódio<sup>1</sup><br/>(NZMP)</b> | <b>Caseinato de cálcio<sup>1</sup><br/>(NZMP)</b> |
|----------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Proteína bruta</b>      | 84.0                                      | 92.7                                             | 92.1                                              |
| <b>Carboidratos</b>        | 5.6                                       | —                                                | —                                                 |
| <b>Cinzas</b>              | 2.1                                       | 3.6                                              | 3.9                                               |
| <b>Umidade</b>             | 8.3                                       | 4.2                                              | 4.0                                               |

1 - Composição fornecida pelos fabricantes.

**ANEXO 2 - Composição centesimal aproximada do EHS e Produto de Soja.**

| <b>Componentes<br/>(%)</b> | <b>EHS<sup>1</sup><br/>(Padrão)</b> | <b>EHS<sup>2</sup><br/>(Olivebra)</b> | <b>Produto de Soja<sup>2</sup><br/>(Olivebra)</b> |
|----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Proteína bruta</b>      | ≥ 41.5                              | 44.6                                  | 25.2                                              |
| <b>Carboidratos</b>        | ≤ 34.6                              | 21.0                                  | 43.3                                              |
| <b>Lipídios totais</b>     | ≥ 13.8                              | 26.0                                  | 23.3                                              |
| <b>Fibra</b>               | NR**                                | 1.3                                   | 0.0                                               |
| <b>Cinzas</b>              | ≤ 7.0                               | 4.5                                   | 5.5                                               |
| <b>Umidade</b>             | ≥ 3.0                               | 3.5                                   | 2.5                                               |

1 - Compêndio de Normas e Padrões para Alimentos da Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação.

2 - Composição fornecida pela Olivebra Indl. S.A. \*\* NR – Não reportado.

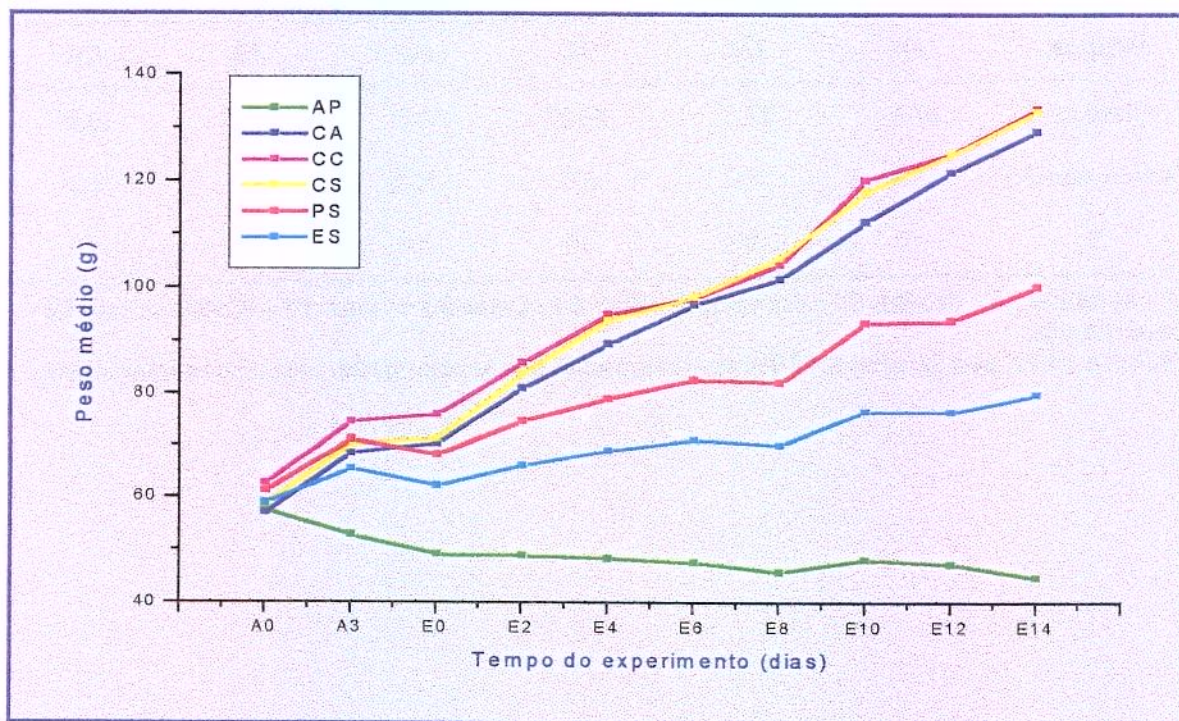
**ANEXO 3 – Média dos pesos iniciais dos animais para os seis Grupos de Ensaio.**

| Grupos        | AP                | CA                | CC                | CS                | PS                | ES                |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Peso (g)      | 57.6 <sup>a</sup> | 57.0 <sup>a</sup> | 62.6 <sup>a</sup> | 58.5 <sup>a</sup> | 61.1 <sup>a</sup> | 58.9 <sup>a</sup> |
| Desvio padrão | 5.4               | 8.0               | 8.6               | 10.2              | 6.8               | 6,8               |
| N             | 10                | 10                | 10                | 10                | 10                | 10                |

AP – Aprotéico CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.

ANOVA:  $p = 0.581$  para as linhas ( $p < 0,05$ ): as mesmas letras representam igualdade estatística entre grupos.

#### ANEXO 4 – Evolução do peso médio em ratos dos seis Grupos de Ensaio.



A – Período de adaptação (5 dias) E – Período de experimentação (14dias).

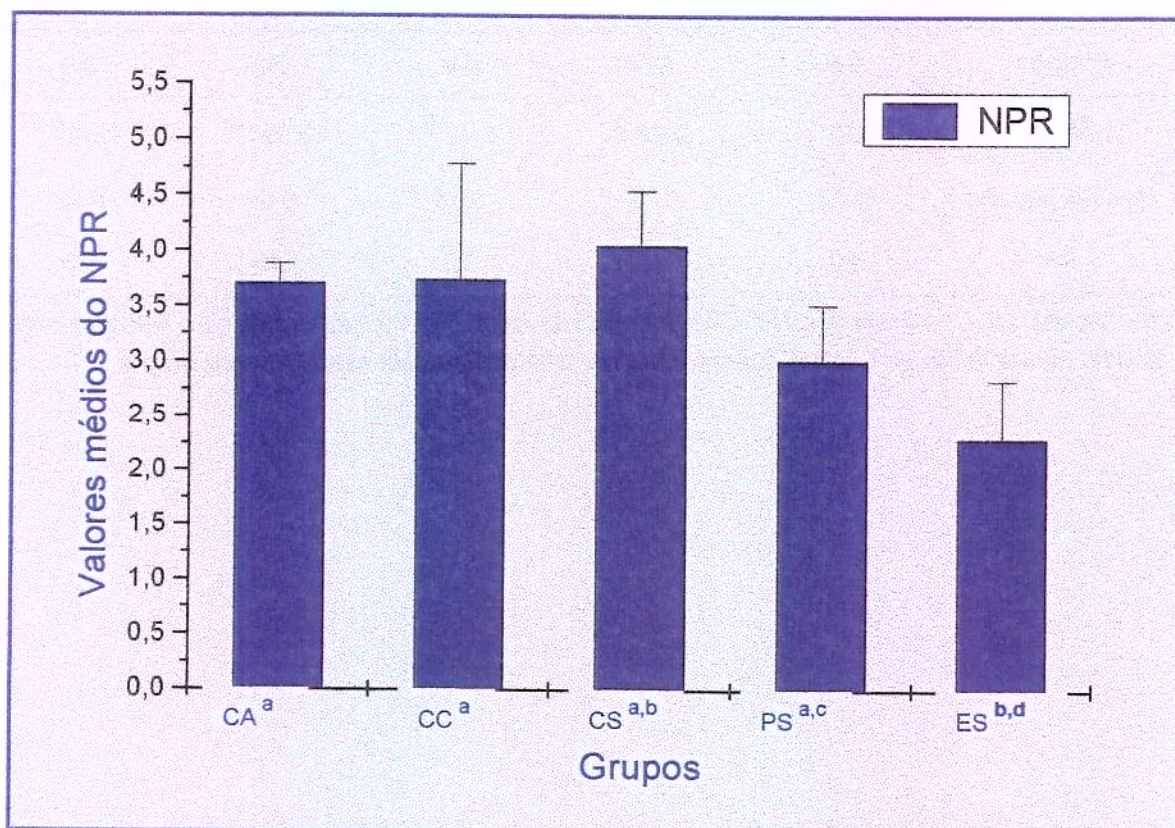
**ANEXO 5 – Valor do Cociente de Eficiência Alimentar (CEA) dos cinco Grupos de Ensaio**

| Grupos               | CA                | CC                | CS                | PS                  | ES                  |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| <b>CEA</b>           | 0.43 <sup>a</sup> | 0.48 <sup>a</sup> | 0.46 <sup>a</sup> | 0.39 <sup>a,c</sup> | 0.35 <sup>b,c</sup> |
| <b>Desvio padrão</b> | 0.02              | 0.12              | 0.04              | 0.06                | 0.05                |
| <b>N</b>             | 10                | 10                | 10                | 10                  | 10                  |

CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.

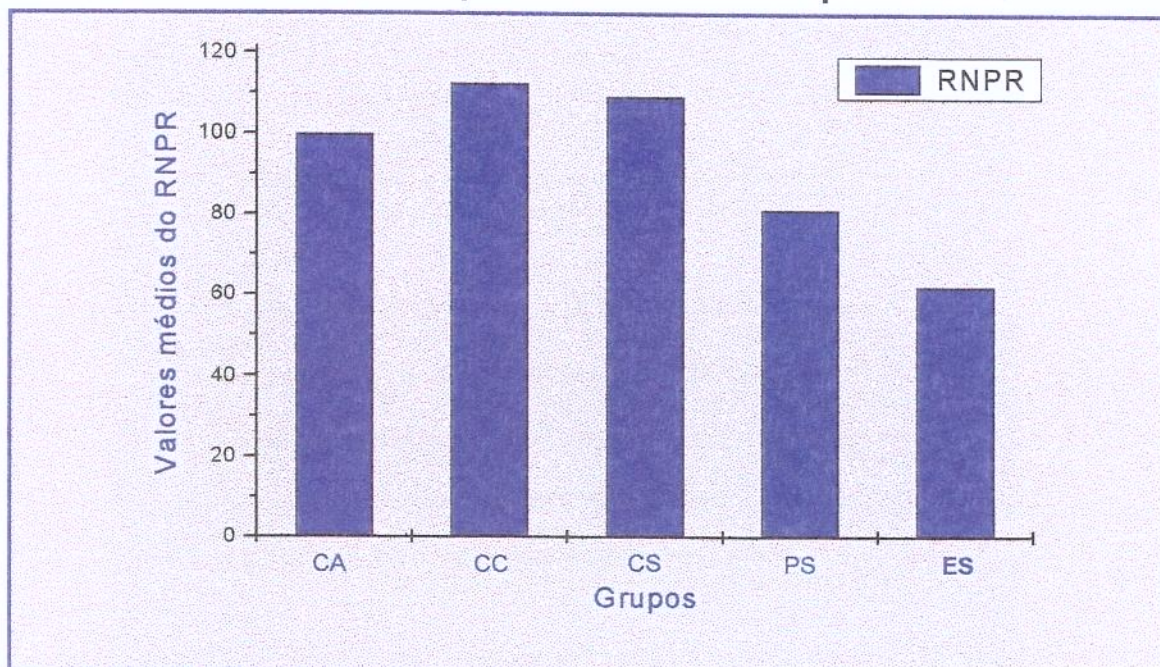
ANOVA: para as linhas ( $p < 0,05$ ): as mesmas letras representam igualdade estatística entre grupos.

## ANEXO 6 – Valores do NPR para as cinco Dietas Experimentais.



CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.  
ANOVA: para as linhas ( $p < 0,05$ ): as mesmas letras representam igualdade estatística entre grupos.

## ANEXO 7 – Valores do RNPR para as cinco Dietas Experimentais.



Valor de RNPR para os cinco Grupos de Dietas. CA – Caseína CC – Caseinato de cálcio CS – Caseinato de sódio PS – Produto de soja ES – Extrato de soja.

## ANEXO 8 – Protocolo da Comissão Ética na Experimentação Animal.

**ANEXO 7**

Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia

CEEA-IB-UNICAMP

---

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 344-2, sobre AVALIAÇÃO DA  
QUALIDADE PROTEICA DE PRODUTOS DE SOJA  
PELO PDCAAS E ANÁLISE DAS PEPTÍDEOS DA  
DIGESTÃO NO ÍLEO DE RATOS  
 sob a responsabilidade de prof. Dra. Dora de Oliveira  
TAVARES está  
 de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo  
 Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela  
 Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP) em reunião de  
07.6.2002. Este certificado expira em 07.6.2003.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº \_\_\_\_\_, entitled "\_\_\_\_\_"

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the  
 Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by  
 the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of  
 Campinas - UNICAMP) on \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_. This certificate expires on \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Campinas, 07 de Junho de 2002

Albentino

Prof. Dra. Alba R. M. Souza Brito  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
RUA UNIVERSITÁRIA, DETERNO VAZ  
13081-970, CAMPINAS - SP - BRASIL

Armando Ferreira Lima

Prof. Dr. Armando Ferreira Lima  
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP

TELEPHONE: 31 3709116  
FAX: 31 37299124