

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E
NUTRIÇÃO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL E AVALIAÇÃO
NUTRICIONAL DE UMA MISTURA DE AMINOÁCIDOS
SINTÉTICOS

Norka Beatriz Barrueto González

Nutricionista

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan

Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Norka Beatriz Barrueto González, aprovada pela Comissão Julgadora em 02 de fevereiro de 2000.

Campinas, 02 de fevereiro de 2000.

CAMPINAS – SP

2000


Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán
Presidente da Banca

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Norka Beatriz Barrueto González

Nutricionista

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL E AVALIAÇÃO
NUTRICIONAL DE UMA MISTURA DE AMINOÁCIDOS
SINTÉTICOS**

*Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Nutrição*

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan

Orientador

CAMPINAS – SP

2000

200003664

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan
Universidade Estadual de Campinas
Orientador



Prof.ª Dr.ª Flávia Maria Netto
Universidade Estadual de Campinas
Membro



Prof.ª Dr.ª Carla Roberta de Oliveira Carvalho
Universidade de São Paulo
Membro

Prof. Dr. Carlos Grosso
Universidade Estadual de Campinas
Membro

*Cada um que passa em nossa vida passa sozinho...
Porque cada pessoa é única para nós,
e nenhuma substitui a outra.
Cada um que passa em nossa vida passa sozinho,
mas não vai só...
Levam um pouco de nós mesmos
e nos deixam um pouco de si mesmos.
Há os que levam muito,
mas não há os que não levam nada.
Há os que deixam muito,
mas não há os que não deixam nada.
Esta é a mais bela realidade da vida...
A prova tremenda de que cada um é importante
e que ninguém se aproxima do outro por acaso...*

Saint Exupery

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán, pela amizade, confiança e orientação dedicada e eficiente para a realização deste trabalho;

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), especialmente ao Departamento de Nutrição e Planejamento Alimentar (DEPAN) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), pela oportunidade concedida para a realização do curso;

Ao Sr. José I. Espinosa Guerra do Laboratório Bioquímicos Espanhóis pelo fornecimento da matéria-prima;

A Prof^a Dr^a Débora Queiroz Tavares e Yara F. Honório, pela colaboração técnica eficiente e atenciosa dispensada no decorrer deste trabalho;

Aos funcionários e amigos do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, especialmente para Carla de Marco Gregghi e Iná Aparecida C. dos Santos, pelo apoio nas atividades no Laboratório de Fontes Protéicas, Eliete de Carvalho Leite e Esmeralda de Faria Melo, pela colaboração no trabalho realizado no Biotério, Francisco Carraro, pelo auxílio nas atividades realizadas no Laboratório Central, e Soeli Maria P. M. Reis pelas inúmeras análises de aminoácidos realizadas. A todos pela amizade e atenção dedicadas;

Ao Instituto de Química da UNICAMP na pessoa de Helder Pantarotto e sua equipe, pelas análises elementar e infravermelho realizadas;

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Antônio Gonçalves, Cláudia Romano, Marli I. Medeiros, Creuza K. Nomura, Geraldo A Silva e José Marcondes, pelo atendimento rápido e atencioso;

Às amigas inesquecíveis e companheiras de jornada, "Farfanettes" de ontem, hoje e sempre: Suzana, Luciana, Derlange, Lucia, Érika, Vera e Florencia pela amizade, alegria, compreensão e apoio constante que tornaram cada momento deste trabalho um verdadeiro prazer;

À todos os amigos e companheiros de curso do DEPAN e da FEA cuja amizade e cumplicidade foram fundamentais para a motivação do meu trabalho.

À Angélica e Daniela Torres, Luiza Kinoshita, Carla Roberta, Ana Fabiola e família Barbosa pela amizade e apoio carinhoso;

À Banca Examinadora, por terem doado seu tempo e conhecimentos para a correção deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão de bolsa durante o curso de mestrado.

SUMÁRIO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Resumo	1
Abstract	4
1. Introdução	7
2. Objetivos	15
<i>Geral</i>	16
<i>Específicos</i>	16
3. Artigo	17
Abstract	18
Introdução	19
Material e Métodos	22
<i>pH</i>	22
<i>Umidade</i>	22
<i>Identificação de frações não aminoacídicas no produto sintético MAB (partição em batch)</i>	22
<i>Análise elementar (CHN)</i>	23
<i>Identificação de grupos funcionais no espectro de infravermelho</i>	23
<i>Quantificação de uréia</i>	23
<i>Nitrogênio e proteína</i>	23
<i>Perfil de aminoácidos</i>	24
<i>Calorimetria</i>	24
<i>Avaliação nutricional "in vivo"</i>	24
<i>Animais e dietas</i>	24
<i>Balanço de nitrogênio, digestibilidade e valor</i>	

<i>biológico aparente, utilização líquida da proteína e energia absorvida.....</i>	26
<i>Quociente de eficiência protéica, quociente de eficiência líquida da proteína e quociente de eficiência alimentar.....</i>	30
<i>Análises bioquímicas.....</i>	30
<i>Análises histológicas.....</i>	31
<i>Análises estatísticas.....</i>	31
Resultados e Discussão.....	32
<i>Características químicas e físicas do produto sintético MAB.....</i>	32
<i>Solubilização de compostos (partição em batch).....</i>	32
<i>Identificação de grupos funcionais.....</i>	36
<i>Quantificação de uréia.....</i>	37
<i>Perfil de aminoácidos do MAB.....</i>	39
<i>Composição de aminoácidos das dietas.....</i>	43
<i>Avaliação nutricional “in vivo” da qualidade protéica do MAB pelos métodos baseados na retenção de nitrogênio e mudança de peso corporal.....</i>	48
<i>Consumo de dieta, proteína e ganho de peso.....</i>	48
<i>Energia absorvida.....</i>	50
<i>Balanço de nitrogênio.....</i>	52
<i>Digestibilidade aparente, valor biológico aparente e utilização líquida da proteína.....</i>	56
<i>Curva de crescimento.....</i>	59
<i>Ganho de peso, consumo de dieta e quociente de</i>	

<i>eficiência alimentar.....</i>	61
<i>Quociente de eficiência líquida da proteína e quociente de eficiência protéica.....</i>	64
<i>Influência do uso parcial da mistura protéica MAB/caseína nas análises sorológicas bioquímicas de ratos Wistars</i>	66
<i>Albumina sérica.....</i>	67
<i>Proteínas totais.....</i>	67
<i>Fosfatase alcalina.....</i>	69
<i>Influência do uso parcial da mistura protéica MAB/caseína no tamanho das vilosidades intestinais de ratos Wistars</i>	70
Conclusão.....	73
Sugestões de Pesquisa.....	75
Referências Bibliográficas.....	76

Resumo

Misturas complexas de aminoácidos e outros compostos nitrogenados, obtidos por síntese inespecífica, oriundas das sínteses prebióticas, estão sendo atualmente produzidas em pequena escala industrial no Brasil para uso na agricultura. Embora quimicamente não bem caracterizado, foi demonstrado que tais produtos, na sua forma bruta, são razoavelmente utilizados por microrganismos e plantas, aparentemente por possuírem aminoácidos de fácil absorção. O presente trabalho objetivou estudar algumas das características químicas composicionais de uma mistura aminoacídica bruta (MAB), contendo aminoácidos livres e condensados, assim como também avaliar o seu possível valor nutricional como substituto parcial da proteína em dietas padrão para o rato. Os resultados obtidos das análises químicas do produto indicaram um teor elevado de nitrogênio, 13,7%, o qual não refletiu necessariamente um teor equivalente de “proteína”, já que grande parte do nitrogênio correspondeu a uréia (219 mg/g). Mesmo assim, a mistura de aminoácidos liberada pela hidrólise do produto mostrou um perfil incomum, sendo rica em tirosina, treonina, fenilalanina e ácido aspártico (15,2, 14,4, 13,3 e 20,2% da composição interna, respectivamente). A partir da estimativa do “valor protéico do produto” e da caseína comercial, elaboraram-se seis dietas experimentais que utilizaram como fonte de proteína a combinação MAB-caseína (MAB/CAS) em diferentes proporções do primeiro (MAB 1, 5, 10, 30 e 50% do nitrogênio total), duas dietas controle e uma aprotéica, seguindo as recomendações da AIN-93G. As dietas foram ministradas aos animais para obtenção dos índices nutricionais de balanço nitrogenado (BN) e quociente de eficiência protéica (PER). Os Aminogramas destas formulações mostraram que o uso da mistura MAB/CAS alterou significativamente o perfil de aminoácidos das dietas quando comparadas com o perfil da formulação controle e do requerimento nutricional para o rato

Wistar. A presença do MAB nas formulações proporcionou também quantidades significativas de nitrogênio não protéico na forma de uréia. Durante todo o período do ensaio biológico, a inclinação da curva de crescimento dos grupos experimentais diminuiu em proporção à quantidade de MAB recebida, porém sem ser observado balanço negativo em qualquer momento. Este achado demonstrou que substituição parcial da caseína pela mistura aminoacídica não desencadeou qualquer processo catabólico nos animais. Todas as formulações experimentais apresentaram valores de “digestibilidade aparente” (Da) acima de 96%, ou seja, condizentes com a digestibilidade da caseína pura. As dietas com até 5% do produto sintético proporcionaram resultados aceitáveis de “valor biológico aparente” (VBa), “utilização líquida da proteína” (NPU) e “quociente de eficiência líquida da proteína” (NPR). Para as formulações MAB 10, MAB 30 e MAB 50, estes índices nutricionais apresentaram queda percentual aproximada de 15 a 26%, com relação aos controles. Com exceção do MAB 50, os resultados de PER para todos os grupos experimentais foram, no mínimo, semelhantes aos controles. Não foram observadas alterações nos níveis séricos de albumina, fosfatase alcalina e proteínas séricas totais após trinta dias de ensaio biológico, bem como alterações morfológicas no tecido jejuno-íleo do intestino delgado dos animais que receberam os níveis mais elevados de MAB. Pode ser concluído que o uso do produto sintético MAB como fonte protéica parcial das formulações promoveu crescimento e manutenção de peso satisfatórios em substituição de até 30% do nitrogênio da ração.

Palavras-chave: *aminoácidos sintéticos, nitrogênio não específico, segurança alimentar, índice nutricional.*

Abstract

Complex amino acid mixtures obtained through unspecific syntheses reminiscent of those of prebiotic earth are being produced in Brazil at the small industrial scale as agricultural fertilizers. Although not yet chemically characterized, one such product has been shown to be reasonably well utilized by plants and microorganisms in the raw state, apparently due to the presence of bioavailable amino acids. The present work was therefore aimed at investigating some compositional characteristics of a raw mixture of both free and condensed amino acids, henceforth designated as MAB ("Mistura Aminoacídica Bruta"). Chemical analyses revealed a high (13.7%) nitrogen content for the product, which corresponded to a high urea (219 mg/g) and a modest amino-acid content. The amino acid fraction released upon acid hydrolysis showed an unusual profile, with predominance of tyrosine, threonine, phenylalanine, and aspartic acid (15.2, 14.4, 13.3 e 20.2% of the internal composition, respectively). From an estimated "protein value" of the product and that of the commercial casein, six experimental diets were formulated which contained MAB in combinations with casein (MAB/CAS), accounting for 1, 5, 10, 30 and 50% of the total nitrogen, but otherwise following the recommendations of the AIN-93G. Two additional control and one protein-free diets were also prepared. The nitrogen balances (NB) and protein efficiency ratios (PER) were determined as nutritional indices of the biological quality of the mixtures. Amino acid analysis of the diets showed that introduction of the MAB significantly altered the profiles of the MAB/CAS mixtures, both in relation to the controls (100% casein) and the requirements of the Wistar rat. It was also ascertained that the MAB contributed significant amounts of non-specific nitrogen, particularly in the form of urea. During the nitrogen balance assay, the slopes of the growth

curves for each experimental group diminished proportionately to the amount of added MAB, but in no case were the animals seen to enter negative balance. This finding demonstrated that partial replacement of casein by the MAB did not induce any catabolic process in the animals. The apparent Digestibilities of the experimental protein mixtures, in turn, were not visibly affected by the presence of the MAB (Da = 96% or higher). The two diets containing up to 5% MAB exhibited apparent Biological Values (BVa), Net Protein Utilization (NPU) and Net Protein Ratios (NPR) which were considered acceptable. For the diets MAB10, 30 and 50 these indices were approximately 15 to 26% lower than in the controls, whereas the PER's were equal or better than those of the controls, with the exception of MAB50. At the end of the 30-day biological assays, no abnormalities were observed with respect to the serum biochemical parameters of albumin, total proteins or alkaline phosphatase. Neither were any morphological alterations found in histological preparations of the jejunal-illial region of the small intestine in the animals receiving the higher MAB formulations. It could be concluded that substitution of up to 30% of the diet's nitrogen by the MAB resulted in normal or near normal values for growth and body weight maintenance, while not causing any apparent toxic effects to the rat.

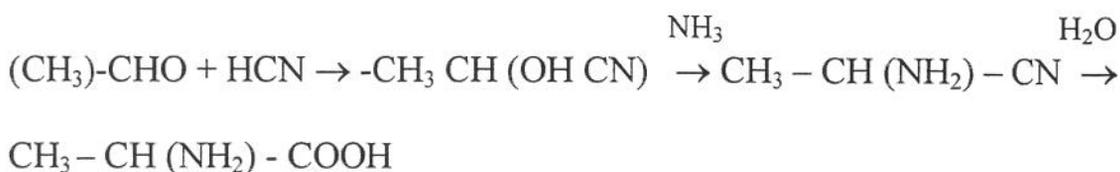
Key-words: *synthetic amino acids, nutritional index, non-specific nitrogen, protein extender, food security.*

1. Introdução

Misturas de aminoácidos livres e condensados podem ser obtidos através de síntese química inespecífica e utilizados no campo da nutrição como fonte alternativa de proteína, desde que apresentem um aporte completo de aminoácidos essenciais e sejam oferecidos em quantidades adequadas com o requerimento nutricional de cada espécie animal.

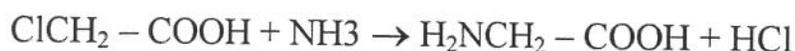
Quimicamente, aminoácidos são todos os compostos que contêm em uma mesma molécula a função amino, NH_2 , e a função ácido, a carboxila, COOH . Apresentam baixo peso molecular e possuem função iônica dupla e oposta, dentre outras características (AMAYA-FARFAN, 1994). Pelo fato de serem constituintes das proteínas e portanto, de toda a matéria viva, é que o seu estudo se reveste de tanta importância desde metade do século XIX, quando se iniciaram as primeiras tentativas de obtenção destas substâncias através de métodos químicos (FIESER & FREDERICK, 1961).

Um dos mais antigos métodos de sínteses de α -aminoácidos conhecidos é a *síntese de Strecker*, devida ao químico alemão Adolf Strecker que em 1850 obteve estas substâncias através da aminação das cianidrinas:



Através desta síntese foi possível preparar Gly, Ala, Ser, Val, Met, Glu, Leu e Phe, mas não serve para os demais aminoácidos, pois possuem estruturas que surgem por outros mecanismos.

Outro método antigo e simples realizado pelo químico inglês Sir William Henry Perkin em 1858, foi o da adição de amônia em excesso a α -haloácidos:



Existem vários outros métodos antigos e mais recentes de obtenção de aminoácidos para as mais variadas aplicações. Porém a importância do estudo destas substâncias no campo nutricional, começou somente a partir do aprimoramento de técnicas laboratoriais de análise da fração nitrogenada de vários compostos orgânicos, a partir das primeiras décadas do século XX, sendo possível quantificar precisamente o teor de nitrogênio contido nos alimentos e conseqüentemente determinar o valor nutricional das proteínas (ROSENFELD, 1982).

Posteriormente, quando ROSE & WIXON (1955) classificaram os aminoácidos encontrados nos alimentos em essenciais e não-essenciais ao organismo humano por meio de estudos de balanço nitrogenado, houve uma preocupação com relação à incapacidade das dietas a base de cereais em fornecer uma concentração adequada dos aminoácidos essenciais. Já que entre os cereais mais consumidos em todo o mundo estão o arroz, trigo e o milho, os quais apresentam um ou mais aminoácidos essenciais em concentração menor do que o recomendado por um perfil aminoacídico de referência, faz-se necessário o seu suprimento por fontes suplementares (PYKE, 1970).

Com essa finalidade, SGARBIERI (1987) cita três abordagens para melhorar a qualidade protéica dos alimentos:

- Modificação da composição dos aminoácidos das proteínas dos alimentos através de manipulações genéticas;
- Combinação na dieta de dois ou mais alimentos que sejam complementares com respeito ao balanço de aminoácidos; e
- Adição de aminoácidos limitantes, até se obter uma concentração de equilíbrio no alimento: fortificação ou enriquecimento.

Com relação a esse último item, vários aminoácidos vêm sendo obtidos através de sínteses químicas específicas e comercializados sob proteção de patentes industriais desde 1950, visando o balanceamento de rações animais.

Um dos primeiros aminoácidos a serem sintetizados com tal finalidade foi a lisina, utilizando diidropirano e caprolactano. O segundo foi a metionina, através da combinação de acroleína com metil mercaptan o qual produzia um composto intermediário, que resultava em aminonitrila ou hidantoína. Este último era posteriormente convertido em metionina. A síntese de treonina foi obtida através da reação de glicinato de cobre com acetaldeído. O triptofano foi um dos últimos aminoácidos a serem produzidos por síntese química, devido ao alto custo de obtenção do grupo indólico. Uma síntese alternativa utilizada foi a via fenilidrazina, acroleína e dietilacetaminomalato (PYKE, 1970).

Embora estes métodos possibilitassem a obtenção de aminoácidos em escala comercial, o resultado final deste tipo de síntese sempre apresenta formas quirais (D, L) dos aminoácidos, as quais geralmente precisam ser separadas. Sabe-se, entretanto que no caso da metionina, as duas formas quirais podem ser bem utilizadas pelo organismo. Assim, com o desenvolvimento de técnicas de separação, obteve-se, por exemplo, L-lisina e L-treonina, com respectivamente 95 e 75% de pureza (PYKE, 1970).

Na década de 60, com o intuito de estudar a origem dos compostos orgânicos prebióticos (que apareceram sobre a terra antes da existência de qualquer ser vivo), e que serviriam para viabilizar e alimentar as primeiras formas de vida, HARADA & FOX (1964) obtiveram vários aminoácidos livres e condensados, sintetizados a partir de gases simples, como metano e amônia, presentes na atmosfera terrestre primitiva. Nesse processo foram usadas diferentes fontes de energia como: descargas elétricas, luz ultravioleta, raios-X, radiação nuclear e calor na presença de quartzo, sílica, alumina e areia vulcânica. Com exceção de cistina, metionina, histidina e triptofano, todos os aminoácidos comuns encontrados em proteínas foram produzidos simultaneamente na reação térmica sob géis de sílica.

Com o sucesso deste experimento, FOX (1964) demonstrou posteriormente que misturas apropriadas de aminoácidos expostos por 3 a 4 h a uma temperatura de 170° C, poderiam ligar-se um aos outros formando polímeros semelhantes a muitas proteínas. O que o levou a concluir que era possível sintetizar alimentos protéicos a partir de matérias-primas básicas como metano, amônia e compostos sulfurados simples, sem a necessidade de

sínteses específicas e complexas dos aminoácidos, para depois construir, peça a peça, a estrutura molecular dos polímeros protéicos.

Apesar dos esforços em se obter estes compostos para enriquecimento de ração animal e dietas humanas, o uso como alimentos sintéticos propriamente ditos não era significativo, devido às dificuldades de obtenção que envolviam técnicas laboratoriais complexas e caras, tornando necessário o desenvolvimento de métodos mais eficientes e acessíveis. Assim, por aquela mesma época, surgiram técnicas de sínteses biológicas específicas, que eram relativamente mais simples e menos dispendiosas, as quais comprovaram ser eficientes na obtenção de aminoácidos com possível utilidade em nutrição animal (PYKE, 1970; DESCHEPPER & GROOTE, 1995).

O uso de misturas nitrogenadas sintéticas como complementos protéicos de dietas de baixo teor de proteínas, têm mostrados bons resultados em estudos com aves, pela performance de crescimento obtida e baixos teores de nitrogênio excretado. Porém foi observado um aumento do conteúdo de gordura nas carcaças das aves, o que sugeriu que estas dietas alteraram o metabolismo pelo uso de tais formulações (DESCHEPPER & GROOTE, 1995).

Existem muitos trabalhos que avaliam os efeitos do uso de aminoácidos sintéticos nas mais diversas áreas da nutrição. Porém, independente da fonte precursora destas substâncias, muitos autores são unânimes em afirmar que o sucesso da assimilação destes, pelo organismo animal, dependerá do “pool” adequado em aminoácidos essenciais e não-

essenciais, presentes na dieta ou da finalidade específica à qual se destina o uso das substâncias. É o caso de dietas enterais e parenterais na prática clínica, onde por motivos fisiológicos o indivíduo não pode sintetizar um ou outro aminoácido, havendo a necessidade da suplementação para garantir a eficácia do tratamento.

Atualmente estão sendo produzidas no Brasil, em escala piloto, misturas aminoacídicas brutas (MAB) por síntese química inespecífica, através de processo de baixo custo, ainda mantido sob sigilo. Independente do processo de obtenção, estudos realizados mostraram que as mesmas são altamente solúveis em água e facilmente utilizadas por plantas na adubação foliar de vários tipos de lavouras e também para uso como estimulador de crescimento de microrganismos com objetivos biotecnológicos (GUERRA & AMAYA-FARFAN, 1995).

A priori, a intenção de desenvolver aminoácidos utilizando este tipo de síntese é proporcionar uma fonte protéica alternativa. É evidente que, as sínteses biológicas, convencionais ou não, serão sempre a forma mais econômica e de difícil substituição, de produzir proteínas e aminoácidos palatáveis e saudáveis para a alimentação humana e animal.

Devido ao fato de se tratar de uma mistura aminoacídica não estudada, e da inexistência de literatura sobre o particular, a extensão da presente revisão será visivelmente limitada. Dessa forma, o interesse do presente trabalho foi investigar se estas substâncias, quando utilizadas na sua forma bruta em dietas para o rato, teriam algum valor, ao menos como substitutos parciais da proteína alimentar (caseína). Para tanto, propõe-se que

estas substâncias sejam caracterizadas quimicamente e avaliadas nutricionalmente, explorando-se também a possibilidade de que a sua ingestão traria efeitos fisiológicos adversos ao tecido do intestino delgado do rato.

Considerando ainda se tratar da primeira oportunidade, de que se tenha notícia, em que um produto desta natureza tenha sido sintetizado em quantidades apreciáveis e se possa levar avante a tentativa pioneira de avaliá-lo química e biologicamente, tais objetivos possuem uma óbvia conotação adicional dentro do contexto de seguridade alimentar para o século XXI.

2. Objetivos

Geral

Caracterizar os componentes químicos básicos da mistura de aminoácidos livres e condensados sintéticos MAB e avaliar seu valor nutricional “*in vivo*” utilizando-a como substituta parcial da caseína nas dietas experimentais.

ESPECÍFICOS

- ⇒ Caracterizar quimicamente a fração nitrogenada do produto MAB, utilizando técnicas de fracionamento e análises cromatográficas;
- ⇒ Quantificar a composição elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN);
- ⇒ Determinar o valor calórico, a umidade e o pH;
- ⇒ Avaliar através de parâmetros nutricionais a retenção de nitrogênio e a eficiência das formulações contendo MAB/CAS para promover o crescimento dos ratos utilizando os seguintes índices: balanço de nitrogênio (BN), digestibilidade aparente (Da), valor biológico aparente (VBa), utilização líquida da proteína (NPU), quociente de eficiência líquida da proteína (NPR) e quociente de eficiência protéica (PER).
- ⇒ Realizar as seguintes análises bioquímicas sorológicas : albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina;
- ⇒ Verificar a integridade tissular do intestino delgado (jejuno/íleo) por microscopia óptica.

3. Artigo

*Caracterização química parcial e avaliação nutricional de uma
mistura aminoacídica sintética*

Partial chemical characterization and nutritional evaluation of a synthetic
amino acid mixture

Barrueto-González, N. B. & Amaya-Farfan, J.

Abstract

Complex amino acid mixtures obtained through unspecific syntheses reminiscent of those of prebiotic earth are being produced in Brazil at the small industrial scale as agricultural fertilizers. The present work was therefore aimed at investigating some compositional characteristics of a raw mixture of both free and condensed amino acids, henceforth designated as MAB ("Mistura Aminoacídica Bruta"). Chemical analyses revealed a high nitrogen content for the product, which corresponded to a high urea and a modest amino-acid content. The amino acid fraction released upon acid hydrolysis showed an unusual profile, with predominance of tyrosine, threonine, phenylalanine, and aspartic acid. From an estimated "protein value" of the product and that of the commercial casein, six experimental diets were formulated which contained MAB in combinations with casein (MAB/CAS), accounting for 1, 3, 5, 10, 30 and 50% of the total nitrogen, but otherwise following the recommendations of the AIN-93G. Two additional control and one protein-free diets were also prepared. The nitrogen balances (NB) and protein efficiency ratios (PER) were determined as nutritional indices of the biological quality of the mixtures. During the nitrogen balance assay, the slopes of the growth curves for each experimental group diminished proportionately to the amount of added MAB, but in no case were the animals seen to enter negative balance. The apparent Digestibilities of the experimental protein mixtures, in turn, were not visibly affected by the presence of the MAB. The two diets containing up to 5% MAB exhibited apparent Biological Values (BVa), Net Protein Utilization (NPU) and Net Protein Ratios (NPR) which were considered acceptable. For the diets MAB 10, 30 and 50 these indices were approximately 15 to 26% lower than in the controls, whereas the PER's were equal or better than those of the controls, with the

exception of MAB 50. At the end of the 30-day biological assays, no abnormalities were observed with respect to the serum biochemical parameters of albumin, total proteins or alkaline phosphatase. Neither were any morphological alterations found in histological preparations of the jejunal-illial region of the small intestine in the animals receiving the higher MAB formulations. It could be concluded that substitution of up to 30% of the diet's nitrogen by the MAB resulted in normal or near normal values for growth and body weight maintenance, while not causing any apparent toxic effects to the rat.

Key-words: synthetic amino acids, nutritional index, non-specific nitrogen, protein extender, food security.

Introdução

Com o intuito de aumentar a disponibilidade de fontes protéicas alternativas, seguras e de baixo custo à alimentação humana e animal, perante a escassez dos recursos naturais, várias pesquisas têm sido desenvolvidas à procura de metodologias e processamentos adequados para alcançar esta finalidade.

Alguns desses esforços se concentraram no estudo de compostos protéicos a partir de fontes pouco convencionais como leveduras de cervejaria (CABALLERO, 1997) e proteínas isoladas de sangue bovino (DUARTE, 1997) como forma de utilização racional dos resíduos de produção industrial, que após processamento adequado poderiam ser convertidos em alimentos e empregados tanto em nutrição humana como animal.

Dentro deste contexto citamos também a obtenção de substâncias nitrogenadas através de síntese de aminoácidos e peptídios, a

partir de precursores biológicos (PIKE, 1970) e também químicos (HARADA & FOX, 1964; LEE, D.H *et al.*, 1996). Tais compostos são comercializados sob proteção de patentes industriais desde 1950 com o objetivo de suplementar dietas, a custos mais baixos do que poderia ser obtido de itens de alimentação tradicional, de populações humanas cuja principal ou quase que exclusivamente fonte de proteína fosse de cereais (BENDER *et al.*, 1968; PIKE, 1970).

Embora a síntese destes compostos não esteja restrita ao campo da nutrição humana, estudos demonstraram sua eficiência também no enriquecimento de ração animal como também de fertilizantes agrícolas.

DESCHEPPER, *et al.* (1995) demonstraram que a suplementação com aminoácidos sintéticos essenciais e não essenciais, nas quantidades adequadas ao requerimento nutricional, em rações para aves (*broiler chickens*), com baixo teor protéico, foi eficiente no crescimento e na redução da excreção de nitrogênio quando comparadas com a dieta controle comercial oferecida.

Estudos realizados por ITOH & CHIBATA (1973) em ratos submetidos a dietas formuladas a partir de uma mistura aminoacídica semelhante à caseína, também mostraram eficiência nutricional equivalente à dieta controle.

Embora não sejam referidos em ambos trabalhos a fonte de aminoácidos utilizados nos experimentos, nem mesmo o tipo de obtenção

destes nutrientes sintéticos, percebe-se que a eficácia nutricional estará intrinsecamente relacionada com as quantidades adequadas de aminoácidos nas dietas oferecidas aos animais de acordo com o requerimento específico de cada espécie.

GUERRA & AMAYA-FARFAN (1995) mostraram que o uso da mistura de aminoácidos sintéticos (MAB) foi eficiente como fertilizante na adubação foliar de vários tipos de lavouras, proporcionando também baixo impacto contaminante ao meio ambiente. Os mesmos autores também citam que este produto pode ser empregado como estimulador de crescimento de microrganismos com objetivos biotecnológicos. Por se tratar de uma substância relativamente nova, pouco se conhece sobre sua composição química e possível valor nutricional em dietas para animais.

Com esta finalidade, o presente trabalho teve como proposta o estudo das características químicas básicas do produto MAB, tais como: pH, valor calórico, umidade, composição elementar e aminoacídica. Também foi estudado seu valor nutricional através dos índices de balanço nitrogenado (BN), quociente de eficiência líquida da proteína (NPR), digestibilidade aparente (Da), valor biológico aparente (VBa), utilização líquida da proteína (NPU) e quociente de eficiência protéica (PER). Realizaram-se também análises bioquímicas sorológicas como albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina e análises de integridade tissular do intestino delgado dos ratos Wistars de 51 dias de idade que receberam as dietas elaboradas utilizando como fonte protéica o MAB e a caseína em diferentes proporções.

Material

Mistura aminoacídica bruta (MAB). A mistura de aminoácidos livres e policondensados é um produto sintético (MAB), produzido sob a designação de “AVE-1” e fornecido pelos Laboratórios Bioquímicos Españoles, Itapeccerica da Serra, SP, por processo industrial de propriedade reservada. Trata-se de produto baseado em reagentes todos de natureza inorgânica. Da reação química, é sintetizada uma gama de aminoácidos e outras substâncias aminadas, solúveis em água, cuja composição está apenas sendo conhecida agora.

Métodos

pH. O pH do produto MAB foi determinado com o uso de pHmetro Microprocessor pHmeter Hanna Instruments HI 9321.

Umidade. Determinada em balança para umidade por infravermelho ADN, modelo AD 4714 A, utilizando 5 g do produto MAB a 90 °C por 60 minutos.

Identificação de frações nitrogenadas não aminoacídicas no produto MAB (partição em batch). Alíquotas em triplicatas da solução de trabalho (ST) preparada com 2ml do produto MAB em 18ml de água destilada, foram misturadas e homogeneizadas em solventes orgânicos de polaridade variável (acetona, hexano, éter etílico e etanol) nas seguintes proporções: 1:99, 10:90 e 50:50 (v/v). Após descanso, separou-se com o

auxílio de uma pipeta Pasteur a fase sobrenadante de cada solução para serem em seguida filtradas. Entre 200 a 600 nm fez-se a leitura de absorbância no espectrofotômetro modelo Beckman DU-70, utilizando como branco a cada leitura o respectivo solvente empregado.

Análise elementar (C, H e N). A quantificação de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes no produto MAB (líquido e cristais) foi realizado em analisador elementar Perkin-Elmer 2400.

Identificação de grupos funcionais no espectro de infravermelho. A identificação dos possíveis grupos funcionais presentes no produto MAB (líquido e cristais) foi realizado no analisador infravermelho Bomem MB series Hartmann & Braum – Michelson na região de 400 a 4.000 cm^{-1} .

Quantificação de uréia. Utilizou-se um kit de análise laboratorial (Labtest Uréia CE) para quantificar a uréia presente no produto MAB por reação enzimática colorimétrica, na faixa de absorbância 580 a 610 nm no espectrofotômetro modelo Beckman DU-70.

Nitrogênio e proteína. Realizou-se a quantificação do nitrogênio total nas amostras em triplicata do produto “MAB”, da caseína, das dietas experimentais, das fezes e urinas dos ratos pelo método semi-micro de Kjeldahl (A.O.A.C. 1984), utilizando dióxido de titânio como catalisador (WILLIAMS, 1973). Para determinar o respectivo equivalente protéico do

produto e das dietas, utilizou-se o fator de conversão 6,25 (SGARBIERI, 1996).

Perfil de aminoácidos. Alíquotas em triplicata do produto “MAB”, da caseína e das dietas experimentais, contendo aproximadamente 0,025g de proteína, foram hidrolisadas com ácido clorídrico 6N em temperatura constante de 110° C por 22 h. Em seguida as amostras foram filtradas, evaporadas e reconstituídas com tampão citrato de sódio, pH 2,2. Os componentes aminoacídicos foram obtidos por cromatografia de troca iônica em analisador de aminoácidos Thermo-separation Prods-Pickering, modelo PCX 3100 post-column reaction module, utilizando como padrão amino acid standard protein hydrolysate (5ml) catalog nº.01250664, Pickering Laboratories (SPACKMAN *et al.*, 1958).

Calorimetria. O valor calórico do produto, das dietas experimentais e das fezes recolhidas dos ratos, foi quantificado em bomba calorimétrica PARR modelo 1261, acoplada a um banho PARR modelo 1563.

Avaliação nutricional “in vivo”

Animais e dietas. No primeiro ensaio experimental foram utilizados quarenta ratos *Wistar* machos, de 21 dias de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, separados e distribuídos em cinco grupos (Tabela 1) com médias de pesos semelhantes ($50 \pm 0,3$ g) conforme cinco diferentes dietas (Tabela 2), contendo 10% de proteína: Controle (C₁), preparadas seguindo as recomendações da AIN-93G

TABELA 1. Peso (g) dos ratos *Wistar* de 21 dias utilizados nos ensaios biológicos experimentais 1 e 2 .

Ratos	Exp. 1					EXP. 2			
	C ₁ (g)	MAB 1 (g)	MAB 3 (g)	MAB 5 (g)	A (g)	C ₂ (g)	MAB10 (g)	MAB30 (g)	MAB50 (g)
1	48,2	60,9	53,1	55	50	58,5	52	59,5	59,1
2	57,6	40,2	45,6	44,8	45	61,7	65,9	49,1	53,7
3	58,8	46,9	43,9	50,6	47,3	66	58,6	58,2	56,1
4	51,8	58	54,1	43,7	60,1	64,5	58	57,1	58,7
5	44,5	45,2	49,1	49,3	49,1	57	53,7	51,3	50,7
6	42,9	49,9	48,8	59,3	54,4	51,1	65,8	65,2	63,3
7	49,1	53,9	44,1	47,2	51,8	53,1	49,6	54	69,9
8	45,3	48	63	47,5	43,6	51,2	61,1	69,4	51,2
Média	49,78	50,38	50,21	49,68	50,16	57,89	58,09	57,98	57,84
DP	5,91	6,86	6,42	5,24	5,32	5,84	6,07	6,81	6,47

(REEVES et al, 1993); dietas experimentais formuladas a partir de modificação da dieta controle utilizando como fonte protéica o produto MAB e a caseína, ambas em diferentes proporções : MAB 1 (1% MAB e 99% caseína), MAB 3 (3% MAB e 97% caseína), MAB 5 (5% MAB e 95% caseína) e a dieta aprotéica (A) que foi obtida excluindo-se a caseína da dieta controle. Para o segundo ensaio experimental foram utilizados trinta e dois ratos *Wistar* machos, de 21 dias de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, separados e distribuídos em quatro grupos (Tabela 1) com médias de pesos semelhantes ($58 \pm 0,2g$) conforme quatro diferentes dietas (Tabela 3) contendo 10% de proteína: Controle (C₂), preparadas seguindo as recomendações da AIN-93G (REEVES et al, 1993); dietas experimentais formuladas também a partir de modificação da dieta controle utilizando como fonte protéica o produto MAB e a caseína, ambas em diferentes proporções: MAB 10 (10% MAB e 90% caseína), MAB 30 (30% MAB e 70% caseína), MAB 50 (50% MAB e 50% caseína). Em ambos ensaios biológicos os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais nas condições do biotério (ciclo de claro/escuro de 12h, $22 \pm 2^{\circ}C$) onde receberam alimentação e água *ad libitum* durante trinta dias de experimento. O manuseio e o procedimento experimental foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética da FEA para o Uso de Animais de Experimentação.

Balanço de nitrogênio, digestibilidade e valor biológico aparente, utilização líquida da proteína e energia absorvida. No sétimo dia após o período de adaptação (3 dias), verificou-se a evolução de crescimento, consumo de dieta (calculada através dos dados de ingestão e rejeição) e coleta

TABELA 2. Composição das dietas experimentais elaboradas de acordo com as especificações da AIN-93G modificada, que foram utilizadas para o ensaio experimental I durante trinta dias.

Ingredientes	C₁ (g)	MAB 1 (g)	MAB 3 (g)	MAB 5 (g)	A (g)
Caseína (91,29%) ^a	539,65	534,25	522,4	510,85	0
MAB (86,76%) ^a	0	5,75	17,25	28,8	0
Amido milho (87%) ^b	2447,75	2447,75	2447,75	2447,75	2447,75
Amido dextrinizado (99,5%) ^b	660	660	660	660	660
Sacarose	500	500	500	500	500
Óleo de soja	350	350	350	350	350
Fibra (celulose)	250	250	250	250	250
Mix mineral	175	175	175	175	175
Mix vitamínico	50	50	50	50	50
L-cistina	15	15	15	15	15
B- colina	25,5	25,5	25,5	25,5	25,5
T-b- hidroquinona	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
Total	5 000	5 000	5 000	5 000	5 000

a. % Proteína bruta = % N x fator de conversão (6,25)

b. % de pureza do produto de acordo com o fabricante (Refinações de Milho Brasil)

TABELA 3. Composição das dietas experimentais elaboradas de acordo com as especificações da AIN-93G modificada, que foram utilizadas para o ensaio experimental 2 durante trinta dias.

Ingredientes	C₂ (g)	MAB 10 (g)	MAB 30 (g)	MAB 50 (g)
Caseína (91,29%) ^c	539,65	430,08	376,32	268,8
MAB (86,76%) ^c	0	113,28,	169,92	281,6
Amido milho (87%) ^d	2447,75	2447,75	2447,75	2447,75
Amido dextrinizado(99,5%) ^d	660	660	660	660
Sacarose	500	500	500	500
Óleo de soja	350	350	350	350
Fibra (celulose)	250	250	250	250
Mix mineral	175	175	175	175
Mix vitamínico	50	50	50	50
L-cistina	15	15	15	15
B- colina	25,5	25,5	25,5	25,5
T-b- hidroquinona	0,07	0,07	0,07	0,07
Total	5 000	5 000	5 000	5 000

c. % Proteína bruta = % N x fator de conversão (6,25)

d. % de pureza do produto de acordo com o fabricante (Refinações de Milho Brasil)

de fezes e urina de cada animal. As amostras de urina foram coletadas em erlenmeyers (200ml), contendo 10 ml de ácido sulfúrico diluído (20%), em seguida foram filtradas e transferidas para balões volumétricos os quais foram ajustados com água destilada para a obtenção de um volume final conhecido. As fezes foram coletadas, peneiradas, secas (50°C/ 6h), pesadas e moídas. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração (10°C) para análises posteriores. Determinado o nitrogênio total ingerido e excretado através das fezes e urina, além da obtenção do ganho de peso referente a este período de sete dias, foram calculados os seguintes índices nutricionais descritos por PELLET & YOUNG (1980):

$$\text{Balanço de nitrogênio: } BN = Ni - (Nf + Nu);$$

$$\text{Digestibilidade aparente: } Da = (Ni - Nf) / Ni \times 100;$$

$$\text{Valor biológico aparente: } VBa = Ni - (Nf + Nu) / Ni - Nf \times 100;$$

$$\text{Utilização líquida da proteína: } NPU = Ni - (Nf + Nu) / Ni \times 100$$

Onde: Ni = nitrogênio ingerido; Nf = nitrogênio fecal; Nu = urinário.

A energia absorvida (EA) pelos animais durante este período de sete dias foi determinada de acordo com o método descrito por CABALLERO (1997). Para o cálculo da EA utilizaram-se as seguintes equações:

$$EDC = CD \times EBD / 100$$

Onde: EDC = energia da dieta consumida (kcal); CD = consumo de dieta (g); EBD = energia bruta da dieta (kcal/100g).

$$EEF = QFE \times EBF / 100$$

Onde: EEF = energia excretada nas fezes (kcal); QFE = quantidade de fezes excretadas (g); EBF = energia bruta fecal (kcal/ 100g).

$$EA = EDC - EEF$$

Quociente de eficiência protéica, quociente de eficiência líquida da proteína e quociente de eficiência alimentar. Para a determinação destes índices nutricionais, os animais continuaram recebendo alimentação e água *ad libitum* durante os dezoito dias restantes. A evolução do crescimento foi acompanhada semanalmente junto com o consumo alimentar. A reposição de dieta e água foi realizada a cada dois dias. O cálculos destes índices foram determinados de acordo com SGARBIERI (1987).

Quociente de eficiência protéica: $PER = \text{Ganho de peso (g)} / \text{Proteína consumida (g)}$;

Quociente de eficiência líquida da proteína: $NPR = \text{Ganho de peso do grupo experimental (g)} + \text{Perda de peso do grupo aprotéico (g)} / \text{Proteína consumida (g)}$.

Quociente de eficiência alimentar: $QEA = \text{Ganho de peso (g)} / \text{Consumo de dieta (g)}$

Análises bioquímicas.

Preparação das amostras de sangue. No 30º dia os animais foram sacrificados após 24h de jejum. O sangue de cada animal foi obtido através de punção cardíaca, deixado em repouso sem tratamento com EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e posteriormente centrifugado a

1118xg por 15 min em centrífuga Sigma 2k15, rotor nº. 12141. O plasma obtido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C, em biofreezer. Para as análises bioquímicas, foram utilizados kits específicos do laboratório Labtest para determinação de: albumina, proteínas totais; e fosfatase alcalina.

Análises histológicas

Análises de imagem do tamanho das vilosidades e criptas intestinais dos ratos do ensaio experimental 2. Para esta análise, prepararam-se os cortes histológicos com aproximadamente 10 µm de espessura do intestino delgado (porção jejuno e íleo) seguindo técnicas laboratoriais histológicas de rotina. Com o auxílio do microscópio óptico munido de objetivas de 12,5x, 25x, 40x e 100x e do software de análise de imagens da GLOBAL LAB (Image da Data Translation, Inc.) acoplado de câmara de vídeo Hitachi modelo CCD monocromático, fez-se a medição do tamanho (nm) das vilosidades e das criptas intestinais dos ratos.

Análises estatísticas.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de uma via, para determinar a significância ($p < 0,05$) das diferenças devidas ao principal efeito (dieta). Quando o F resultou significativo, seguiu-se o teste de classificação de Duncan. Para todas estas análises foi utilizado o programa STATISTICA para Windows, versão 5.0.

Resultados e Discussão

Características químicas e físicas da mistura de aminoácidos policondensados sintéticos MAB. O produto sintético MAB apresenta aspecto líquido, viscoso, coloração marrom escura, alta solubilidade em água e baixa solubilidade em solventes orgânicos de polaridade variável, pH alcalino e umidade aparentemente baixa. Os teores de nitrogênio e proteína são quase semelhantes aos encontrados na caseína, ou seja 13,7 e 86,8% respectivamente. Também possui um teor calórico significativo. Através de análise elementar verifica-se que o MAB possui 26,53% de carbono, 6,62% de hidrogênio e 13,29% de nitrogênio. Com o decorrer do tempo observou-se no produto a formação de um precipitado na forma de cristais. Estes cristais apresentaram alta solubilidade em água e sua composição elementar foi de 1,13% de carbono, 5,23% de hidrogênio e 11,56% de nitrogênio. Na Tabela 4 encontra-se um resumo destas características.

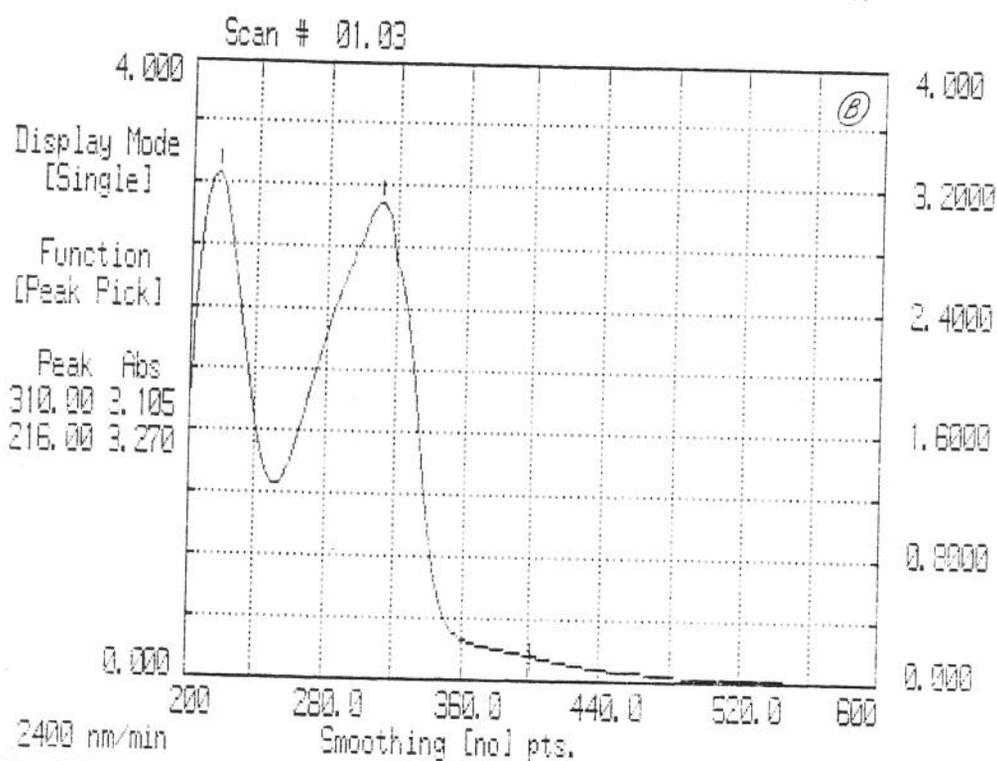
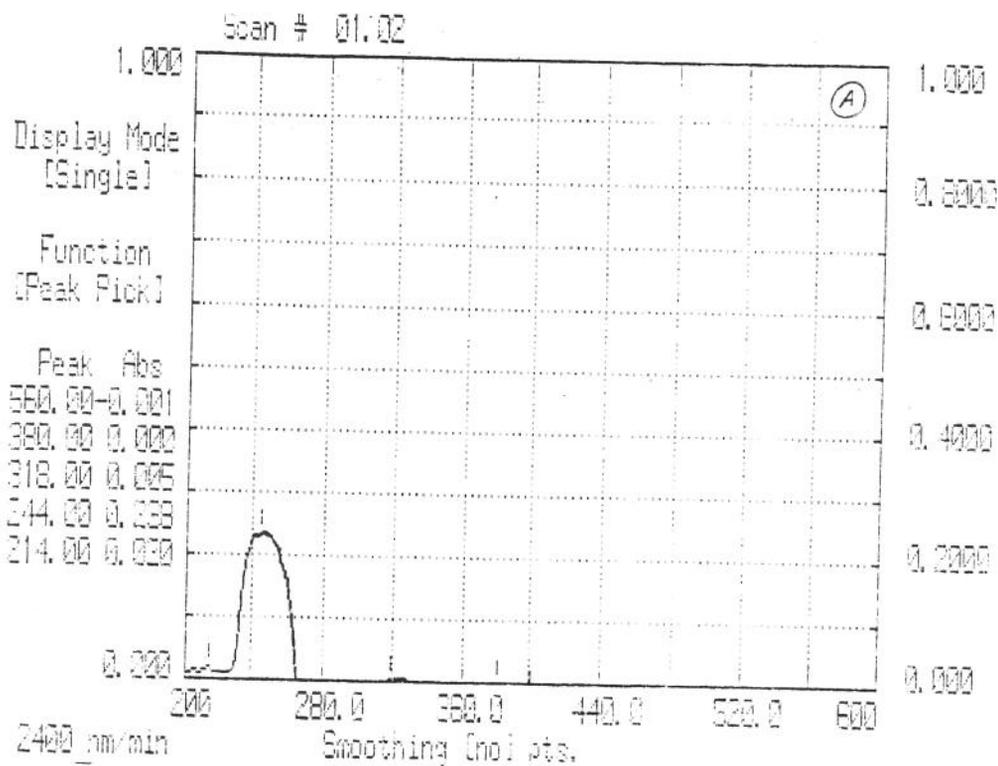
Solubilização de compostos (partição em batch). As Figuras 1 e 2 apresentam os espectros Vis/UV dos possíveis compostos solubilizados, extraídos dos sobrenadantes da solução ST (MAB diluído em água destilada 10%) nos solventes hexano, etanol, acetona e éter etílico na proporção 10:90 (v/v). Embora a solubilidade do produto não tenha sido quantificada, verificou-se que a diminuição da constante dielétrica do meio pelo uso dos solventes de polaridade variável proporcionou uma interação significativa entre o soluto e os solventes (AMAYA-FARFAN, 1994) já que em todas as soluções foi observado um sobrenadante que variava da cor amarelo-ocre escuro turvo ao amarelo-claro transparente. Em hexano

TABELA 4. Características química e físicas da mistura de aminoácidos livres e condensados sintéticos “MAB”.

Características químicas e físicas	Aminoácidos policondensados sintéticos “MAB”
Solubilidade em água	Alta
Solubilidade em solventes orgânicos	Baixa
pH	7,20
Umidade (%) *	28,40
Densidade (g/ml) *	1,20
VCT (kcal/ 100g) *	424,70
Nitrogênio (%) **	13,70
Proteína (%) **	86,80
% Carbono (MAB líquido) *	26,53
% Carbono (MAB cristais) *	1,13
% Hidrogênio (MAB líquido) *	6,62
% Hidrogênio (MAB cristais) *	5,23
% Nitrogênio (MAB líquido) *	13,29
% Nitrogênio (MAB cristais) *	11,56

* Valores médios obtidos das amostras em duplicatas.

** Valores médios obtidos das amostras em triplicatas.



TRACE			
λ	ABS	SOURCE	15:34
500.0	0.0014	Vis/UV	07/08/97
λ	ABS		
400.00	0.1617		

FIGURA 1. Espectro Vis/UV dos sobrenadante extraídos e filtrados da solução ST (MAB diluído a 10% em água destilada) em hexano (a) e etanol (b).

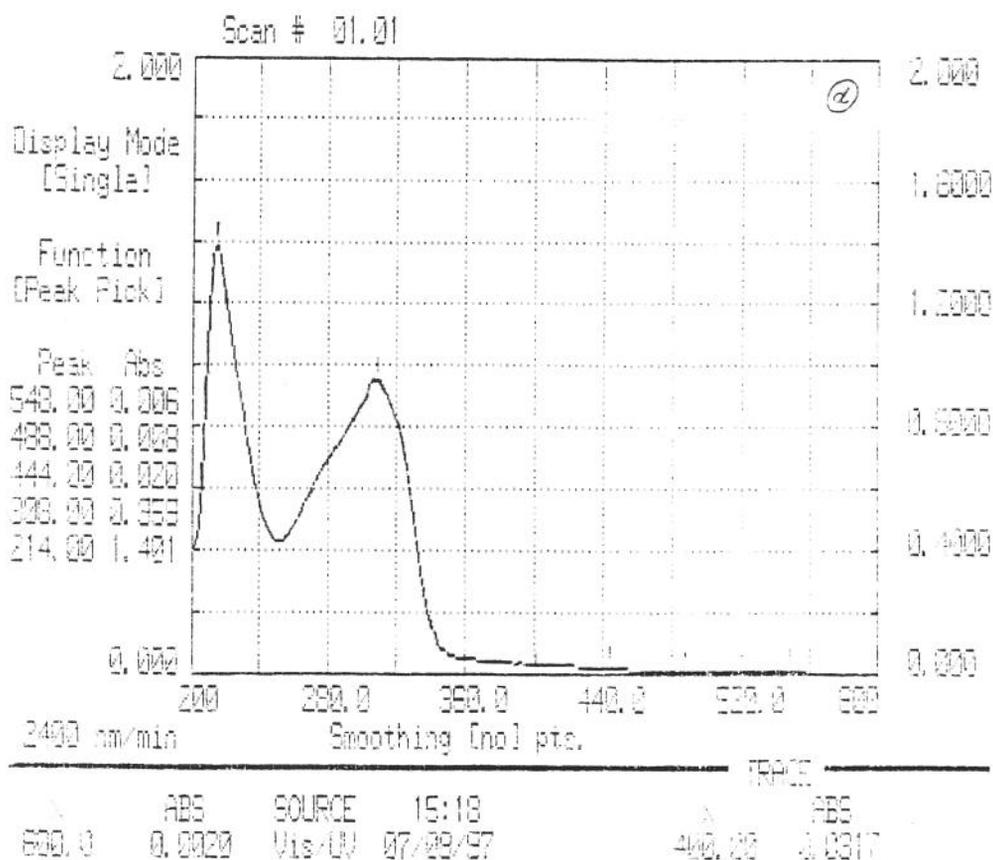
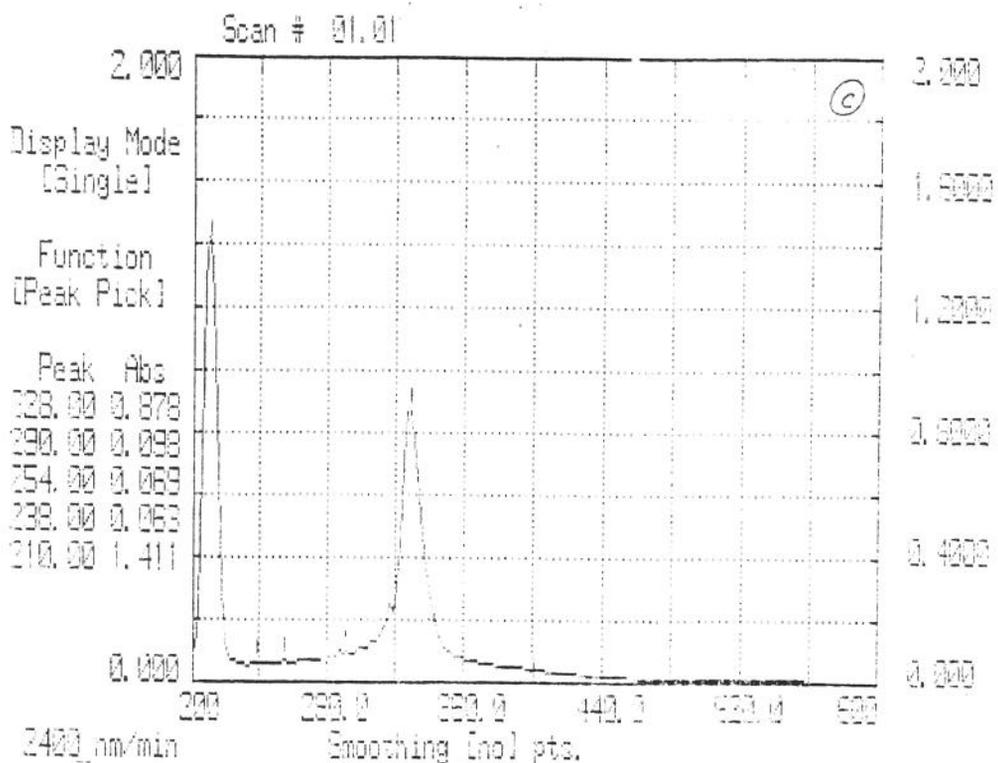


FIGURA 2. Espectro Vis/UV dos sobrenadante extraídos e filtrados da solução ST (MAB diluído a 10% em água destilada) em acetona (c) e éter etílico (d).

observou-se uma baixa solubilidade do soluto, pela pequena banda de absorção em 244nm (absorbância de 0,238). Em etanol, a solubilidade foi maior do que em hexano, na concentração próxima da saturação (temperatura ambiente), mostrando no espectro Vis/UV duas bandas (212 e 310 nm), com absorbâncias de 2,27 e 3,03, respectivamente. Em éter etílico, o MAB mostrou solubilidade semelhante àquela percebida em etanol, apresentando também duas bandas (214 e 308 nm), com absorções correspondentes de 1,40 e 0,96. Em acetona, a pequena porção solúvel mostrou um espectro Vis/UV com duas bandas estreitas 210 e 328 nm; absorbâncias respectivamente de 1,41 e 0,88. Todos os extratos mostraram a presença de compostos que absorvem na região UV, onde absorvem as ligações amídicas e as cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos, como a tirosina, fenilalanina e/ou triptofano.

Identificação de grupos funcionais. Através do espectro de infravermelho, que corresponde à parte do espectro situada entre as regiões do visível e microondas, é possível identificar uma ampla gama de grupos funcionais presentes em uma amostra química definida. Este tipo de análise identifica na porção 4000 e 400 cm^{-1} bandas de vibração-rotação das moléculas e a frequência ou comprimento de onda de uma absorção dependerá das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos presentes na amostra (DYER, 1965).

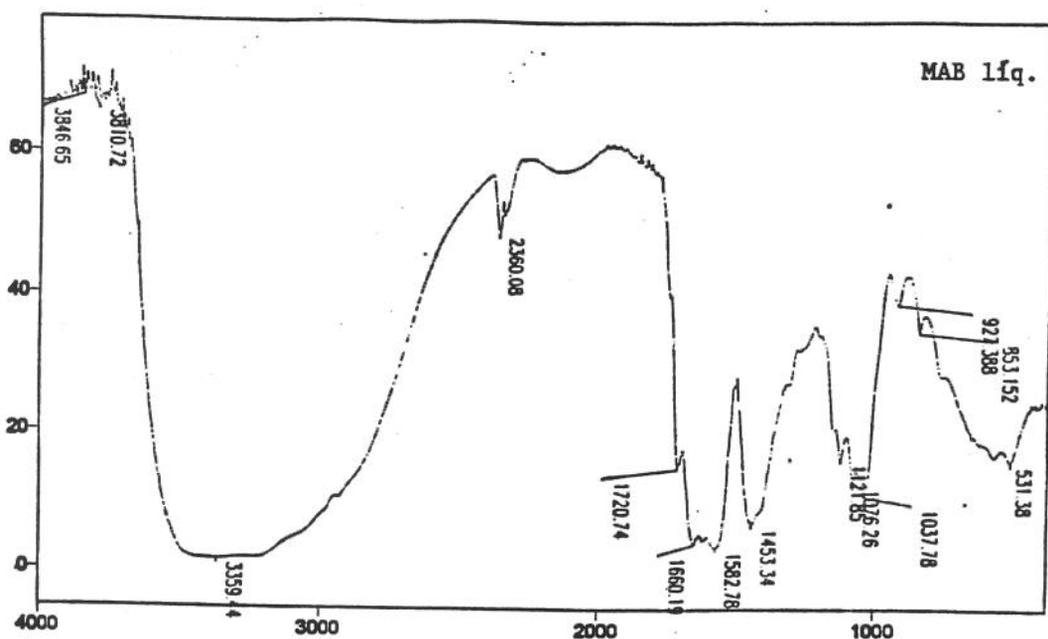
A Figura 3 mostra os espectros de infravermelho encontrados para o produto MAB. No quadro (a) apresenta-se o espectro do produto em seu estado líquido. Observa-se que entre as faixas 3500 e 3000 cm^{-1} há um pico pouco definido porém o mesmo indica possível presença dos

seguintes grupos funcionais: NH (amida), R-NH-R (amônia), =N- (amônia terciária), \equiv C-H, -OH e C-H (deflexão axial aromática). Na faixa 2360 cm^{-1} aparece um pico ligeiramente menor que pode indicar presença de composto aromático com vibrações secundárias de anel, $\text{C}\equiv\text{N}$ alifática ou aromática e também $\text{C}\equiv\text{C}$. Nas faixas inferiores a 2000 cm^{-1} podem estar os seguintes grupos funcionais: alcanos, aminoácidos contendo $-\text{NH}_2$, ésteres, álcoois, fenóis, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}=\text{N}$.

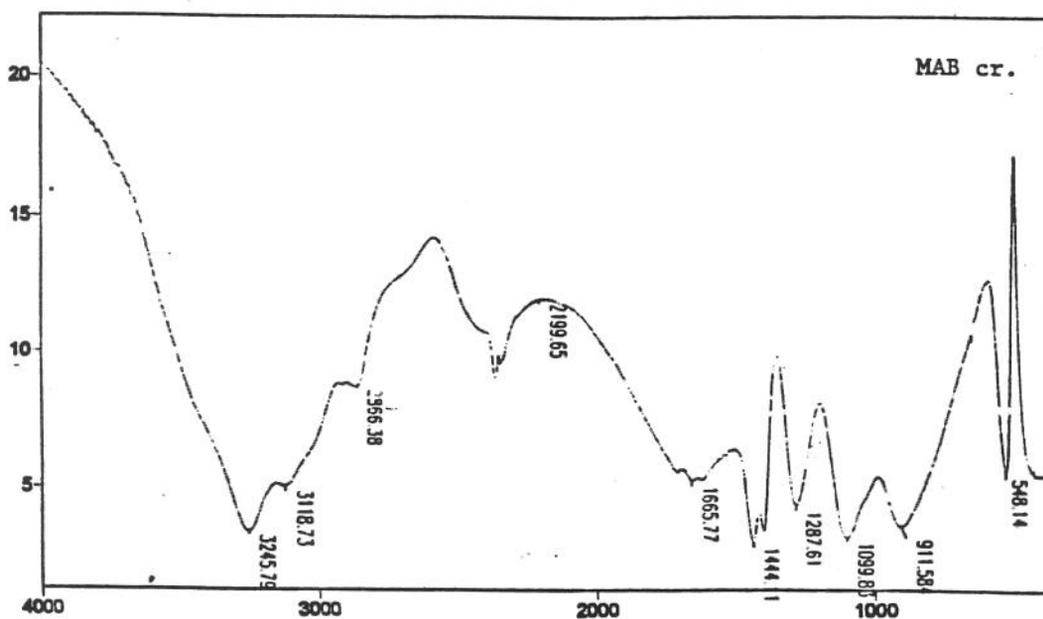
No quadro (b) encontra-se o espectro infravermelho apresentado pelos cristais formados no MAB. Aparentemente esta substância apresenta os seguintes grupos funcionais, na faixa entre 3500 a 2800 cm^{-1} : grupos NH, CH e OH, éters, $-\text{CH}=\text{C}-\text{O}$, $\text{C}=\text{CH}-\text{O}$, R-COOH e ligações OH. Entre as faixas 2800 e 2000 cm^{-1} pode estar presente uma vibração secundária de anel aromático e cargas amino derivadas. Na faixa entre 1700 e 1500 cm^{-1} os picos podem acusar presença de deflexão axial do esqueleto de anel aromático, ligações NH-CO-NH, amidas secundárias, cetonas e ésteres.

Embora as amostras MAB, líquida e cristais, apresentem uma variedade de substâncias químicas que interferiram com estes resultados, tornando-os pouco conclusivos, os mesmos indicaram a presença típica de compostos aminados nas duas amostras analisadas do produto os quais foram melhor identificados através de cromatografia de troca iônica (Figura 4).

Quantificação de uréia presente no produto sintético MAB. A uréia presente no produto sintético MAB foi hidrolisada e quantificada pela urease, produzindo íons de amônia e gás carbônico. Estes



Transmittance / Wavenumber (cm-1)



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

FIGURA 3. Espectros de infravermelho nas amostras do produto MAB líquido (a) e cristais (b), na região 400 a 4000 cm^{-1} .

íons reagiram em pH alcalino com o salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, formando o azul de indofenol. A formação da cor foi proporcional à quantidade de uréia presente no produto MAB que foi de 262,80 mg/ml ou 26,28% (p/v) ou 22% (p/p).

Perfil de aminoácidos do MAB. A composição em aminoácidos do produto e da caseína apresentam-se na Tabela 5. De acordo com estes resultados e o Padrão da FAO/WHO, o produto possui vários aminoácidos essenciais limitantes, com exceção da treonina e tirosina-fenilalanina, cujas quantidades estão aumentadas 422 e 450%, respectivamente com relação àquele padrão. Dentre os aminoácidos não essenciais à nutrição humana somente o ácido aspártico está presente em maior quantidade, 241%, com relação ao perfil aminoacídico da caseína. O produto apresenta também uma alta porcentagem de amônia, provavelmente resultante do processo de hidrólise ácida da uréia. Através dos aminogramas obtidos do produto sem e com hidrólise (Figura 4), observa-se um perfil aminoacídico diferenciado entre eles, ou seja, sem hidrólise existem bandas ninidrina-positivas de baixa retenção na coluna, que eluíram rapidamente e poucos picos de aminoácidos. Já o aminograma do produto hidrolisado mostrou que o tratamento hidrolisou peptídeos liberando os aminoácidos mostrados na Tabela 5.

Tratando-se de uma síntese químico-térmica inespecífica para um ou outro aminoácido em particular, a condensação dos mesmos em polipeptídeos de composição predeterminada, deverá ser também de difícil manipulação, especialmente para se assemelhar com as proteínas de origem

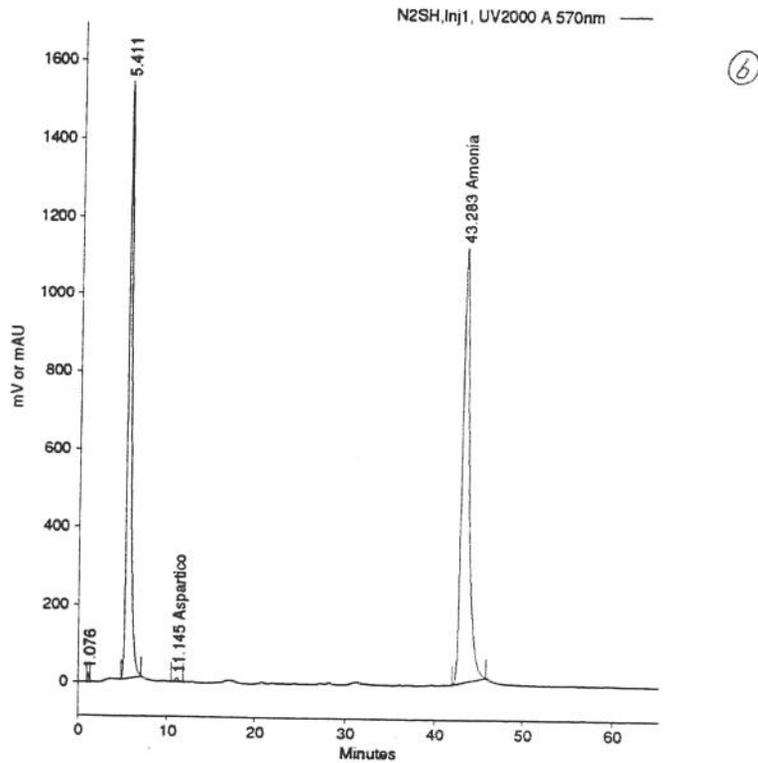
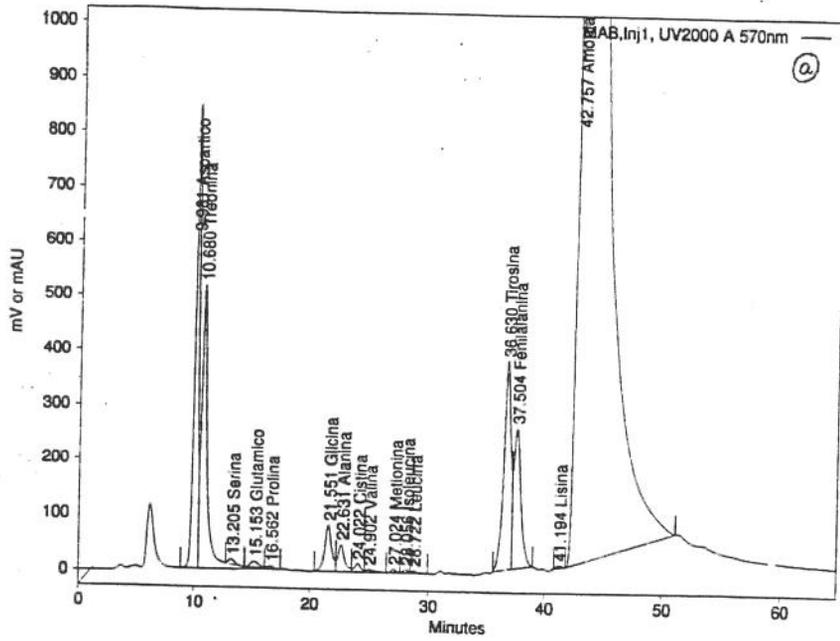


FIGURA 4. Aminogramas do produto MAB com hidrólise (a) e sem hidrólise (b).

TABELA 5. Composição em aminoácidos do produto sintético (MAB) e da caseína (CAS) (g aminoácidos/100g de proteína).

Aminoácidos	MAB	CAS	Padrão FAO/WHO
Lys	0,12	6,99	5,8
Leu	0,13	10,44	6,6
Ile	0,18	5,13	2,8
Thr	14,36	2,33	3,4
Trp	nd	nd	1,1
Val	0,20	6,94	3,5
Met + Cys	0,93	4,4	2,5
Phe + Tyr	28,46	7,88	6,3
His	0	2,82	1,9
Glu	0,54	25,25	
Asp	20,16	8,36	
Ser	0,23	6,63	
Pro	3,83	4,00	
Ala	1,06	2,49	
Gly	0,14	1,04	
Arg	0	2,93	
NH ₃	29,64	0,92	
EQ (%)	5,2	70,0	

Padrão de referência protéica FAO/WHO/UNU 1985 (necessidades de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos de idade).
nd = não determinado

biótica. Segundo HARADA & FOX (1964), o produto final destas sínteses estará intrinsecamente correlacionado com as condições prebióticas utilizadas. Demonstraram estes autores que o emprego da energia térmica foi eficiente na policondensação de vários aminoácidos livres obtidos a partir de amônia, metano e ácido cianídrico, conforme mostrado na Tabela 6. Verifica-se também que para todas estas substâncias quanto maior era a temperatura utilizada, maior era a porcentagem de ácido aspártico, ácido glutâmico e serina encontrados, embora este efeito foi inverso com relação à glicina.

TABELA 6. Composição em aminoácidos das substâncias sintéticas obtidas por HARADA & FOX (1964) e do produto MAB (g aminoácidos/100g de proteína).

Aminoácidos	STAS 950°C	STGS 950°C	STGS 1050°C	MAB
Lys	ns	ns	ns	0,12
Leu	2,4	1,5	4,6	0,13
Ile	1,1	0,7	2,5	0,18
Thr	0,9	0,6	3,0	14,36
Val	2,3	1,2	2,1	0,20
His	ns	ns	ns	0
Tyr	0,8	0,4	2,0	15,19
Met	ns	ns	ns	0,18
Cys	ns	ns	ns	0,75
Phe	0,8	0,6	2,20	13,27
Glu	4,8	3,1	10,2	0,54
Asp	3,4	2,5	15,2	20,16
Ser	2,0	1,9	10,0	0,23
Pro	2,3	1,5	2,3	3,83
Ala	18,0	16,9	20,2	1,06
Gly	60,3	68,8	24,4	0,14
Arg	ns	ns	ns	0

STAS = síntese térmica em areia de sílica (950°C).

STGS = síntese térmica em gel de sílica (950°C).

STGS = síntese térmica em gel de sílica (1050°C).

ns = não sintetizado.

Na Tabela 6, as substâncias sintéticas apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas com relação à composição aminoacídica. Observa-se que alguns aminoácidos como a lisina, arginina, histidina, cistina e metionina não estão presentes no policondensado de aminoácidos de HARADA & FOX. Por outro lado, esses produtos continham quase todos os aminoácidos presentes no MAB em maiores quantidades, já que este último mostrou um déficit com relação à maioria dos aminoácidos de cadeia lateral alifática embora tenha altas quantidades de aminoácidos de cadeias lateral aromática e ácidas.

Composição de aminoácidos das dietas experimentais. Na Tabela 7 encontra-se a composição em aminoácidos das dietas formuladas para o experimento 1. Verifica-se que, em geral, o aporte protéico das dietas experimentais promoveu um perfil aminoacídico qualitativo satisfatório quando comparado com a dieta C₁ e com o requerimento de nutrientes para o rato (RN). Por ter-se escolhido como modelo biológico experimental esta espécie, procurou-se trabalhar com um requerimento nutricional mínimo específico. Com isso esperava-se ter um parâmetro nutricional mais satisfatório e completo, já que segundo a recomendação citada nas Tabelas 7 e 8, consideram-se também essenciais o ácido glutâmico, prolina e arginina para ratos em crescimento. Embora para alguns aminoácidos essenciais, como é o caso dos aromáticos e da leucina, o requerimento seja semelhante tanto em ratos como em humanos.

Observa-se que a dieta MAB 1 apresentou os seguintes aminoácidos em maior quantidade percentual com relação ao perfil da dieta C₁ e ao perfil recomendado pela RN, respectivamente: aromáticos (18 e 39%),

sulfurados (25 e 10%), histidina (30 e 49%) e lisina (32 e 23%). A leucina e a isoleucina apresentaram maiores quantidades percentuais com relação somente à RN, ou seja, 72 e 734% respectivamente. A arginina apresentou 13% a mais com relação ao perfil da dieta C₁ e menos 34% com relação à RN. O ácido glutâmico e a treonina, quando comparados com esse mesmo perfil apresentaram déficit de 32 e 28%.

A dieta MAB 3 apresentou os seguintes aminoácidos em maiores quantidades percentuais com relação à dieta C₁ e ao RN, respectivamente: leucina (54 e 158%), isoleucina (2 e 761%), valina (6 e 46%), aromáticos (34 e 58%), histidina (141 e 174%) e lisina (22 e 13%). Em menores quantidades encontram-se os seguintes aminoácidos com relação ao perfil recomendado: sulfurados (19%), treonina (34%), ácido glutâmico (37%), prolina (32%) e arginina (39%).

A dieta MAB 5 apresentou os seguintes aminoácidos em maiores quantidades percentuais com relação à dieta C₁ e ao RN, respectivamente: leucina (4 e 73%), isoleucina (5 e 787%), valina (4 e 43%) e histidina (29 e 46%). Já os aminoácidos aromáticos encontravam-se em déficit de 18% somente com relação à dieta C₁. A treonina, o ácido glutâmico, a prolina, a lisina e a arginina apresentaram 14, 25, 45, 15 e 30% menos com relação ao RN. Observou-se também que a quantidade de amônia presente nesta dieta foi de aproximadamente 16% a mais com relação à dieta C₁.

A composição em aminoácidos das dietas do experimento 2 está apresentada na Tabela 8. Nestas formulações observa-se que o aumento da substituição quantitativa da fonte protéica provinda da caseína pelo MAB

diminuiu quantitativamente o perfil de aminoácidos essenciais destas dietas quando comparadas com o perfil da dieta C₂ e do RN, e aumentou a porcentagem de amônia.

A dieta MAB 10 apresentou os seguintes aminoácidos em maior quantidade percentual com relação ao perfil da dieta C₂ e ao perfil recomendado pela RN, respectivamente: isoleucina (4 e 692%), aromáticos (5 e 19%), sulfurados (38 e 8%), histidina (21 e 99%) e prolina (41 e 8%). A leucina e a valina apresentaram maiores quantidades percentuais com relação somente à RN, ou seja, 63 e 33% respectivamente; já com relação ao perfil da dieta C₂ apresentou déficit de 26 e 19% para os mesmos aminoácidos. A treonina, o ácido glutâmico, a lisina e a arginina apresentaram déficit de 19, 34, 4 e 33% respectivamente com relação ao RN. A quantidade de amônia presente nesta formulação foi 128% a mais com relação à dieta C₂.

A dieta MAB 30 apresentou os seguintes aminoácidos em maiores quantidades percentuais com relação à dieta C₂ e ao RN, respectivamente: aromáticos (16 e 31%), sulfurados (55 e 21%) e histidina (76 e 189%). A leucina e a valina apresentaram maiores quantidades somente com relação ao perfil do RN, ou seja, 55 e 70% respectivamente. Em menores quantidades encontram-se os seguintes aminoácidos com relação ao RN: treonina (26%), ácido glutâmico (34%), prolina (54%), lisina (21%) e arginina (43%). A porcentagem de amônia presente nesta dieta foi 250% a mais com relação à dieta C₂.

A dieta MAB 50 apresentou os seguintes aminoácidos em maiores quantidades percentuais com relação à dieta C₂ e ao RN,

TABELA 8. Composição em aminoácidos das dietas do experimento 2, que utilizaram como fonte protéica o policondensado de aminoácidos sintético MAB e a caseína em diferentes proporções (g aminoácidos/100g de proteína).

Aminoácidos	C₂	MAB 10	MAB 30	MAB 50	RN
LEU	13,80	10,20	9,68	10,55	6,24
ILE	4,64	4,83	4,68	4,58	0,61
VAL	8,26	6,70	8,51	7,06	5,04
TYR + PHE	7,56	7,97	8,77	7,14	6,69
MET + CYS	3,94	5,42	6,10	6,53	5,03
HYS	4,08	4,95	7,17	4,96	2,48
THR	3,36	3,41	3,13	2,95	4,21
SER	5,67	6,11	5,42	5,23	
GLU	21,54	21,78	21,79	20,74	33,08
PRO	2,51	3,55	1,51	4,21	3,30
GLY	1,48	1,58	1,62	1,85	
ALA	2,81	3,10	2,78	3,37	
LYS	9,22	7,20	5,95	6,32	7,52
ARG	2,93	3,38	2,89	1,83	5,03
ASP	7,23	7,65	6,64	6,47	
NH ₃	0,96	2,19	3,35	5,21	

C₂ = dieta controle cuja fonte exclusiva de proteína foi a caseína (AIN-93 G)

MAB 10 = dieta elaborada com 10% do teor protéico do produto MAB e 90% de caseína

MAB 30 = dieta elaborada com 30% do teor protéico do produto MAB e 70% de caseína.

MAB 50 = dieta elaborada com 50% do teor protéico do produto MAB e 50% de caseína.

RN = requerimento de nutrientes para o rato (Nutrient requirements of domestic animals - n°. 10 Nutrient requirements of laboratory animals 2nd Ed. 1972)

respectivamente: sulfurados (66 e 30%), histidina (22 e 100%) e prolina (68 e 28%). Já os aminoácidos leucina, valina, tirosina e triptofano encontravam-se em déficit de 24, 15 e 5 % respectivamente somente com relação à dieta C₂. Embora os seguintes aminoácidos apresentaram uma porcentagem menor tanto com relação à dieta C₂ como com o RN: treonina (12 e 30%), o ácido glutâmico (4 e 37%), a lisina (31 e 16%) e a arginina (38 e 64%). Observou-se também que a quantidade de amônia presente nesta dieta foi de aproximadamente 443% a maior em relação à dieta C₂.

Avaliação nutricional “in vivo” da qualidade protéica do MAB pelos métodos baseados na retenção de nitrogênio e mudança de peso corporal

Consumo de proteína, consumo de dieta e ganho de peso.

Na Tabela 9 encontram-se os resultados comparativos do consumo de dieta (CD), consumo de proteína (CP) e ganho de peso (GP) durante os sete dias de balanço de nitrogênio, o que permite visualizar a eficiência que as proteínas combinadas das dietas formuladas para os experimentos 1 e 2 para promover o crescimento nos animais. Os grupos MAB 1 e MAB 5, tiveram comportamento parecido com o consumo de dieta, proteína e ganho de peso, não diferindo estatisticamente do grupo C₁. Por outro lado, o grupo C₁ demonstrou o melhor desempenho de crescimento, enquanto que o grupo MAB 3 teve o menor ganho de peso devido ao menor consumo de dieta e conseqüentemente de proteína. No experimento 2, observa-se que o consumo de dieta foi estatisticamente semelhante entre os grupos C₂ e MAB 10 e entre os grupos MAB 30 e MAB 50. O consumo de proteína foi igual para quase

TABELA 9. Consumo de dieta (CD), consumo de proteína (CP) e ganho de peso (GP) obtidos em sete dias de balanço de nitrogênio.

Tratamentos	CD (g)	CP (g)	GP (g)
C₁	169 ± 9 a	17 ± 1 a	35 ± 5 a
MAB 1	162 ± 5 ab	17 ± 1 ab	32 ± 5 ab
MAB 3	151 ± 14 b	15 ± 1 b	26 ± 9 b
MAB 5	167 ± 18 a	16 ± 1 a	30 ± 8 ab
C₂	169 ± 10 a	17 ± 1 a	36 ± 6 a
MAB 10	169 ± 6 a	17 ± 1 a	29 ± 3 b
MAB 30	122 ± 5 b	17 ± 2 a	23 ± 4 c
MAB 50	105 ± 37 b	13 ± 1 b	10 ± 4 d

Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 8). Médias seguidas por letras diferentes na vertical indicam diferença estatística (p < 0,05).

Exp. 1: C₁: controle (caseína); **MAB 1:** 1% do teor protéico do produto MAB e 99% de caseína; **MAB 3:** 3% do teor protéico do produto MAB e 97% de caseína; **MAB 5:** 5% do teor protéico do produto MAB e 95% de caseína.

Exp. 2: C₂: controle (caseína); **MAB 10:** 10% do teor protéico do produto MAB e 90% de caseína; **MAB 30:** 30% do teor protéico do produto MAB e 70% de caseína; **MAB 50:** 50% do teor protéico do produto MAB e 50% de caseína.

todos os grupos com exceção do MAB 50, que apresentou o menor valor e conseqüentemente um menor ganho de peso. O melhor desempenho de crescimento foi novamente proporcionado pela dieta C₂.

Energia absorvida . Através dos dados de consumo de dieta (CD), energia da dieta consumida (EDC), quantidade de fezes excretadas (QFE), energia bruta fecal (EBF) e energia excretada nas fezes (EEF) foi possível determinar a energia absorvida (EA) pelos animais após o período de sete dias de balanço nitrogenado. Os dados encontrados para estes índices estão apresentados na Tabela 10.

De acordo com esses resultados verifica-se que o grupo MAB 3 apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com relação às seguintes variáveis: CD, QFE, EDC, EEF e EA. Já o grupo MAB 5 apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) somente para a variável EEF. Observa-se também que o grupo C₁ e o grupo MAB 5 apresentaram médias aritméticas superiores nas variáveis EDC e EA, com relação aos grupos MAB 1 e MAB 3. No segundo ensaio experimental o grupo MAB 30 apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com relação às variáveis CD, EDC e EA. E o grupo MAB 50 apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para quase todas as variáveis com exceção da EBF. O consumo de dieta foi maior entre os grupos C₂ e MAB 10, os quais apresentaram conseqüentemente valores semelhantes para EBF, EDC e EA, com relação aos grupos MAB 30 e MAB 50. Vale a pena ressaltar que durante todo o experimento em nenhum momento os animais alimentados com a mistura protéica parcial MAB/caseína apresentaram diarreia.

TABELA 10. Consumo de dieta (CD), quantidade de fezes excretadas (QFE), energia bruta da dieta (EBD), energia bruta fecal (EBF), energia da dieta consumida (EDC), energia excretada nas fezes (EEF) e energia absorvida (EA) obtidos em sete dias de balanço nitrogenado.

Índices (Exp. 1)	C ₁	MAB 1	MAB 3	MAB 5
CD (g)	169 ± 9 a	162 ± 5 ab	151 ± 14 b	167 ± 18 a
QFE (g)	5 ± 1 a	5 ± 1 a	3,05 ± 0,5 b	6 ± 1 a
EBD (kcal/100g)	424,69	424,69	414,84	415,99
EBF (kcal/100g)	390 ± 6 a	383 ± 31 a	397 ± 8 a	404 ± 23 a
EDC (kcal)	719 ± 36 a	690 ± 22 a	626 ± 59 b	695 ± 75 a
EEF (kcal)	21 ± 3 ac	20 ± 3 a	12 ± 2 b	23 ± 4 c
EA (kcal)	698 ± 35 a	670 ± 22 a	613 ± 58 b	672 ± 74 a
Índices (Exp. 2)	C ₂	MAB 10	MAB 30	MAB 50
CD (g)	169 ± 10 a	169 ± 6 a	122 ± 5 b	105 ± 37 b
QFE (g)	8 ± 1 a	9 ± 2 a	9 ± 1 a	6 ± 1 b
EBD (kcal/100g)	415,16	413,89	412,67	407,4
EBF (kcal/100g)	393 ± 6 a	392 ± 10 a	385 ± 10 a	383 ± 14 a
EDC (kcal)	702 ± 42 a	700 ± 25 a	503 ± 20 b	426 ± 151 b
EEF (kcal)	32 ± 4 a	36 ± 7 a	33 ± 5 a	24 ± 7 b
EA (kcal)	671 ± 39 a	664 ± 27 a	471 ± 23 b	403 ± 27 b

Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 8). Médias seguidas por letras diferentes na horizontal indicam diferença estatística (p < 0,05).

Exp. 1: C₁: controle (caseína); **MAB 1:** 1% do teor protéico do produto MAB e 99% de caseína; **MAB 3:** 3% do teor protéico do produto MAB e 97% de caseína; **MAB 5:** 5% do teor protéico do produto MAB e 95% de caseína.

Exp. 2: C₂: controle (caseína); **MAB 10:** 10% do teor protéico do produto MAB e 90% de caseína; **MAB 30:** 30% do teor protéico do produto MAB e 70% de caseína; **MAB 50:** 50% do teor protéico do produto MAB e 50% de caseína.

Balanço de nitrogênio. Os valores médios referentes ao nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio fecal (NF), nitrogênio urinário (NU) e balanço de nitrogênio (BN) dos ratos Wistars estudados nos ensaios biológicos experimentais 1 e 2 apresentam-se na Tabela 11.

Os resultados de nitrogênio ingerido apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos MAB 3 e MAB 5 com relação ao grupo C₁, o qual apresentou também o maior teor seguido pelo grupo MAB 1. No segundo experimento, somente o grupo MAB 50 diferiu estatisticamente dos demais, sendo que, novamente o grupo C₂ apresentou maior valor. Através destes dados percebe-se que a ingestão de nitrogênio é maior nas dietas cuja fonte protéica apresentou um perfil de aminoácidos essenciais completo (Tabelas 7 e 8). Resultados semelhantes foram obtidos por DUARTE (1997) comparando a eficiência nutricional de proteínas plasmáticas e isolados protéicos de globina bovinas com a caseína, onde verificaram que o consumo de proteína foi menor nas formulações que apresentaram um desbalanceamento qualitativo de aminoácidos essenciais. TACKMAN *et al.* (1990) demonstraram que dietas com baixos teores de proteínas ou contendo quantidades desproporcionadas de alguns aminoácidos causaram diminuição da ingestão alimentar no rato. Em outro estudo anterior, PENG (1979) cita que o crescimento e a ingestão alimentar são agravados pelo tipo de desbalanceamento de aminoácidos limitantes na dieta. Em seus resultados verificou que as dietas desbalanceadas em Met apresentaram um efeito mais severo, seguida em ordem decrescente por Ile, Trp, Leu, Val, His, Phe, Thr, Lys e Arg. Embora ainda não se conheça bem o mecanismo pelos quais estes nutrientes interferem com a ingestão alimentar, VENERO *et al.* (1992) demonstraram que ratos alimentados com dietas de baixo teor de

TABELA 11. Valores de nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio fecal (NF), nitrogênio urinário (NU) e balanço de nitrogênio (BN) obtidos durante sete dias de experimento.

Tratamentos	NI (mg)	NU (mg)	NF (mg)	BN (mg)
C ₁	2711 ± 137 a	356 ± 151 a	50 ± 9 a	2305 ± 131 a
MAB 1	2673 ± 73 ac	374 ± 127 a	76 ± 15 b	2223 ± 174 a
MAB 3	2408 ± 147 b	459 ± 132 ab	79 ± 24 b	1868 ± 175 b
MAB 5	2533 ± 238 bc	642 ± 269 b	87 ± 20 b	1804 ± 292 b
C ₂	2794 ± 168 a	717 ± 155 a	11 ± 2 a	2066 ± 216 a
MAB 10	2720 ± 94 a	1218 ± 455 b	12 ± 3 ab	1490 ± 478 b
MAB 30	2720 ± 294 ab	1277 ± 403 b	18 ± 3 c	1424 ± 470 b
MAB 50	2059 ± 84 b	1224 ± 369 b	15 ± 3 b	820 ± 401 c

Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 8). Médias seguidas por letras diferentes na vertical indicam diferença estatística (p < 0,05).

Exp. 1: C₁: controle (caseína); MAB 1: 1% do teor protéico do produto MAB e 99% de caseína; MAB 3: 3% do teor protéico do produto MAB e 97% de caseína; MAB 5: 5% do teor protéico do produto MAB e 95% de caseína.

Exp. 2: C₂: controle (caseína); MAB 10: 10% do teor protéico do produto MAB e 90% de caseína; MAB 30: 30% do teor protéico do produto MAB e 70% de caseína; MAB 50: 50% do teor protéico do produto MAB e 50% de caseína.

proteínas, proporcionavam alterações nos níveis de dopamina e serotonina como também em seus metabólitos no cérebro destes animais.

Para os valores de nitrogênio urinário, verifica-se que os dados do experimento 1 são estatisticamente semelhantes entre si, porém diferentes do grupo MAB 5 ($p < 0,05$) que apresentou maior perda de nitrogênio através da urina. No experimento 2, os grupos experimentais MAB 10, MAB 30 e MAB 50 apresentaram semelhança estatística entre si porém diferiram do grupo C_2 ($p < 0,05$), sendo que o grupo MAB 30 apresentou maior teor de nitrogênio urinário. Sendo o nitrogênio urinário total proveniente principalmente da ingesta protéica e, em menor quantidade, do metabolismo corporal, eram esperados estes resultados já que um dos compostos nitrogenados principais da dieta foi a uréia presente no MAB.

O nitrogênio fecal dos grupos do experimento 1, foi quantitativamente maior no grupo MAB 5 durante este período, seguido pelos grupos MAB 3 e MAB 1, embora tais valores não tenham apresentado diferença estatística significativa entre si, mas com relação ao grupo C_1 . No segundo experimento, os valores do nitrogênio fecal dos grupos C_2 e MAB 10 não diferiram, embora o grupo MAB 50 não tenha diferido significativamente do MAB 10 e sim do grupo C_2 . Já o grupo MAB 30 apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com relação a todos e também apresentou o maior valor de nitrogênio fecal.

De acordo com a literatura as proteínas ingeridas através dos alimentos não são completamente absorvidas no intestino delgado, porém na parte do intestino grosso (ceco) são “quebradas” por bactérias produzindo

como resultado final amônia que será incorporada ao organismo através de difusão não iônica. Já a uréia passa para o íleo por difusão, e pelo ceco onde será degradada por bactérias ou ureases da mucosa. Aproximadamente um terço da uréia corporal é “quebrada” no intestino diariamente (WATERLOW *et all.* 1981). De acordo com os resultados anteriores observa-se que parte do componente nitrogenado na forma de uréia/amônia das dietas, cuja maior participação protéica foi do MAB (MAB 5, MAB 30 E MAB 50), não foi totalmente absorvido pelo organismo animal sendo uma pequena quantidade excretada através das fezes, representando apenas 2,8% para o grupo MAB 1, 3,15% para o grupo MAB 3 e 3,4% para o grupo MAB 5 do nitrogênio total ingerido. E no segundo experimento estes resultados representam apenas 0,4% para o grupo MAB 10, 0,66% para o grupo MAB 30 e 0,7% para o grupo MAB 50 do nitrogênio total ingerido.

De acordo com JORDÃO JÚNIOR *et all.* (1992) o resultado do balanço de nitrogênio pode ser indicativo da situação fisiológica em que se encontra o indivíduo. Resultados positivos ($BN \geq 2$) podem representar situações de anabolismo, crescimento e/ou alta ingestão protéica; um balanço neutro ($BN \pm 1$) indicaria uma situação em que o anabolismo é semelhante ao catabolismo e a ingestão protéica está muito semelhante à excreção urinária; e o balanço negativo ($BN \leq 2$) ocorreria na presença de um processo de catabolismo, perdas excessivas de nitrogênio e/ou uma ingestão insignificante de proteínas.

Tanto no primeiro como no segundo ensaio, o melhor balanço de nitrogênio foi proporcionado pelas dietas C₁ e C₂. Os grupos C₁ e

MAB 1 não apresentaram diferenças estatísticas entre si, mas foram diferentes dos grupos MAB 3 e MAB 5. No experimento 2, todos os grupos apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) com relação ao grupo C₂. Observa-se que os valores de nitrogênio retido apresentados pelos animais, em ambos experimentos, eram positivos porém quantitativamente decrescentes com relação aos valores encontrados para os grupos C₁ e C₂, contudo não ocorreu balanço de nitrogênio negativo, mesmo quando a substituição parcial da fonte protéica proveniente da caseína foi de 50% com relação ao produto MAB.

Digestibilidade aparente, valor biológico aparente e utilização líquida da proteína. Os valores médios referentes à digestibilidade aparente (Da), valor biológico aparente (VBa) e utilização líquida da proteína (NPU) das dietas experimentais apresentam-se na Tabela 12. Os valores de Da encontrados no primeiro ensaio, apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com relação ao grupo C₁ que, por sua vez, apresentou o maior valor. Pode ser observado ainda que não houve diferença percentual entre os grupos MAB 3 e MAB 5. No segundo experimento, apesar da semelhança entre a magnitude dos resultados, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos MAB 30 e MAB 50, em relação aos grupos C₂ e MAB 10. Comparando estes resultados observa-se que a combinação das fontes nitrogenadas nas diferentes proporções, em ambos experimentos, foi bem digerida e absorvida.

Os resultados de VBa obtidos no ensaio experimental 1 não apresentaram diferença estatística significativa entre as dietas C₁, MAB1 e MAB 3. A dieta MAB 5 obteve o menor valor nutritivo referente à mistura

TABELA 12. Digestibilidade aparente (Da), valor biológico aparente (VBa) e utilização líquida da proteína (NPU), obtidos em sete dias de balanço nitrogenado.

Tratamentos	Da %	VBa %	NPU %
C ₁	98,17 ± 0,31 a	86 ± 5 a	85 ± 5 a
MAB 1	97,15 ± 0,61 b	86 ± 5 a	83 ± 5 a
MAB 3	96,70 ± 0,97 b	80 ± 6 ab	78 ± 6 ab
MAB 5	96,54 ± 0,84 b	74 ± 11 b	71 ± 11 b
C ₂	99,60 ± 0,05 a	74 ± 6 a	74 ± 6 a
MAB 10	99,55 ± 0,10 a	55 ± 17 b	55 ± 17 b
MAB 30	99,27 ± 0,17 b	40 ± 19 b	40 ± 19 b
MAB 50	99,31 ± 0,15 b	52 ± 16 b	52 ± 16 b

Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 8). Médias seguidas por letras diferentes na vertical indicam diferença estatística (p < 0,05).

Exp. 1: C₁: controle (caseína); **MAB 1:** 1% do teor protéico do produto MAB e 99% de caseína; **MAB 3:** 3% do teor protéico do produto MAB e 97% de caseína; **MAB 5:** 5% do teor protéico do produto MAB e 95% de caseína.

Exp. 2: C₂: controle (caseína); **MAB 10:** 10% do teor protéico do produto MAB e 90% de caseína; **MAB 30:** 30% do teor protéico do produto MAB e 70% de caseína; **MAB 50:** 50% do teor protéico do produto MAB e 50% de caseína.

protéica utilizada, conseqüentemente diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das dietas C_1 e MAB1. No segundo ensaio observa-se que as dietas MAB 10, MAB 30 e MAB 50 não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si, porém divergiram do grupo C_2 ($p < 0,05$). Embora a dieta MAB 30 foi a que apresentou menor valor biológico aparente, devido ao seu baixo consumo de dieta e conseqüentemente baixo nitrogênio absorvido e retido no organismo.

Se compararmos os resultados entre os experimentos 1 e 2 verificamos que o valor nutritivo da mistura protéica diminui a medida que aumenta a participação do produto MAB com relação à caseína, ou seja, apesar do produto sintético possuir uma porcentagem de proteína semelhante à caseína, ou seja 86,8%, esse resultado não expressou um valor nutritivo verdadeiro, visto que o mesmo também possui um teor elevado de nitrogênio não protéico na forma de uréia.

Os valores da utilização líquida da proteína (NPU) expressaram resultados semelhantes ao valor biológico aparente (VBA) encontrados nas dietas do primeiro e do segundo ensaio experimental. De acordo com esses valores, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos C_1 , MAB 1 e MAB 3. Porém a dieta MAB 5 promoveu o menor índice de NPU e também diferiu estatisticamente das dietas C_1 e MAB 1. No segundo ensaio verifica-se que as dietas MAB 10, MAB 30 e MAB 50 não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si, porém divergiram do grupo C_2 ($p < 0,05$). A dieta MAB 30 foi a que apresentou menor valor de NPU. Comparando estes resultados, observa-se que a relação nitrogênio retido

no organismo e o nitrogênio ingerido, ou seja o NPU, diminuía a medida que aumentava a participação protéica do MAB na dieta.

Segundo DE ANGELIS (1995) para fixar 1 kcal de proteína, o organismo gasta aproximadamente 6 kcal de qualquer origem energética; nos casos em que a relação proteína/calorias totais da dieta aumenta, grande parte da proteína ingerida é utilizada para fornecer energia para a própria fixação de nova proteína, baixando desta maneira a eficiência. Porém neste estudo um possível fator que interferiu no NPU não foi uma alta porcentagem de proteína, já que todas as dietas continham 10% em sua formulação, e sim o tipo de nitrogênio da dieta assimilado pelo organismo.

Curva de crescimento. A Figura 5 mostra as curvas de crescimento dos animais do ensaio biológico 1 e 2 sacrificados após trinta dias de experimento com a idade de 51 dias, que receberam dietas contendo níveis de 1 a 50% da fração protéica MAB com relação à caseína.

Verifica-se que no primeiro ensaio a média aritmética de crescimento dos grupos MAB 1, MAB 3 e MAB 5 acompanhou a curva apresentada pelo grupo C₁. Durante este período observou-se que as dietas MAB 1 e MAB 5 proporcionaram um crescimento de 202 e 199 g respectivamente. As dietas C₁ e MAB 3 propiciaram um crescimento um pouco inferior com relação aqueles dois grupos, ou seja, 191 e 187 g.

No segundo experimento observa-se claramente que a curva de crescimento do grupo C₂ foi maior com relação aos grupos MAB 10, MAB 30 e MAB 50, embora estes não tenham apresentado perda de peso

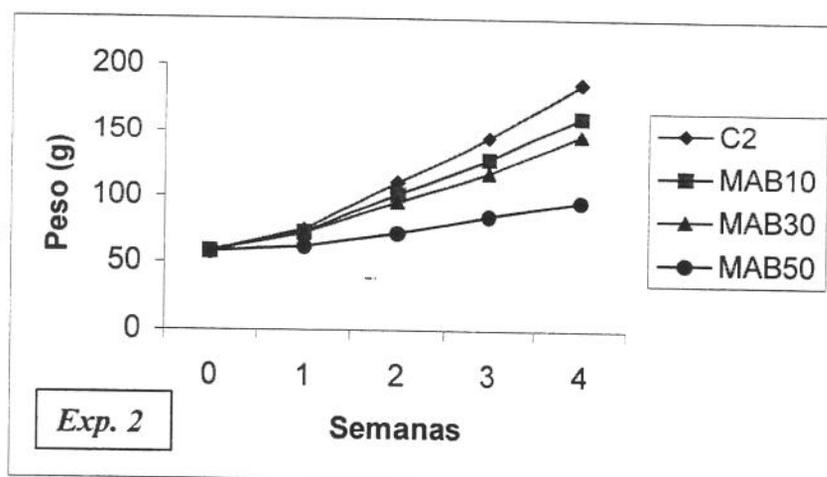
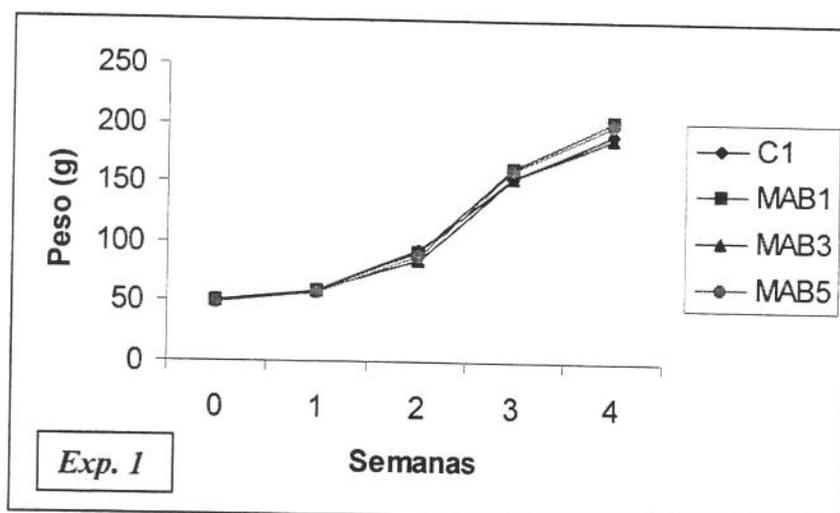


FIGURA 5. Evolução da curva de crescimento nos experimento 1: **C₁** (controle); **MAB 1** (1% MAB e 99% caseína); **MAB 3** (3% MAB e 97% caseína); **MAB 5** (5% MAB e 95% caseína) e experimento 2: **C₂** (controle); **MAB 10** (10% MAB e 90% caseína); **MAB 30** (30% MAB e 70% caseína); **MAB 50** (50% MAB e 50% caseína) durante vinte e oito dias de ensaio biológico experimental.

durante todo o período experimental, mas sim um ganho de peso menor com relação ao grupo controle. Assim sendo, a substituição quantitativa maior da fonte protéica provinda da caseína com relação ao produto MAB interferiu nitidamente no crescimento dos animais. Observa-se que a diferenciação de crescimento foi significativa desde a primeira semana mantendo-se constante até o final do período.

Ganho de peso, consumo de dieta e quociente de eficiência alimentar. Na Tabela 13 encontram-se os valores médios de ganho de peso (GP), consumo de dieta (CP) e quociente de eficiência alimentar (QEA) dos ratos do ensaio biológico 1 e 2, que receberam as dietas experimentais durante 28 dias.

Observa-se não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos do primeiro ensaio para o GP. Como foi mencionado anteriormente, os grupos MAB 1 e MAB 5 apresentaram maiores médias, ou seja 152 e 149 g, com relação aos grupos C₁ e MAB 3, cujos ganhos de peso final foram 141 e 137 g respectivamente. No segundo experimento nota-se que o GP dos animais dos grupos MAB 10, MAB 30 e MAB 50 foi quantitativamente decrescente com relação a média aritmética do grupo controle. Sendo que o grupo MAB 50 apresentou o menor ganho de peso com relação a todos os demais.

Os valores médios de CD não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos C1 e MAB 1, porém foram diferentes ($p < 0,05$) dos grupos MAB 3 e MAB 5, o que condiz com os resultados obtidos de GP para estes mesmos grupos. Já os valores médios encontrados para os

TABELA 13. Ganho de peso (GP), consumo de dieta (CD) e quociente de eficiência alimentar (QEA) obtidos em vinte e oito dias de ensaio biológico experimental.

Tratamentos	GP (g)	CD (g)	QEA
C ₁	141 ± 27 a	563 ± 60 a	0,25 ± 0,03 a
MAB 1	152 ± 9 a	601 ± 55 a	0,25 ± 0,01 a
MAB 3	137 ± 11 a	330 ± 22 b	0,42 ± 0,06 b
MAB 5	149 ± 13 a	511 ± 55 b	0,29 ± 0,04 a
C ₂	112 ± 14 a	481 ± 52 a	0,23 ± 0,01 a
MAB 10	103 ± 11 a	416 ± 60 ab	0,25 ± 0,04 a
MAB 30	89 ± 16 b	385 ± 90 b	0,23 ± 0,04 a
MAB 50	38 ± 13 c	307 ± 56 c	0,12 ± 0,03 b

Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 8). Médias seguidas por letras diferentes na vertical indicam diferença estatística (p < 0,05).

Exp. 1: C₁: controle (caseína); **MAB 1:** 1% do teor protéico do produto MAB e 99% de caseína; **MAB 3:** 3% do teor protéico do produto MAB e 97% de caseína; **MAB 5:** 5% do teor protéico do produto MAB e 95% de caseína.

Exp. 2: C₂: controle (caseína); **MAB 10:** 10% do teor protéico do produto MAB e 90% de caseína; **MAB 30:** 30% do teor protéico do produto MAB e 70% de caseína; **MAB 50:** 50% do teor protéico do produto MAB e 50% de caseína.

grupos MAB 30 e MAB 50 apresentam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) com relação aos grupos C₂ e MAB 10. Observa-se também que a medida que se aumentava a fração protéica do produto MAB com relação à caseína menor era o consumo alimentar dos animais, como foi observado inicialmente na Tabela 9.

Sabe-se que a quantidade e a qualidade do alimento ingerido podem promover alterações significativas no crescimento do animal. Assim sendo, procura-se eliminar este fator interferente medindo-se o consumo de alimento, bem como de proteína, relacionando estas variáveis com o aumento de peso. Esta relação constitui o índice de quociente de eficiência alimentar (QEA) (FARIA-OLIVEIRA *et al.* 1989).

Os valores médios encontrados para QEA não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos C₁, MAB 1 e MAB 5, porém diferiram do grupo MAB 3 ($p < 0,05$), o qual teve um ganho de peso menor por grama de ração de dieta ingerida, já que consumiu 58% menos de dieta com relação ao grupo controle, contudo atingiu o valor máximo de utilização desta para crescimento, o que sugeriu que algum outro fator reprimiu a ingestão alimentar. No segundo experimento somente o grupo MAB 50 apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com relação aos demais grupos e a menor média aritmética também. Esses resultados demonstraram que as formulações que substituíram até 30% da fonte protéica da caseína pelo produto sintético MAB foram capazes de promover um ganho de peso semelhante ao grupo controle por grama de dieta consumida durante o período de vinte e oito dias.

Quociente de eficiência líquida da proteína e quociente de eficiência protéica. A Tabela 14 mostra os valores de ganho de peso (GP), consumo de proteína (CP), quociente de eficiência líquida da proteína (NPR) e quociente de eficiência protéica (PER).

Os valores encontrados para CP pelo tratamento MAB 3 apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com relação aos grupos C₁, MAB 1 e MAB 5. O tratamento MAB 1 apresentou maior média aritmética e o tratamento MAB 3, o menor valor. No segundo experimento todos os grupos divergiram estatisticamente ($p < 0,05$) com relação ao grupo C₂, o qual apresentou maior valor médio. O tratamento MAB 50 apresentou menor consumo de proteína durante todo o período experimental.

Os resultados médios de NPR obtidos no primeiro ensaio não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si ($p > 0,05$). No segundo experimento observa-se que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos C₂ e MAB 30, sendo que este não diferiu estatisticamente do grupo MAB 10. Já o tratamento MAB 50 divergiu estatisticamente ($p < 0,05$) de todos os demais tratamentos por ter apresentado menor valor de NPR.

Os valores de PER obtidos pelo grupo MAB 3 diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos grupos C₁, MAB 1 e MAB 5 por ter apresentado maior média aritmética. No segundo experimento o tratamento MAB 50 foi o que diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos tratamentos C₂, MAB 10 e MAB 30, por ter apresentado menor valor.

TABELA 14. Ganho de peso (GP), consumo de proteína (CP), quociente de eficiência líquida da proteína (NPR) e quociente de eficiência protéica (PER).

Tratamentos	GP (g)	CP (g)	NPR	PER
C ₁	141 ± 27 a	56 ± 6 a	2,32 ± 0,14 a	2,50 ± 0,28 a
MAB 1	152 ± 9 a	61 ± 6 a	2,21 ± 0,13 a	2,52 ± 0,14 a
MAB 3	137 ± 11 a	35 ± 2 b	2,03 ± 0,6 a	3,94 ± 0,53 b
MAB 5	149 ± 13 a	54 ± 6 a	2,21 ± 0,39 a	2,81 ± 0,39 a
C ₂	112 ± 14 a	50 ± 5 a	2,30 ± 0,21 a	2,25 ± 0,09 a
MAB 10	103 ± 11 a	42 ± 6 b	1,95 ± 0,12 b	2,51 ± 0,43 a
MAB 30	89 ± 16 b	41 ± 9 b	1,66 ± 0,32 ab	2,23 ± 0,38 a
MAB 50	38 ± 13 c	31 ± 6 c	1,13 ± 0,29 c	1,20 ± 0,25 b

Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 8). Médias seguidas por letras diferentes na vertical indicam diferença estatística (p < 0,05).

Exp. 1: C₁: controle (caseína); MAB 1: 1% do teor protéico do produto MAB e 99% de caseína; MAB 3: 3% do teor protéico do produto MAB e 97% de caseína; MAB 5: 5% do teor protéico do produto MAB e 95% de caseína.

Exp. 2: C₂: controle (caseína); MAB 10: 10% do teor protéico do produto MAB e 90% de caseína; MAB 30: 30% do teor protéico do produto MAB e 70% de caseína; MAB 50: 50% do teor protéico do produto MAB e 50% de caseína.

Segundo DE ANGELIS (1995) o PER representa o crescimento em função da proteína ingerida, sendo muito baixo para teores protéicos insuficientes, atingindo valores máximos ao redor de 10% de proteína, e decrescendo com maiores aumentos de P%; já para o NPR, o comportamento é diferente, pois para toda proteína ingerida em teores baixos é maximamente utilizada, não para o crescimento para o que os níveis são efetivamente insuficientes, mas pelo menos, para minimizar as perdas basais. Quanto ao peso corporal, a autora ainda menciona que mesmo com PER menor, aumento do teor protéico acima de 10% favorece ainda maior aumento de peso, até teores da ordem de cerca 20 a 25%, acima dos quais novo incremento da proteína se torna prejudicial. Ou seja, a melhor utilização da proteína (em % da ingerida) ocorre ao redor de 10%, mas as condições “padrão” do animal ocorrem ao redor de 20 a 25%.

Embora este índice nutricional seja pouco sensível (TAGLE 1981), os valores apresentados de GP por grama de CP foram bastante semelhantes aos encontrados nos grupos controles, isso indicou a mistura da fonte protéica, MAB/caseína, oferecida nas dietas com até 30% do produto sintético, foi eficiente para promover crescimento nos animais.

Influência do uso da mistura protéica MAB/caseína nas análises sorológicas bioquímicas de ratos Wistars.

Na Tabela 15 estão apresentados os valores de albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina dosados no soro dos ratos Wistars de 51 dias de idade, sacrificados após trinta dias de experimento. Para estas

determinações estabeleceu-se como parâmetros nutricionais ideais os valores obtidos pelo grupo controle (C) e de desnutrição os do grupo aprotéico (A).

Albumina sérica. De acordo com WAITZBERG (1990) a redução na síntese de albumina associada ao jejum é um dos mecanismos iniciais de adaptação à ingestão diminuída de alimentos nitrogenados e ocorre mesmo na presença de proteólise que supre aminoácidos essenciais para a síntese da albumina. A confiabilidade nos índices de albumina sérica é menor nos casos de déficit de fluido extracelular e estado de desidratação. Outros fatores relacionados com a diminuição deste índice bioquímico são insuficiência de atividade de órgãos específicos, particularmente doenças hepáticas ou renal grave e insuficiência cardíaca congestiva ou na vigência de administração de albumina exógena.

De acordo com os resultados de albumina sérica verifica-se que dentre os grupos experimentais que receberam a mistura protéica, somente o MAB 50 apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Em geral os valores médios de albumina encontrados nos grupos experimentais apresentaram índices semelhantes ao grupo controle, ou seja não acusaram desnutrição protéico-visceral. Segundo DICHI & BURINI (1992) albuminemia menor que 3,5g/dl sugere início de desnutrição e 2,5g/dl indicam o desenvolvimento de edema como índices de avaliação do metabolismo protéico em humanos.

Proteínas totais. Embora a dosagem isolada da proteína total tenha pouco significado clínico, porque a alteração em uma das frações pode ser compensada por alteração oposta de outra fração, como ocorre nas

TABELA 15. Níveis sanguíneos de albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina dosados no soro dos ratos Wistars sacrificados após 30 dias de experimento.

Tratamentos	Albuminas (g/dl)	Proteínas totais (g/dl)	Fosfatase alcalina (U/l)
C	5 ± 0,6 a	6 ± 1 a	75 ± 11 a
MAB 1	5 ± 1 a	6 ± 1 a	70 ± 14 a
MAB 3	5 ± 0,4 a	7 ± 0,5 a	70 ± 26 a
MAB 5	5 ± 0,5 a	4 ± 0,4 a	65 ± 16 ab
MAB 10	5 ± 1 a	7 ± 2 a	82 ± 5 a
MAB 30	4 ± 0,8 a	7 ± 1 a	70 ± 17 a
MAB 50	3 ± 0,5 b	6 ± 0,6 a	89 ± 13 ab
A	1,2 ± 0,04c	1,3 ± 0,5 c	54 ± 3 c

Valores expressos como média ± desvio padrão (C, MAB1 a MAB30 n=6). Médias seguidas por letras diferentes na vertical indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

C: controle (caseína); **MAB 1**: 1% do teor protéico do produto MAB e 99% de caseína; **MAB 3**: 3% do teor protéico do produto MAB e 97% de caseína; **MAB 5**: 5% do teor protéico do produto MAB e 95% de caseína. **MAB 10**: 10% do teor protéico do produto MAB e 90% de caseína; **MAB 30**: 30% do teor protéico do produto MAB e 70% de caseína; **MAB 50**: (n=5) 50% do teor protéico do produto MAB e 50% de caseína e **A** aprotéico (n=3).

doenças crônicas, em que há diminuição de albumina com aumento de gamaglobulina, este índice bioquímico serve de indicativo para perda de massa protéica visceral. Índices de proteínas totais elevados podem ser encontrados nas seguintes doenças: mieloma múltiplo, macroglobulinemia, artrite reumatóide, sarcoidose entre outras. Níveis baixos de proteínas totais são observados na hiperhidratação, desnutrição grave, nefrose, insuficiência renal e síndrome de mal absorção (WAITZBERG, 1990).

De acordo com os resultados obtidos não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais com relação ao grupo controle. Observa-se que o grupo MAB 5 apresentou a menor média aritmética depois do grupo aprotéico, porém em geral a maioria dos resultados foram semelhantes ao grupo controle.

Fosfatase alcalina. Segundo FARIA-OLIVEIRA *et al.* (1989) a fosfatase alcalina é uma enzima ubíqua, estando presente em quase todos os tecidos e ocorre com grande atividade, essencialmente nas membranas celulares e órgãos que tem alta capacidade absorptiva e excretória. É uma enzima que catalisa a transferência de grupo fosfato entre um doador e um aceptor; facilita a transferência de metabólitos, tais como lipídeos, proteínas e carboidratos através da membrana celular; participa no processo de calcificação óssea dentre outras funções. Seu aumento de atividade no soro pode estar relacionado com inúmeras desordens, como: doenças ósseas caracterizadas pelo aumento da atividade osteoblástica como ostite deformante, raquitismo, osteomalácia, hiperparatireoidismo, metastase óssea e sarcoma osteogênico, desordens endócrinas e doenças cardíacas dentre outras. Sua atividade pode diminuir em consequência de drogas, má absorção,

desnutrição, com a idade e com a deficiência de zinco. É também observada em doenças obstrutivas da árvore biliar, metastases hepáticas, doenças granulomatosas, cirrose hepática e hepatite aguda viral.

De acordo com os resultados obtidos, não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais com relação ao grupo controle. Observou-se contudo que os grupos MAB 5 e MAB 50 apresentaram divergências estatísticas ao nível de 5% de significância. Dentre os resultados, o grupo MAB 50 apresentou maior média aritmética e o grupo MAB 5 o menor valor, depois do grupo aprotéico.

Por insuficiência de amostras de soro colhidas após o sacrifício dos animais, não foi possível quantificar outros índices bioquímicos nutricionais como uréia, creatinina e algumas enzimas hepáticas.

Influência do uso da mistura protéica MAB/caseína no tamanho das vilosidades intestinais de ratos Wistars

Na Tabela 16 encontram-se os valores médios obtidos das medidas em triplicatas das vilosidades e cristas intestinais (porção intestinal jejuno-íleo), dos animais com 51 dias de idade, sacrificados após trinta dias de experimento, que participaram do segundo ensaio biológico.

De acordo com os resultados obtidos, o tamanho das vilosidades do grupo MAB 10 não diferiu estatisticamente do grupo C₂, e os grupos MAB 30 e MAB 50 não apresentaram diferenças estatísticas entre si contudo divergiram estatisticamente ($p < 0,05$) com relação ao grupo controle.

TABELA 16. Tamanho das vilosidades e cristas ílicas (μm) do intestino delgado (porção jejuno/íleo) dos animais de 51 dias de idade, que participaram do ensaio biológico 2 sacrificados após vinte e oito dias.

Tratamentos	Vilosidades ílicas (μm)	Cristas ílicas (μm)
C₂	879 \pm 235 a	235 \pm 27 a
MAB 10	846 \pm 57 ac	225 \pm 38 a
MAB 30	773 \pm 122 bc	165 \pm 79 b
MAB 50	795 \pm 48 c	235 \pm 33 a

Valores obtidos de triplicatas (C₂, n= 1; MAB 10, n= 2; MAB 30, n=2; MAB 50, n=2) expressos como média \pm desvio padrão.

Médias seguidas por letras diferentes na vertical indicam diferença estatística ($p < 0,05$). **C₂**: controle (caseína); **MAB 10**: 10% do teor protéico do produto MAB e 90% de caseína; **MAB 30**: 30% do teor protéico do produto MAB e 70% de caseína; **MAB 50**: 50% do teor protéico do produto MAB e 50% de caseína.

Para os valores encontrados no tamanho das cristas ilíacas, observa-se que somente o grupo MAB 30 apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com relação ao grupo C₂.

Apesar destes resultados terem apresentado diferenças entre si, tanto nas médias aritméticas como na análise estatística possivelmente devido ao manuseio e preparação das lâminas, as análises microscópicas dos tecidos não indicaram qualquer processo degenerativo da parede intestinal interna.

CONCLUSÕES

Perante os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir:

1. O produto MAB estudado, de consistência líquida viscosa, possui alta solubilidade em água, baixa solubilidade em solventes orgânicos, elevado teor de nitrogênio, baixo teor de voláteis e um teor de umidade de 28,4%, o qual não foi possível determinar gravimetricamente por encontrar-se fortemente associado aos solutos. Não houve evidência da existência de peptídeos de alto peso molecular na sua composição.
2. Apesar do alto teor de nitrogênio, o conteúdo aminoacídico do MAB foi modesto, sendo a uréia um dos seus principais componentes, com 22% (p/p). O perfil aminoacídico encontrado no produto não é satisfatório como fonte única de nitrogênio para seres superiores por não atender aos requerimentos nutricionais gerais (padrão da FAO/WHO/UNU, 1985). Embora tenha apresentado quantidades expressivas de tirosina, treonina, fenilalanina e ácido aspártico, com relação às fontes naturais conhecidas.
3. A substituição parcial da caseína da dieta para o rato pelo MAB em diferentes porcentagens (de 1 a 50% do nitrogênio total), alterou significativamente o perfil de aminoácidos das dietas experimentais, impedindo o crescimento em velocidade máxima nas duas dosagens maiores ou seja nas dietas MAB 30 e MAB 50.
4. Os resultados do balanço de nitrogênio (BN), embora menores para as dietas experimentais, foram encorajadores no sentido de que nenhum grupo

entrou em balanço de nitrogênio negativo, demonstrando que a substituição parcial de proteínas de alto valor biológico pelo MAB não desencadeou um processo de desnutrição nos animais. Para todas as formulações experimentais apresentaram alta digestibilidade aparente (Da), ou seja valores acima de 96%. As dietas com até 5% do produto sintético proporcionaram valores biológicos aparentes (VBa), utilização líquida da proteína (NPU) e quociente de eficiência líquida da proteína (NPR) surpreendentemente satisfatórios.

5. Nas formulações MAB 10, MAB 30 e MAB 50 tais índices nutricionais apresentavam uma queda percentual aproximada entre 15 e 26%, com relação à formulação controle (caseína). Para surpresa nossa, todas as formulações, com exceção do MAB 50, apresentaram quocientes de eficiência protéica (PER) semelhantes ou superiores aos dos grupos controle.
6. As análises microscópicas do intestino delgado (porção jejum/íleo) dos grupos que receberam teores de MAB acima de 10% da fração nitrogenada, não indicaram nenhum processo degenerativo na parede interna do intestino, após trinta dias de alimentação.
7. Os resultados sugerem a possibilidade de uso do produto MAB como complemento da fração protéica até 5% de substituição, pelo menos em rações para animais não ruminantes. Se esta possibilidade for comprovada para proteínas de menor valor biológico, as vantagens seriam de considerável significância estratégica em termos de segurança alimentar, pois a obtenção do MAB não depende da intermediação biológicas.

SUGESTÕES PARA PESQUISA FUTURAS

Existe um vasto campo de pesquisa para este tipo de produto, quer sobre o aspecto químico-composicional, quer sobre as suas propriedades biológicas.

1. A respeito da sua composição, seria de grande importância determinar a possível presença de formas quirais dos aminoácidos.
2. Importante também seria caracterizar os peptídeos existentes, quanto às suas estruturas primárias.
3. Num contexto mais amplo, seria de interesse para a indústria avaliar a possibilidade de empobrecer o liquor-mãe em uréia, para obter dois produtos diferenciados.
4. Com relação às propriedades biológicas do produto bruto ou um outro de teor de uréia reduzido, podem ser repetidos os ensaios aqui apresentados, mas aprofundando o estudo da substituição, inclusive fazendo comparação destes resultados com dietas experimentais nas quais houvesse diminuição do teor de caseína porém sem utilizar como complemento protéico o MAB.
5. Ainda, com relação às propriedades biológicas, caberia desenvolver estudos onde a substituição é feita de proteínas de menor valor biológico que a caseína; isto é, de proteínas que possuem relações de aminoácidos essenciais para totais (AAE/AAT) menores do que a da caseína.

Referências Bibliográficas

- A.O.A.C. (1984) *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 12 ed. Washington, DC. A.O.A.C., 805p.
- AMAYA - FARFAN, J. (1994) *Química de proteínas aplicada à Ciência e Tecnologia dos Alimentos*. 2ª ed. Editora da UNICAMP, Campinas-SP, pp.17-46.
- BENDER, A. E.; LÖFQVIST, B.; KIHBERG, R.; MUNK, L. (1968) *Evaluation of novel protein products*. Pergamon Press, New York, pp. 3-149.
- CABALLERO, C. G. M. *Levedura de cervejaria (*Saccharomyces* sp.): composição, valor protéico e avaliação de toxicidade subcrônica em células íntegras, células mecanicamente rompidas e concentrado protéico*. Campinas, 1997. Pp. 16-109. Tese (doutor em Ciências da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- DE ANGELIS, R. C. (1995) Valor nutricional das proteínas métodos de avaliação. *Cadernos de nutrição da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (SBAN)*. 10:29.
- DESCHEPPER, K. & GROOTE, G. (1995) Effect of dietary protein, essential and non-essential amino acids on the performance and carcass composition of male broiler chickens. *British Poultry Science*, 36 (2) 229-45.
- DICHI, J. B & BURINI, R. C. (1992) Avaliação do metabolismo protéico em humanos. *Cadernos de nutrição da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (SBAN)*. 5:18-35.
- DUARTE, R. M. T. *Obtenção de frações protéicas de sangue bovino: composição valor nutricional e propriedades funcionais*. Campinas, 1997. Pp. 91. Tese (mestre em Ciências da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- DYER, J. R. (1965) *Applications of absorption spectroscopy of organics compounds*. Prentice-Hall, Inc. & Englewood Cliffs, N. J., Atlanta Georgia, pp. 4-57.
- FARIA-OLIVEIRA, O. M. M.; BELDA, M. C. R.; SHINOHARA, L. N. (1989) Resposta da atividade enzimática hepática e cerebral em função de diferentes níveis de restrição alimentar: I- fosfatase alcalina e amilase. *Revista de alimentos e nutrição da Universidade Estadual Paulista (UNESP)*.1:87-108.
- FIESER, M. & FREDERICK, L. (1961). *Advances organic chemistry*. New York.
- FOX, S.W. (1964) Thermal polymerization of amino acids and production of formed microparticles on lava. *Nature*, 25: 336-7.
- FOX, S.W. (1965) A theory of macromolecular and cellular origins. *Nature*, 23: 328-40.
- GUERRA, J. & AMAYA-FARFAN, J. (1995) Accelerated biotransformation of sugar-cane bagasse into high-quality organic fertilizer with potentiated *Lactobacillus acidophilus*. *The fourth brazilian symposium on the chemistry of lignins and other wood components*. Recife-PE, 5: 50.
- HARADA, K. & FOX, S.W. (1964) Thermal synthesis of natural amino acids form a postulated primitive terrestrial atmosphere. *Nature*, 25: 335-7.
- HAYASE, K.; YOKOGOSHI, H.; YOSHIDA, A. (1980) Effect of dietary proteins and amino acid deficiencies on urinary excretion of nitrogen and the urea synthesizing system in rats. *Journal of nutrition*, 110: 1327-1337.
- ITOH, H.; KISHI T.; CHIBATA, I. (1973) Comparative effects of casein and amino acid mixture simulating casein on growth and food intake in rats. *Journal of nutrition*, 103: 1709-1715.
- ITOH, H.; KISHI T.; CHIBATA, I. (1974) Effect of casein and a corresponding amino acid mixture on rat repletion after protein depletion. *Journal of nutrition science vitaminalogy*, 20: 401-406.

- Nutrient requirement of domestic animals* (1972). 2 ed. National academy of science, Washington, pp. 56-65.
- JORDÃO JÚNIOR, A. A.; VITALI L. H.; TOCCHINI H. A.; DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. (1992) Excreção urinária de nitrogênio total, creatinina e uréia na avaliação nutricional. *Cadernos de nutrição da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (SBAN)*. 5:1-17.
- LEE, D. H.; GRANJA, J. R.; MARTINEZ, J. A.; SEVERIN K.; GHADIRI, M. R. (1996). A self-replicating peptide. *Nature*, 382: 525-28.
- PELLET, P. L. & YOUNG, V. R. (1980) *Nutritional evaluation of protein foods*. Report of a working group sponsored by The International Union of Nutritional Science and United Nations University World Hunger Programs. Tokyo, The United Nations University, 153p.
- PENG, Y. S. (1979) Studies on the severity of various amino acids imbalances in the young male rats. *Journal of nutrition*, 109:1916-1924.
- PYKE, M. (1970) *Synthetic food*. John Murray, London, pp. 7-23.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. (1993) 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-76 A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123: 1939-51.
- ROGERS, Q. R. & HARPER, A. E. (1966) Protein digestion: nutritional and metabolic consideration. *World review of nutrition and dietetics*. S. Karger, New York, 6: 250-91.
- ROSE, W.C. & WIXON, R.L. (1955) The amino acid requirements of man. XVI. The role of the nitrogen intake. *Journal of Biological Chemistry*, 217: 997-1004.
- ROSENFELD, L. (1982) *Origins of clinical chemistry - the evolution of protein analysis*. Academic Press, New York, pp. 47-64.

- SGARBIERI, V. C. (1987) *Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento*. Editoras Unicamp-Almed, Campinas - São Paulo, pp. 250-61, 330-35.
- SGARBIERI, V. C. (1996) *Proteínas em alimentos protéicos – propriedades, degradações e modificações*. Livraria Varela, São Paulo – São Paulo, pp. 9-257.
- SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Cereal Chemistry*, 30 (7): 1190-1206.
- TACKMAN, J. M.; TEWS, J. K.; HARPER, A. E. (1989) Dietary disproportions of amino acids in the rat: effects on food intake, plasma and brain amino acids and brain serotonin. *Journal of Nutrition*, 120: 521-533.
- TAGLE, M. A. (1981) *Nutrição*. Editora Artes Médicas, São Paulo – São Paulo, pp. 49-109.
- VENERO J. L.; HERRERA A. J.; MACHADO A.; CANO J. (1992) Changes in neurotransmitter levels associated with the deficiency of some essential amino acids in the diet. *British journal of nutrition*; 68;2, 409-20.
- WAITZBERG, D. L. (1990) *Nutrição enteral e parenteral na prática clínica*. Livraria Atheneu Editora, São Paulo – São Paulo, pp. 133-135.
- WATERLOW, J.C. & STEPHEN, J. M. L. (1981). *Nitrogen metabolism in man*. Applied science publishers. London & New Jersey, pp. 1-17, 97, 169-202.
- WILLIAMS, P. C. (1973) The use of titanium dioxide as a catalyst for large scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. *Journal of Science and Food Agricultural*, 24: 343-48.