

CHRISTIANO VIEIRA PIRES

OTIMIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE *in vitro* PARA A SUBSTITUIÇÃO DA DIGESTIBILIDADE *in vivo* no CÁLCULO DO ESCORE QUÍMICO CORRIGIDO PELA DIGESTIBILIDADE PROTÉICA – PDCAAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

CHRISTIANO VIEIRA PIRES

OTIMIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE *in vitro* PARA A SUBSTITUIÇÃO DA DIGESTIBILIDADE *in vivo* no CÁLCULO DO ESCORE QUÍMICO CORRIGIDO PELA DIGESTIBILIDADE PROTÉICA – PDCAAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 15 de junho de 2005.

Prof^a Neuza Maria Brunoro Costa
(Conselheira)

Prof. José César Rosa
(Co-Orientador)

Prof^a Geralda A. D. Rodrigues Cruz

Prof^a Márcia Regina Pereira Monteiro

Prof^a Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

Aos meus pais Israel e Maria das Graças.

Aos meus irmãos Aureliano, Aldrin, Vanessa e Cleverson.

À minha noiva Handyara.

AGRADECIMENTO

A Deus, pelo dom da vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela minha formação.

Ao BIOAGRO – Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, pela estrutura de suporte ao curso.

Ao Departamento de Nutrição e Saúde da UFV, pela disponibilização de espaço para a realização dos experimentos.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo.

À Professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança e, sobretudo, pela amizade.

À Professora Neuza Maria Brunoro Costa, pela orientação e pelas sugestões.

Ao Professor José César Rosa, pelo apoio dado para a realização da pesquisa.

Ao Professor Carlos Henrique Osório da Silva, pela orientação nas análises estatísticas.

Aos Professores Sebastião Tavares de Rezende e Maurílio Alves Moreira, pela amizade e pelos ensinamentos no longo convívio.

Ao Secretário Eduardo, pela contínua disponibilidade de ajuda.

À Inês, pelo apoio durante a realização dos experimentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Enzimologia Anderson Pilon, Luciana Xavier, Liliane, Polyanna, Angélica, Lílian, Eduardo, Andreson Fazolo e Franciny, pela amizade.

Ao estudante de iniciação científica Eduardo Mendonça, pela força e ajuda durante a realização deste trabalho.

Às estagiárias Rita Sant´ana e Hatanne, pela colaboração durante a realização desta pesquisa.

Aos meus colegas do BIOAGRO José Fausto, Aloísio, Jander, Gláucia, Naldo, Tadeu e João Paulo, pela amizade.

Aos meus amigos Renatinho e Gal, pelo convívio diário.

Aos meus amigos João de Deus, Policarpo e João Carlos, pelo convívio.

À minha noiva Handyara, por estar sempre ao meu lado.

Ao meu avô Vicente, e aos meus tios, primos e sobrinhos, pela torcida.

Aos meus pais, irmãos e cunhados, pelo apoio.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

CHRISTIANO VIEIRA PIRES, filho de Israel de Paiva Pires e Maria das Graças Vieira Pires, nasceu em 13 de setembro de 1975, na cidade de Dores do Turvo, Minas Gerais.

Em março de 1995, iniciou o curso de graduação em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concluindo-o em dezembro de 1999.

Em março de 2000, ingressou no Curso de Mestrado em Agroquímica na UFV, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae* em março de 2002, com a defesa da tese.

Em março de 2002, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Bioquímica Agrícola da UFV, submetendo-se à defesa de tese em junho de 2005.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Proteínas – Valor nutricional	4
2.2. Métodos para avaliar a qualidade protéica	6
2.2.1. Escore químico de aminoácido (EQ).....	7
2.2.2. Escore químico corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS).....	7
2.2.3. Coeficiente de eficiência protéica (PER).....	8
2.2.4. Razão protéica líquida (NPR).....	9
2.2.5. Digestibilidade	9
2.2.6. Digestibilidade <i>in vitro</i>	10
2.3. Fatores que afetam a qualidade nutricional das proteínas	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Preparo das amostras	17
3.2. Determinação do teor de proteínas.....	18
3.3. Ensaio biológico	18
3.3.1. Animais	19

	Página
3.3.2. Digestibilidade verdadeira	19
3.3.3. Coeficiente de eficácia protéica (PER).....	20
3.3.4. Razão protéica líquida (NPR).....	21
3.4. Digestibilidade <i>in vitro</i>	21
3.4.1. Método descrito por Hsu et al. (1977), com modificações (Método 1).....	21
3.4.2. Método descrito por Saterlee et al. (1979), com modificações (Método 2).....	22
3.4.3. Método descrito por Cruz (2003), com modificações (Método 3).....	23
3.4.4. Equações de digestibilidade <i>in vitro</i>	23
3.5. Determinação e quantificação dos aminoácidos.....	25
3.6. Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS)	27
3.7. Delineamento estatístico	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Teor de proteínas.....	29
4.2. Avaliação biológica das proteínas.....	29
4.3. Escore químico de aminoácidos (EQ) e escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS)...	34
4.4. Digestibilidade <i>in vitro</i>	41
4.4.1. Método da queda de pH (Métodos 1 e 2).....	41
4.4.1.1. Curvas de digestibilidade em função da queda de pH (medido a 10 min) – Método 1	41
4.4.1.2. Curvas de digestibilidade em função da queda de pH (medido a 20 min) – Método 2	46
4.4.2. Método do pH estático (Método 3)	49
4. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

RESUMO

PIRES, Christiano Vieira, D. S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2005. **Otimização de técnicas de determinação da digestibilidade *in vitro* para a substituição da digestibilidade *in vivo* no cálculo do escore químico corrigido pela digestibilidade protéica – PDCAAS.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Orientador: José César Rosa. Conselheiros: Neuza Maria Brunoro Costa, José Humberto de Queiróz e Carlos Henrique Osório da Silva.

O presente trabalho teve como objetivos determinar a digestibilidade *in vivo*, ajustar equações para a determinação da digestibilidade *in vitro* por meio de diferentes métodos e verificar qual método desenvolvido para a digestibilidade *in vitro* apresenta maior correlação com a digestibilidade *in vivo*, além de determinar o Coeficiente de Eficácia Protéica (PER), a Razão Protéica Líquida (NPR), o teor de aminoácidos, o escore químico de aminoácidos (EQ) e o escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS). Foram utilizadas as seguintes fontes de proteína: carne de rã sem osso, carne de rã com osso, carne de rã mecanicamente separada (CMS), carne bovina, ovo em pó, caseína, trigo, milho, soja convencional, soja isenta de inibidor de tripsina Kunitz e de lipoxigenases (soja KTILOX[®]), proteína texturizada de soja (PTS) e feijão. Os valores de digestibilidade *in vivo* variaram entre 71,76% (soja convencionanal) e 93,37% (rã sem osso), em que as proteínas de origem animal apresentaram maiores valores que as de origem

vegetal. Carne de rã sem osso foi a proteína com maior digestibilidade protéica de todas as proteínas estudadas. Das proteínas de origem animal, o ovo em pó foi aquela que apresentou menor digestibilidade protéica. Nenhuma das proteínas de origem animal apresentou aminoácidos essenciais limitantes quando comparadas com o padrão da FAO/WHO. Feijão, soja convencional, soja KTILOX[®] e PTS tiveram o aminoácido sulfurado (metionina) como limitante, enquanto para trigo e milho o aminoácido mais limitante foi a lisina. Soja KTILOX[®] e PTS exibiram valores de PDCAAS superiores aos da soja convencional, indicando uma possível elevação na qualidade protéica da soja melhorada geneticamente e da soja processada. Para o cálculo da digestibilidade *in vitro* foram testados dois métodos, um que usa valores de pH obtidos em 10 e 20 min após a adição da solução de enzimas e outro chamado de método do pH estático, o qual mede o volume de NaOH adicionado necessário para manter em 8,0 o valor de pH da solução de proteínas após a adição da solução enzimática. No método da queda de pH, as melhores equações foram obtidas quando se trabalhou com os valores de pH obtidos após 10 min da solução de enzimas. Dessas equações, as que tiveram maiores valores de R² foram confeccionadas sem a presença de caseína. Já no método do pH estático as equações que permitiram melhor correlação entre volumes de NaOH com digestibilidade foram aquelas nas quais se usavam todas as fontes de proteína e aquela em que não estava presente a caseína. O uso de técnicas *in vitro* para a determinação da digestibilidade protéica trará uma série de benefícios, pois requer menos tempo, ser mais barato e necessitar de menos mão-de-obra e espaço físico. Essa técnica permite que as análises sejam realizadas em um laboratório simples, necessitando apenas de um banho-maria, um pH-metro e um “freezer” para armazenamento das amostras e das enzimas, além de gastar pequena fração da fonte de proteína, ao contrário do que acontece em ensaios *in vivo*, em que é preciso muito material para o preparo das dietas. Por meio dessa técnica, evita-se também trabalhar com ratos, os quais, ao serem usados nos ensaios *in vivo*, devem ser sacrificados no final do experimento.

ABSTRACT

PIRES, Christiano Vieira, D. S., Universidade Federal de Viçosa, June 2005.
Aminoacid chemist score and digestibility *in vivo* and *in vitro* of different protein sources Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Committee Members: José César Rosa, Neuza Maria Brunoro Costa, José Humberto de Queiróz and Carlos Henrique Osório da Silva.

The objective this work was to evaluate the quality nutritional, aminoacid chemist score (EQ) and aminoacid chemist score corrected by the protein digestibility (PDCAAS) of the following protein sources: frog meat boneless, frog meat with bone, frog meat of mechanically separated (CMS), bovine meat, egg, casein, wheat, corn, conventional soybean, soybean with absence the Kunitz Trypsin and Lipoxigenases (soybean KTI-LOX-), soybean texturized protein (PTS) and bean. The animal origin proteins introduced digestibility larger values which of vegetal origin. Frog meat boneless went to the protein with larger protean digestibility of all the studied proteins. Of the animal origin proteins, the egg was that introduced smaller protein digestibility. The chemical score was determined assuming as standard the FAO/WHO values for children from 2 to 5 years old. The animal origin proteins did not show any limiting essential aminoacid. Bean, conventional soybean, soybean KTI-LOX- and PTS they had as its limiting sulfurated aminoacid (methionine). While for wheat and corn the most limiting aminoacid went to the lysine. Soybean KTI-LOX- and PTS

introduced PDCAAS values superiors which of the conventional soybean, showing a possible elevation in the protein quality of the soybean improved genetically and of the prosecuted soybean. For the calculation of the digestibility *in vitro* were tried two methods, one that uses pH values obtained in 10 and 20 minutes after the addition of the enzymes solution and the another, called method of pH static which measures NaOH necessary added volume to keep in 8,0 pH value of the proteins solution after the addition of the enzymatic solution. In the method of pH fall the best equations were obtained when it worked with pH values obtained after 10 minutes of the enzymes solution. The equations that had larger values of R^2 , they were made without the presence of casein. Already in the method of pH static the equations that allowed better correlation between NaOH volume with digestibility were those in which used all the protein sources and that in which it was not present for casein.

1. INTRODUÇÃO

Ao se fazer a recomendação de proteína para diferentes grupos populacionais (FAO/WHO, 1990), além da composição aminoacídica da alimentação, devem ser consideradas a quantidade total de nitrogênio e a digestibilidade da mistura protéica (SARWAR, 1997). Uma mistura protéica de boa qualidade ou de alto valor biológico é aquela que fornece quantidades adequadas de aminoácidos essenciais e nitrogênio total, além de boa digestibilidade.

A digestibilidade é a determinação da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos, ou de qualquer outro composto nitrogenado pelo organismo, sendo também um determinante da qualidade protéica da dieta. Quando certas ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes ou transformada em produtos do metabolismo pelos microrganismos do intestino grosso (SGARBIERI, 1987). A qualidade da proteína refere-se à sua capacidade de satisfazer os requerimentos nutricionais do homem por aminoácidos essenciais e nitrogênio não-essencial, para fins de síntese protéica. Isso pode ser avaliado pela composição aminoacídica e, também, pela digestibilidade da proteína (BLANCO; BRESSANI, 1991).

Dessa maneira, ao se determinar o valor protéico de uma mistura de alimentos devem ser levados em consideração o cômputo químico, o teor total de nitrogênio e a digestibilidade (JOINT FAO/WHO/UNU, 1985). Ao lado das

fontes de proteína animal, classicamente consideradas como de alto valor biológico, tem sido demonstrado que misturas de vegetais, como de um cereal e uma leguminosa, também resultam em misturas protéicas de alto valor biológico (DUTRA; VANNUCCHI, 1983). No Brasil, a principal fonte protéica da alimentação é derivada da ingestão de arroz e feijão (SANTOS et al., 1979). Essa mistura tem adequado teor nitrogenado, supre os aminoácidos essenciais e possui digestibilidade ao redor de 80%.

O valor nutricional de proteínas está condicionado ao seu conteúdo em aminoácidos essenciais e à sua digestibilidade. O valor nutricional determinado por meio de testes de crescimento de ratos vem sendo substituído pela análise da composição de aminoácidos de uma proteína comparada a um padrão de aminoácido-referência, obtendo-se o escore químico de aminoácidos (EQ), uma técnica química considerada rápida, consistente e barata. O EQ mede o conteúdo de aminoácidos presentes em uma fonte de proteínas, e seu valor é comparado aos com uma proteína tida como referência para crianças ente 2 e 5 anos de idade, segundo FAO/WHO (1985). O valor obtido dessa comparação é corrigido pela digestibilidade protéica, obtendo-se, então, o escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS) (SCHAAFSMA, 1994), que é a medida atualmente aceita para avaliar a qualidade de proteína. O PDCAAS é definido como a relação entre o conteúdo do primeiro aminoácido limitante na proteína (em mg/g) e o conteúdo daquele aminoácido em uma proteína de referência (mg/g) multiplicado pela digestibilidade verdadeira. O padrão de referência é a necessidade de aminoácidos essenciais para crianças ente 2 e 5 anos de idade, segundo FAO/WHO (1985).

A qualidade da proteína é baseada no aminoácido essencial limitante, em que valores maiores que 1,0, tanto para o EQ como para o PCDAAS, indicam que a proteína é de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades da dieta de humanos.

O presente trabalho teve como objetivos determinar a digestibilidade *in vivo*, ajustar equações para a determinação da digestibilidade *in vitro* por meio de diferentes métodos e verificar qual método desenvolvido para a digestibilidade *in vitro* apresenta maior correlação com a digestibilidade *in vivo*, além de determinar o Coeficiente de Eficácia Protéica (PER), a Razão Protéica

Líquida (NPR), o teor de aminoácidos, o escore químico de aminoácidos (EQ) e o escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS) de proteínas de origens animal e vegetal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Proteínas – Valor nutricional

As proteínas são nutrientes essenciais aos organismos animal e humano e, portanto, devem estar presentes na alimentação em quantidades adequadas. Além do aspecto quantitativo, deve-se levar em conta o aspecto qualitativo das proteínas, isto é, o seu valor nutricional, que dependerá de sua composição, digestibilidade, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais e ausência de toxicidade e de fatores antinutricionais (SGARBIERE, 1996).

As proteínas também são chamadas de protídeos. O termo vem do grego e significa “de primeira importância”. Assim, as proteínas foram os primeiros nutrientes a serem considerados essenciais para o organismo (BORSOI, 2001). São macromoléculas presentes em todas as células dos organismos vivos e formadas por combinações de 20 aminoácidos em diversas proporções, sendo unidos entre si por ligações peptídicas. Quanto à origem, os aminoácidos podem ser exógenos, ou seja, ingeridos pela dieta, ou endógenos, que são aqueles derivados da degradação das proteínas celulares do próprio organismo (OLIVEIRA, 1998).

As proteínas são úteis à formação dos tecidos novos do corpo e, por isso, são chamadas de alimentos de construção ou alimentos plásticos. São, portanto, indispensáveis ao crescimento e manutenção da vida, cumprindo funções estruturais, reguladoras, de defesa e de transporte dos fluidos

biológicos (LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998; BORSOI, 2001). De acordo com Oliveira et al. (1982), as proteínas funcionam como biocatalisadores, controlando processos como crescimento, digestão, absorção, transporte e metabolismo. São também importantes na manutenção da pressão osmótica do sangue e de outros fluidos e na formação de anticorpos para a defesa imunológica, funcionando, ainda, como elementos estruturais como na pele, ossos e músculos.

As melhores fontes protéicas para a alimentação humana são as de origem animal, como ovos, queijos, carnes em geral e leite. No entanto, a ingestão de misturas de cereais e leguminosas, como soja, feijão, ervilha, lentilha, também fornece ao organismo as quantidades necessárias de aminoácidos para a síntese protéica (LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998; BORSOI, 2001).

Alguns aminoácidos podem ser sintetizados no organismo a partir de precursores, sendo estes classificados como aminoácidos não-essenciais, ou seja: Ala, Asp, Glu a Asp, Gly, Pro, Ser, Tyr e Cys. No entanto, outros aminoácidos não conseguem ser sintetizados no organismo em quantidades suficientes, os quais são chamados de aminoácidos essenciais e devem ser fornecidos através da alimentação (ANGELIS, 1999). Os aminoácidos essenciais são: Thr, Trp, His, Lys, Leu, Ile, Met, Val e Phe e, condicionalmente, Arg, importante para crianças em fase de crescimento. A falta desses aminoácidos no organismo ocasiona alterações nos processos bioquímicos e fisiológicos e na síntese protéica, resultando em balanço nitrogenado negativo. Em crianças provoca diminuição do crescimento, perda de peso e profundas alterações bioquímicas (LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998; ANGELIS, 1999). Segundo Oliveira (1998) existem, ainda, os aminoácidos denominados condicionalmente essenciais, que são aqueles que podem ser essenciais em determinadas condições clínicas, como: glicina, prolina, tirosina, serina, cisteína e cistina, taurina, arginina, histidina e glutamina.

O conceito de necessidades de proteínas e aminoácidos tem sido objeto de muitas discussões e vem sofrendo modificações ao longo do tempo. De acordo com Angelis (1999), a necessidade protéica é a quantidade que deve ser ingerida em determinado período de tempo para contrabalançar os gastos orgânicos nesse período. Nesse contexto, Lajolo e Tirapegui (1998)

assinalaram que, de modo geral, as necessidades de proteínas representam quantidades específicas para a manutenção da saúde em indivíduos normais. Para garantir essa necessidade é fundamental que estejam satisfeitas, também, as necessidades energéticas do organismo.

As proteínas da dieta são digeridas no trato gastrointestinal em aminoácidos simples, que são usados pelo organismo para a biossíntese de novas moléculas, como: proteínas, hormônios, neurotransmissores, enzimas e proteínas do sistema imune. O excesso da proteína dietética pode ser usado para prover energia para o corpo, assim como os carboidratos e as gorduras (NELSON; COX, 2002).

Nos animais, os aminoácidos sofrem degradação oxidativa nas seguintes circunstâncias metabólicas: (a) Durante a síntese e a degradação de proteínas celulares “turnover” de proteínas, alguns dos aminoácidos liberados durante a hidrólise das proteínas sofrerão degradação oxidativa caso não sejam utilizados para a síntese de novas proteínas. (b) Quando, devido a uma dieta rica em proteínas, os aminoácidos são ingeridos em excesso, com relação às necessidades corporais de biossíntese de proteínas, o excedente é catabolizado, já que os aminoácidos livres não podem ser armazenados. (c) Durante jejum prolongado ou diabetes melito, quando os carboidratos estão inacessíveis ou não são utilizadas adequadamente, as proteínas corporais serão hidrolisadas e seus aminoácidos empregados como fontes de energia (NELSON; COX, 2002).

2.2. Métodos para avaliar a qualidade protéica

Os parâmetros conhecidos para avaliar qualidade de proteína são a relação de eficiência protéica, digestibilidade, valor biológico, utilização protéica líquida, escore químico de aminoácidos e escore químico corrigido pela digestibilidade protéica. Este último é determinado parte quimicamente analisando a composição de aminoácidos e parte por meio de ensaio biológico empregando a digestibilidade verdadeira.

2.2.1. Escore químico de aminoácido (EQ)

Trata-se de uma técnica química considerada rápida, consistente e barata. Esse parâmetro determina o conteúdo de aminoácidos presentes em uma fonte de proteínas e compara os valores obtidos com os de uma proteína tida como referência para crianças ente 2 e 5 anos de idade, segundo FAO/WHO (1985).

A qualidade da proteína é avaliada com base no aminoácido essencial limitante. Para valores de EQ maiores que 1,0, considera-se fonte protéica de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades para a dieta de humanos.

2.2.2. Escore químico corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS)

A quantidade de aminoácidos essenciais, a digestibilidade protéica e a biodisponibilidade dos aminoácidos são parâmetros usados para determinar a qualidade de proteínas. Entretanto, em 1991 foi realizada uma consulta da FAO/WHO com especialistas em avaliação de qualidade de proteína para revisar métodos rotineiros usados na determinação da qualidade de proteínas. Determinou-se que o método de escore químico corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS) era o mais satisfatório para avaliação de qualidade de proteínas para humanos, sendo, então, indicada a sua adoção como método oficial em nível internacional. A validade desse método foi endossada oficialmente por FAO/WHO, em 2001, e é a medida atualmente aceita para avaliar a qualidade de proteína.

Esse método consiste em adicionar ao escore químico mais um componente, que é a digestibilidade protéica. A digestibilidade protéica corrigida pelo escore químico de aminoácido (PDCAAS) é definida como a relação entre o conteúdo do primeiro aminoácido limitante na proteína (em mg/g) e o conteúdo daquele aminoácido em uma proteína de referência (mg/g) multiplicado pela digestibilidade verdadeira. São recomendadas como padrão as necessidades de aminoácidos essenciais para crianças ente 2 e 5 anos de idade, segundo FAO/WHO (1985). Valores de PDCAAS maiores que 1,0 são

considerado fonte proteica de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades da dieta de humanos.

2.2.3. Coeficiente de eficiência proteica (PER)

Este parâmetro determina a capacidade de uma proteína promover o crescimento de ratos recém-desmamados. Representa a relação de ganho de peso relacionado à quantidade de proteína consumida. A relação de eficiência proteica (PER) é ainda utilizada freqüentemente como medida biológica para determinar a qualidade de proteínas. Os valores de PER são determinados em experimentos com ratos, em que os animais são alimentados com uma dieta contendo uma proporção de cerca de 10% de proteínas. O PER é o valor do crescimento de ratos em gramas por grama de proteína ingerida. Esse valor encontrado é comparado ao de uma proteína de referência, normalmente a caseína. PER >2,0 indica proteína de alta qualidade; entre 1,5-2,0, qualidade intermediária; e PER <1,5, baixo valor nutricional (FRIEDMAN, 1996).

Este método tem duas limitações a serem destacadas. A primeira é a de que não pode ser aplicado a crianças em fase de crescimento, uma vez que o requisito de aminoácidos para crianças é ser menor do que aqueles para ratos. PER é uma medida de qualidade proteica para promover crescimento e não leva em consideração a proteína utilizada para a manutenção ou prevenção da perda de peso.

Sabe-se que a necessidade de aminoácidos sulfurados dos ratos é muito maior que a dos seres humanos. Assim, os ensaios com esses animais superestimam o valor de algumas proteínas de origem animal para seres humanos, subestimando o valor de proteínas vegetais. Além disso, o PER não considera a proteína utilizada para manutenção do organismo (uma proteína pode não propiciar o crescimento dos ratos e ter PER próximo de zero, embora seja uma fonte adequada para fins de manutenção do organismo) (NIELSEN, 1998).

2.2.4. Razão protéica líquida (NPR)

Este método constitui uma modificação do PER e acrescenta ao ganho de peso do grupo com dieta protéica a perda de peso de um grupo com dieta aprotéica. O NPR é determinado no 14^o dia do experimento, tomando-se o ganho de peso do grupo-teste mais a perda de peso do grupo de dieta aprotéica, em relação ao consumo de proteína do grupo-teste, segundo o método de Bender e Doell (1957). Essa soma de perda de peso elimina possíveis erros ocorridos nos valores de PER decorrentes de variações nos teores de proteína na dieta.

2.2.5. Digestibilidade

A digestibilidade da proteína é determinada em função da fração do nitrogênio ingerido que o animal absorve. O nitrogênio absorvido é obtido pela diferença entre o nitrogênio ingerido e aquele que aparece nas fezes. Considera-se a digestibilidade, assim calculada, como aparente, por não levar em conta o nitrogênio eliminado nas fezes como resultado da descamação do tubo digestivo, dos sucos e das secreções da flora intestinal, que se constituem em perdas inevitáveis de nitrogênio. Assim, para determinar a digestibilidade verdadeira é necessário corrigir a quantidade de nitrogênio fecal excretado quando o indivíduo consome uma dieta livre de proteína (FAO, 1991).

O conceito de qualidade protéica continua sendo, essencialmente, o mesmo como definido por Mitchel (1923), que é a quantidade de nitrogênio que o organismo é capaz de reter a partir da proteína consumida. Bodwell et al. (1980) usaram digestibilidade *in vitro* para estimar a digestibilidade verdadeira de diversas fontes de proteínas. Para a maior parte das fontes estudadas, houve boa correlação quando se comparou a digestibilidade *in vitro* com a digestibilidade verdadeira determinada em ratos.

Para avaliar a qualidade nutricional de uma proteína, é importante conhecer a sua composição aminoacídica e a biodisponibilidade dos aminoácidos presentes nessa proteína. A biodisponibilidade dos aminoácidos de uma proteína é a medida dos aminoácidos absorvidos que serão utilizados na síntese protéica (MOTTEIRO et al., 2003).

A digestibilidade das proteínas é considerada uma condicionante de sua qualidade. Os alimentos de origem animal apresentam maior digestibilidade que os de origem vegetal. O fato de os alimentos de origem animal não conterem fibra alimentar e fatores antinutricionais faz com que a velocidade de trânsito intestinal seja mais lenta e, em consequência, obtenha-se maior absorção dos nutrientes (HERNANDEZ et al., 1984).

Digestibilidade protéica é definida como sendo a porcentagem da proteína ingerida que vai ser absorvida pelo organismo, o que está relacionado com a biodisponibilidade de aminoácidos. Digestibilidade da proteína é o principal índice de qualidade protéica, pois dado aminoácido pode estar presente na proteína, mas não estar necessariamente disponível para o organismo. Assim, proteínas não podem ser utilizadas pelo organismo sem serem digeridas por este.

Vários fatores têm sido identificados interirem na digestibilidade, dentre estes se incluem a presença de componentes biologicamente ativos, tratamento térmico e estrutura química da proteína. Esses fatores afetam a digestibilidade da proteína diminuindo a sua hidrólise, tornando os aminoácidos menos disponíveis para serem absorvidos pelo organismo (LIU, 1995).

Vargas et al. (1984) citaram que as dietas de origem vegetal, especialmente quando contêm leguminosas, apresentam digestibilidade de nitrogênio muito baixa, da ordem de 50 a 70%. Acrescentaram ainda que a baixa digestibilidade do nitrogênio constitui um dos principais fatores que limitam a utilização da proteína de dietas de origem vegetal, em particular as que incluem leguminosas, e que não se conhecem ao certo as causas dessa baixa absorção de nitrogênio.

2.2.6. Digestibilidade *in vitro*

Todos os métodos de determinação de digestibilidade *in vitro* se baseiam em digerir a amostra com enzimas proteolíticas em condições padronizadas. A diferença está entre o número e a natureza das enzimas que se utilizam e a medida final a ser realizada. Os métodos podem ser subdivididos em métodos monoenzimáticos, métodos multienzimáticos e métodos baseados na simulação de sistemas digestivos.

A digestibilidade é estimada usando enzimas proteolíticas que agem normalmente na digestão, procurando-se imitar, inclusive, as condições de pH ou de acidez, características do estômago e do intestino onde a digestão das proteínas se processa.

O método desenvolvido por Mauron et al. (1955) é adaptado como método oficial pela AOAC (1975) para determinar a digestibilidade de proteínas alimentares de origem animal. Baseia-se em digerir a amostra com pepsina e determinar a porcentagem de nitrogênio solubilizado. O método tem sofrido numerosas modificações devido à sua baixa correlação com os ensaios biológicos.

Johnston e Coon (1979), trabalhando com pepsina para a digestão das proteínas, realizaram paralelamente um branco sem pepsina. Os valores correlacionaram bem com ensaios de crescimento em animais, indicando que esse teste é adequado para avaliar a qualidade protéica em subprodutos para animais.

Mertz et al. (1984) realizaram a digestão das amostras com pepsina em tampão-fosfato, determinando finalmente o conteúdo de nitrogênio no sobrenadante e resíduo da digestão.

Um método que usava a enzima tripsina para a digestão das proteínas *in vitro* e media a velocidade inicial de proteólise como indicador da digestibilidade foi o do pó (MAGA et al., 1973). Já Akesson e Stachman (1964) trabalharam com um método em que as amostras de proteína são incubadas primeiramente com pepsina e, depois, com pancreatina em tampão-fosfato. O resíduo é separado por filtração e o seu conteúdo de nitrogênio, analisado. É um método lento e trabalhoso. Büchmann (1979) modificou o método para a sua aplicação em amostras de cevada e outros cereais. Uma vez realizada a digestão enzimática, precipitam-se as proteínas com ácido tricloroacético, sendo o nitrogênio determinado no sobrenadante. O método propõe uma boa correlação com os valores encontrados por Saunders et al. (1973), em cereais com pepsina-tripsina e com os valores obtidos *in vivo*.

Outro método utilizado é aquele proposto por Saunders et al. (1973), em que a amostra protéica é inicialmente incubada com pepsina pH ácido (1,0 – 1,5) a 37 °C e deixada agir nessas condições durante 2 h. A suspensão ou solução de enzima e amostra deve ser mantida em banho termostatizado e em

constante agitação leve. Após 2 h de incubação, o pH da suspensão ou solução é elevado a 8,0 com solução de hidróxido de sódio, adicionando-se em seguida pancreatina em solução-tampão de fosfato de sódio, pH 8,0. A relação entre enzima/proteína é da ordem de 1:10 para pepsina e 1:5 para pancreatina.

A pancreatina é deixada agir sobre a amostra durante 24 h a 37 °C, pH 8,0, e sob agitação. No fim desse tempo, a reação é bloqueada pela adição de uma solução de ácido tricloacético (TCA) para dar uma concentração final de TCA na mistura de 5% (p/v). O TCA precipita a fração não digerida da proteína e, por filtração ou centrifugação, separa-se a fração solúvel em TCA, que irá conter os aminoácidos ou peptídios de baixo peso molecular liberados durante a digestão enzimática ou proteólise. Essa fração conterá aminoácidos existentes na amostra antes da digestão enzimática e poderá ser subtraída da fração total.

O nitrogênio é determinado pelo método de Kjeldahl, na amostra inicial e na fração digerida, após a precipitação com ácido tricloacético (TCA) da proteína digerida.

Já, no método de Mertz et al. (1984), as amostras são suspensas em tampão-fosfato e incubadas, primeiro com pepsina e depois com uma mistura de tripsina-quimotripsina. Posteriormente, o sobrenadante é eliminado e o nitrogênio, analisado no resíduo.

Um dos principais inconvenientes dos métodos expostos é a sua larga duração, o que dificulta sua aplicação no controle de qualidade. Hsu et al. (1977), baseando-se na observação de Maga et al. (1973), a respeito da correlação entre velocidade inicial de proteólise e digestibilidade, desenvolveram um método rápido (1 h) e sensível, baseado na medida de pH, para determinar a digestibilidade de proteínas. Para isso, é feita a digestão de uma suspensão de amostras com uma solução multienzimática (tripsina, quimotripsina e peptidase). A diminuição de pH, produzida pela digestão enzimática das proteínas, é registrada automaticamente durante 10 min. Paralelamente se determinou a digestibilidade *in vivo* das mesmas amostras. A equação de regressão obtida a partir de ambos os valores permitiu prever a digestibilidade. O método é capaz de detectar o efeito do tratamento térmico sobre a digestibilidade.

A fim de obter uma melhor correlação com a digestibilidade, Satterlee et al. (1979) modificaram o método, realizando uma segunda incubação da amostra com proteases e determinando o pH até 20 min depois de iniciada a incubação.

Em geral, essas técnicas de variação de pH são satisfatórias para proteínas vegetais e amostras de vegetais e animais (WOLTER; HENRY, 1985). São métodos de alta precisão e correlação com os valores de digestibilidade *in vivo*.

Pedersen e Eggum (1983) utilizaram as mesmas enzimas e condições experimentais de Hsu et al. (1977), porém mediram o volume do titulante consumido pela amostra para manter o pH constante durante os primeiros 10 min da digestão enzimática. Determinou-se a digestibilidade *in vivo* com as mesmas amostras, e então se fez uma equação de regressão. O método tem melhor correlação com os ensaios biológicos que o método de Hsu et al. (1977) em todas as proteínas analisadas, independentemente de sua origem, e tem sido também a base de um estudo da AOAC (McDONOUGH et al., 1990).

Rothenbuhler e Kinsella (1985) estudaram os efeitos de diversas variáveis (concentração de proteínas, relação entre enzima-substrato, pH, força iônica e compostos interferentes presentes no alimento) sobre a determinação da digestibilidade pelo método da queda de pH. Utilizaram as enzimas tripsina e pancreatina e expressaram os resultados em velocidade de hidrólise. Os referidos autores não apontaram nenhuma correlação dos seus resultados com os valores de digestibilidade *in vivo*.

2.3. Fatores que afetam a qualidade nutricional das proteínas

Os principais agentes responsáveis pela alteração das propriedades das proteínas em alimentos são: tratamentos térmicos, formação de complexos com carboidratos, lipídeos e compostos fenólicos, acidez ou alcalinidade elevadas, além da presença de fatores antinutricionais (SGARBIEIRE, 1996).

A presença de compostos inerentes ao próprio alimento, por exemplo fatores antinutricionais, como inibidores de tripsina e de amilase, saponinas e compostos fenólicos ou fatores externos, como processamento e armazenamento, entre os quais se destacam o tipo e a forma de tratamento

térmico aplicado, assim como o tempo e a forma de armazenamento, o que pode levar a uma diminuição da qualidade nutricional (VARGAS et al., 1984).

Muitos compostos presentes em alimentos originários de leguminosas têm mostrado causar efeitos bioquímicos e fisiológicos tanto no pâncreas quanto também no crescimento de animais (GUEN; BIRK, 1993). Esses compostos incluem ácido fítico, taninos, polifenóis, inibidores de proteases (tripsina e quimotripsina), inibidores de α -amilase e lectinas. Tais substâncias, chamadas de fatores antinutricionais, uma vez presentes podem afetar a digestibilidade de proteínas e carboidratos (YADAV; KHETARPAUL, 1994).

Alguns exemplos de fatores de antinutricionais que ocorrem naturalmente são: os inibidores de tripsina e as hemaglutininas em leguminosas e os fitatos em cereais (RACKIS; GUMBMANN, 1981). Esses compostos podem reduzir a utilização dos nutrientes presentes nos alimentos preparados com essas proteínas, o que pode comprometer o crescimento de animais (MARTINEZ; HOPKINS, 1975).

Segundo Torre et al. (1991), sob condições fisiológicas o ácido fítico é fortemente ionizado e capaz de interagir extensivamente com proteínas e íons metálicos. Muitos desses complexos são insolúveis e biologicamente indisponíveis para seres humanos em condições fisiológicas normais. Os taninos (fenóis condensados) são considerados potentes inibidores de enzimas devido à sua complexação com enzimas (NACZK et al., 1994). A grande tendência dos taninos em formar complexos com proteínas em vez de carboidratos e outros polímeros pode explicar a baixa digestibilidade das proteínas das leguminosas, inibição do crescimento e aumento da excreção de nitrogênio fecal em animais (KAUR; KAPOOR, 1992).

Os inibidores são substâncias antinutricionais que se encontram distribuídos em alimentos de consumo habitual. Estão amplamente distribuídos na natureza, encontrando-se tanto em alimentos de origem vegetal quanto de origem animal (BURNS, 1987). De forma geral, definem-se como aqueles compostos que estão presentes de forma natural em alguns alimentos e atuam provocando perda de nutrientes essenciais, ou interferindo em sua utilização e função metabólicas. Os inibidores de proteases (inibidor de tripsina e quimotripsina) se enquadram dentro dos fatores antinutricionais, que são inibidores enzimáticos. São substâncias de natureza protéica que interferem na

atividade de sistemas enzimáticos do trato digestivo, inibindo proteases, que são enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas como primeiro passo para a assimilação das proteínas na forma de aminoácidos. Essa inibição se traduz, *in vivo*, numa redução da digestão protéica e, conseqüentemente, da assimilação de proteínas (PARTEARROYO et al., 1995).

Os inibidores de proteases são considerados os principais fatores responsáveis pela diminuição da digestibilidade de proteínas, pois estes inibem a ação das enzimas tripsina e quimotripsina sobre a hidrólise das proteínas da dieta. Tal efeito é evidenciado pela relação entre o aumento da qualidade protéica, medida pelo PER, em ratos alimentados com soja tratada termicamente, cujos inibidores de proteases foram inativados (LIU, 1995).

Embora os efeitos dos inibidores de proteases sejam bastante conhecidos em ratos, em humanos persiste obscura a relação da qualidade da proteína e os níveis de inibidores presentes (LIENER, 1994).

Pesquisas realizadas pela FAO/OMS revelaram que as variações na digestibilidade podem ser devidas às diferenças intrínsecas da natureza das proteínas e à presença de fatores dietéticos (fibras, taninos e outros), que modificam a digestão e as reações químicas que alteram a liberação de aminoácidos e proteínas por processos enzimáticos.

O valor nutricional das proteínas é aumentado pelo processamento térmico, especialmente pelo calor úmido. Isso decorre, provavelmente, da desnaturação das proteínas e dos fatores antinutricionais de natureza protéica, já que para exercer os seus efeitos biológicos *in vivo* esses fatores precisam manter a sua integridade estrutural. Além disso, o aumento do valor nutricional pode ser resultante de maior acessibilidade das proteínas ao ataque enzimático, devido à desnaturação térmica. O processo térmico deve garantir suficiente inativação dos fatores antinutricionais, ao mesmo tempo que previne a degradação de aminoácidos essenciais (POEL et al., 1990).

O processamento dos alimentos pode envolver o uso de calor, agentes oxidantes (como peróxido de hidrogênio), solventes orgânicos, álcalis e ácidos, com o objetivo de melhorar sabor, textura, propriedades funcionais e organolépticas, além de inativar fatores antinutricionais. Esses tratamentos, entretanto, podem levar à formação da reação de Maillard, oxidação de aminoácidos sulfurados e ligações cruzadas entre peptídeos, diminuindo,

assim, a qualidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais (CHEFTEL, 1979; SCHWASS; FINLEY, 1984).

Segundo Hurrell (1984), a reação de Maillard, que ocorre entre proteínas e açúcares redutores, é a principal responsável para a perda do valor nutricional de proteínas durante o processo de calor em meio alcalino.

Outro fator que compromete a qualidade das proteínas, especialmente as de leguminosas, é a limitação dos aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína. Blanco e Bressani (1991), ao compararem a composição de aminoácidos de algumas variedades de feijão com o do padrão FAO/OMS (1973), verificaram que, além dos aminoácidos sulfurados, existem outros limitantes, em ordem decrescente: valina, triptofano e treonina.

A metionina é considerada um aminoácido limitante do valor biológico das proteínas de leguminosas, por ser nutricionalmente essencial para o organismo humano. A cisteína, apesar de não constituir um aminoácido essencial, tem a metionina como intermediário na sua biossíntese, tornando, assim, esse aminoácido ainda mais limitante (SGARBIERI; WHITAKER, 1982).

A deficiência de aminoácidos sulfurados, isoladamente, não parece ser o único fator limitante do valor nutritivo de leguminosas cozidas, pois não se observa correlação entre o conteúdo de aminoácidos sulfurados e o valor nutritivo dessas leguminosas, em termos de PER. Isso pode ser atribuído à baixa digestibilidade das proteínas de leguminosas e à biodisponibilidade dos aminoácidos após o cozimento (LIENER, 1976). Para que esses aminoácidos sejam completamente utilizados por humanos, alguns fatores antinutricionais, potencialmente tóxicos, precisam ser removidos ou destruídos, usualmente, pelo calor (SGARBIERI; WHITAKER, 1982).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Foram utilizadas as seguintes fontes de proteína: caseína, carne de rã sem osso, carne de rã com osso, carne de rã mecanicamente separada (CMS), carne bovina, ovo em pó, trigo, milho, feijão, soja convencional, linhagem de soja isenta de inibidor de tripsina Kunitz e lipoxigenases (soja KTI'LOX[®]) e proteína texturizada de soja (PTS).

3.1. Preparo das amostras

Foi utilizada caseína comercial obtida da RHOSTER-Indústria e Comércio Ltda. Carne de rã sem osso foi conseguida retirando manualmente a parte óssea, obtendo-se somente carne. A carne de rã com osso foi obtida triturando-se toda a rã sem a separação da parte óssea. Carne de rã mecanicamente separada (CMS) foi produzida pela separação da parte óssea por meio de máquina. Carnes de rã sem osso, com osso e CMS foram moídas e desidratadas, assim como a carne bovina moída e desidratada. O ovo em pó foi obtido por meio de liofilização. Trigo e milho foram adquiridos do comércio de Viçosa, MG, na forma de farinha de trigo e fubá, respectivamente. O feijão

utilizado foi da variedade pérola, cozido por 40 min em panela de pressão, secado em estufa e moído. A soja convencional e linhagem de soja isenta de inibidor de tripsina Kunitz e lipoxigenases (soja KTI'LOX[®]) foram submetidas a tratamento térmico com calor seco de 89 °C por 5 min. Após a remoção das cascas, os grãos foram moídos, obtendo-se, então, uma farinha de soja. A proteína texturizada de soja (PTS) foi adquirida em comércio de viçosa, MG, sendo, entretanto, moída para a obtenção de farinha.

3.2. Determinação do teor de proteínas

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método semimicro Kjeldhal, segundo AOAC (1995). No cálculo de conversão do nitrogênio em proteínas foi utilizado o fator 6,25.

3.3. Ensaio biológico

Foram preparadas uma dieta aprotéica, uma dieta de caseína (padrão) e as dietas experimentais, conforme apresentado no Quadro 1. Os dados de ensaios biológicos carne de rã sem osso, carne de rã com osso e carne de rã mecanicamente separada (CMS) foram obtidos de Fideles (2004) e os de feijão, de Lujan (2004), cujos experimentos foram conduzidos nas mesmas condições, no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV.

A composição das dietas foi baseada na AIN-93G, segundo Reeves et al. (1993), com o teor de proteínas alterado para 9 a 10%. As dietas foram homogêneas em batedeira industrial da marca Lieme. Após o preparo, determinou-se a concentração protéica de cada dieta, pelo método semimicro-Kjeldahl, usando-se o fator 6,25 para a obtenção do teor de proteína. As dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno devidamente rotulados e armazenados em refrigerador a 4 °C.

Os teores de óleo de soja, amido de milho, fibra alimentar, amido dextrinizado e de sacarose foram ajustados, conforme a composição das fontes protéicas, de modo a obter dietas isocalóricas e isoprotéicas.

Quadro 1 – Composição das dietas experimentais (g/100 g)*

Ingredientes	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Carne bovina ¹	11,62	-	-	-	-	-	-	-	-
Ovo em pó ¹	-	19,56	-	-	-	-	-	-	-
Trigo ¹	-	-	82,14	-	-	-	-	-	-
Milho ¹	-	-	-	86,58	-	-	-	-	-
Soja ¹	-	-	-	-	22,70	-	-	-	-
Soja KTI-LOX- ¹	-	-	-	-	-	23,75	-	-	-
PTS ¹	-	-	-	-	-	-	17,83	-	-
Caseína ²	-	-	-	-	-	-	-	11,65	-
Aprotéica	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mistura salínica (AIN-93G-MX) ^{2,*}	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica (AIN-93G-VX) ^{2,*}	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Óleo de soja ³	6,15	0,54	7,0	4,37	2,46	2,25	7,0	7,0	7,0
Bitartarato de colina ²	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho (q.s.p 100) ³	48,98	46,64	0,80	0,00	41,59	40,75	41,92	48,10	59,75
L-cistina ²	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Fibra alimentar (Celulose) ²	5,00	5,00	5,00	4,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,0
Amido de milho dextrinizado ²	13,2	13,2	0,00	0,00	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose ³	10,0	10,0	0,00	0,00	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

¹ Farinha produzida a partir das amostras analisadas.

² Obtido da RHOSTER – Indústria e Comércio Ltda.

* Segundo Reeves et al. (1993).

³ Obtido no comércio de Viçosa, MG.

3.3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos, da raça Wistar, recém-desmamados, com média de 23 dias de idade, peso variando de 50 a 60 g, provenientes do biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os animais foram divididos em grupos de seis animais cada, de modo que a diferença entre as médias dos pesos entre os grupos não excedesse a 5 g. Os ratos foram alocados em gaiolas individuais, onde receberam água e suas dietas experimentais *ad libitum* por 14 dias. Os animais foram mantidos em condições de temperatura de 22 ± 3 °C, sendo o monitoramento do consumo alimentar feito semanalmente.

3.3.2. Digestibilidade verdadeira

Para a determinação da digestibilidade verdadeira, as dietas foram marcadas com indigocarmina na proporção de 100 mg/100 g e oferecidas aos animais no 7^o e 13^o dias. As fezes foram coletadas do 8^o ao 14^o dia,

correspondendo às fezes marcadas com indigocarmina oferecidas no 7º dia e às fezes não-marcadas dos dias subsequentes. Foram acondicionadas em recipientes individuais para cada animal e mantidas sob refrigeração a 4 °C.

Ao término do experimento, as fezes foram secadas em estufa com circulação de ar a 105 °C, por 24 h. Em seguida foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador, para determinação da concentração de nitrogênio pelo método semimicro-Kjeldahl, com amostras em triplicatas (AOAC, 1995).

A digestibilidade verdadeira foi calculada medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, a quantidade excretada nas fezes e a perda metabólica nas fezes que corresponde ao nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica. Esta última foi estimada pela quantidade de nitrogênio excretada pelos ratos alimentados com a dieta livre de nitrogênio.

O cálculo da digestibilidade verdadeira (DV) foi feito de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Digestibilidade} = \frac{I - (F - FK) \times 100}{I}$$

em que:

I = nitrogênio ingerido pelo grupo-teste;

F = nitrogênio fecal do grupo-teste; e

FK = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

3.3.3. Coeficiente de eficácia protéica (PER)

O PER foi determinado através do método de Osborne, Mendel e Ferry, de acordo com a AOAC (1975), método esse que relaciona o ganho de peso dos animais com o consumo de proteína.

O PER foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{PER} = \frac{\text{ganho de peso do grupo-teste (g)}}{\text{proteína consumida pelo grupo-teste (g)}}$$

3.3.4. Razão protéica líquida (NPR)

O NPR foi determinado, de acordo com Bender e Doell (1957), no 14^o dia do experimento, levando-se em consideração o ganho de peso do grupo-teste, mais a perda de peso do grupo com dieta aprotéica, em relação ao consumo de proteína do grupo-teste. Também, foi calculado de acordo com a seguinte equação (HEGSTED, 1977):

$$\text{NPR} = \frac{\text{ganho de peso do grupo-teste (g)} + \text{perda de peso do grupo aprotéico (g)}}{\text{proteína consumida do grupo-teste}}$$

3.4. Digestibilidade *in vitro*

Para o cálculo da digestibilidade *in vitro*, alguns sistemas enzimáticos têm sido testados com o objetivo de se obterem resultados mais próximos quando comparados com a digestibilidade *in vivo*. Algumas dessas combinações incluem: pepsina, pepsina-pancreatina, papaína, papaína-tripsina, tripsina e tripsina-quimotripsina-peptidase (NIELSEN, 1998).

No presente trabalho foram analisados três métodos para ensaio de digestibilidade *in vitro*, utilizando-se um sistema enzimático contendo as enzimas tripsina e pancreatina. As equações obtidas foram usadas para correlacionar os estudos *in vitro* com os ensaios *in vivo* e, dessa forma, prever a digestibilidade.

3.4.1. Método descrito por Hsu et al. (1977), com modificações (Método 1)

Esta técnica baseia-se na correlação entre velocidade inicial de proteólise e digestibilidade, medida através do pH, utilizando-se uma solução enzimática para digerir a amostra. O método descrito por Hsu et al. (1977) utiliza as enzimas tripsina, quimotripsina e peptidase. O presente trabalho utilizou para a hidrólise da solução de proteínas uma solução enzimática contendo as enzimas tripsina e pancreatina (2,5 mg/mL de tripsina e 1,6 mg/mL de pancreatina).

Ajustou-se o pH de 50 mL da suspensão protéica em água destilada (contendo 6,25 mg de proteína/mL), para pH 8, sob agitação, em banho-maria

a 37 °C. A solução enzimática contendo 2,5 mg de tripsina e 1,6 mg de pancreatina por mL de solução foi preparada antes de cada série de testes e mantida em banho de gelo. Cinco mililitros da solução enzimática foram, então, adicionados à suspensão protéica mantida em banho-maria a 37 °C. A queda do pH foi medida após a adição da solução enzimática, a partir de 15 seg e posteriormente de 1 em 1 min, por um período de 10 min, usando-se um potenciômetro da marca Analion. A digestão enzimática foi caracterizada (a) pela queda do pH após 15 seg de adição da solução enzimática (b) 10 min após adição da solução enzimática e (c) ajuste da equação que descreve a queda do pH *versus* tempo. A queda do pH após 15 seg e 10 min e a equação dos parâmetros foram utilizados para descrever a correlação com a digestibilidade verdadeira *in vivo*.

3.4.2. Método descrito por Saterlee et al. (1979), com modificações (Método 2)

A técnica baseia-se na correlação entre velocidade inicial de proteólise e digestibilidade, medida através do pH, utilizando-se uma solução enzimática para digerir a amostra.

O método descrito por Saterlee et al. (1979) usa as enzimas tripsina, quimotripsina e peptidase. O presente trabalho utilizou para a hidrólise da solução de proteínas uma solução enzimática contendo as enzimas tripsina e pancreatina (2,5 mg/mL de tripsina e 1,6 mg/mL de pancreatina).

Ajustou-se o pH de 50 mL da suspensão protéica em água destilada (contendo 6,25 mg de proteína/mL), para pH 8, sob agitação, em banho-maria a 37 °C. A solução enzimática contendo 2,5 mg de tripsina e 1,6 mg de pancreatina por mL de solução foi preparada antes de cada série de testes e mantida em banho de gelo. Cinco mililitros da solução enzimática foram, então, adicionados à suspensão protéica mantida em banho-maria a 37 °C. Após 10 min, mais 5,0 mL de solução enzimática foram adicionados ao sistema. E a queda do pH foi medida após 20 min da primeira adição da solução enzimática, usando-se um potenciômetro da marca Analion. A digestão enzimática foi caracterizada (a) pela queda do pH após 20 min da adição da solução enzimática e (b) ajuste da equação que descreve a queda do pH *versus* tempo.

A queda do pH após 20 min e a equação dos parâmetros foram utilizadas para descrever a correlação com a digestibilidade verdadeira *in vivo*.

3.4.3. Método descrito por Cruz (2003), com modificações (Método 3)

Foram utilizadas para a solução enzimática as enzimas tripsina e pancreatina (2,5 mg/mL de tripsina e 1,6 mg/mL de pancreatina). Já o método descrito por Cruz (2003) utiliza as enzimas tripsina, quimotripsina e pancreatina.

Ajustou-se o pH de 50 mL da suspensão protéica em água destilada (contendo 6,25 mg de proteína/mL), para pH 8, sob agitação, em banho-maria a 37 °C. A solução enzimática contendo 2,5 mg de tripsina e 1,6 mg de pancreatina por mL de solução foi preparada antes de cada série de testes e mantida em banho de gelo. Cinco mililitros da solução enzimática foram, então, adicionados à suspensão protéica mantida em banho-maria a 37 °C. Em seguida foi adicionado NaOH 0,1 N, em quantidade suficiente para manter o pH em 8,0, independentemente do tempo de 10 min, desde que a queda de pH não variasse mais do que 0,03 unidade em 1 min. O fator 0,03 foi obtido através da hidrólise da caseína, durante a queda do pH, entre o tempo de 9 a 10 min, pois a partir desse ponto a diferença de pH é muito pequena, não sendo, portanto, significativa (CRUZ, 2003). Posteriormente, mediu-se o volume de NaOH gasto durante o teste. A digestão enzimática foi caracterizada (1) pelo volume de NaOH 0,1 N gasto durante o teste (2) e por uma equação que descreve o volume de NaOH, requeridos para manter o pH em 8. O volume de NaOH gasto durante o teste e a equação dos parâmetros foram utilizados para descrever a correlação com a digestibilidade verdadeira *in vivo*.

3.4.4. Equações de digestibilidade *in vitro*

Para melhor avaliação dos métodos *in vitro* e para predizer uma melhor equação de correlação, utilizaram-se para os testes várias combinações das amostras analisadas, verificando, dessa forma, a interferência do tipo de fonte protéica na digestibilidade da proteína.

MÉTODO 1: Hsu et al. (1977), com modificações

- Digestibilidade verdadeira de todas as amostras em função da queda de pH de todas as amostras coletadas após 10 min da solução de enzimas.
- Digestibilidade verdadeira de todas as amostras, exceto a caseína, em função da queda de pH de todas as amostras coletadas após 10 min da solução de enzimas.
- Digestibilidade verdadeira das amostras de proteínas vegetais em função da queda de pH das amostras de origem vegetal coletadas após 10 min da solução de enzimas.
- Digestibilidade verdadeira das amostras de proteínas de origem animal em função da queda de pH das amostras de origem animal coletadas após 10 min da solução de enzimas.

MÉTODO 2: Saterlee et al. (1979), com modificações

- Digestibilidade verdadeira de todas as amostras em função da queda de pH de todas as amostras coletadas após 20 min da solução de enzimas.
- Digestibilidade verdadeira de todas as amostras, exceto a caseína, em função da queda de pH de todas as amostras coletadas após 20 min da solução de enzimas.
- Digestibilidade verdadeira das amostras de proteínas vegetais em função da queda de pH das amostras de origem vegetal coletadas após 20 min da solução de enzimas.
- Digestibilidade verdadeira das amostras de proteínas de origem animal em função da queda de pH das amostras de origem animal coletadas após 10 min da solução de enzimas.

MÉTODO 3: Cruz (2003), com modificações (Método 3)

- Digestibilidade verdadeira de todas as amostras em função do volume de NaOH 0,1 N gasto para manter em 8,0 o pH da solução de proteínas após a adição da solução enzimática.

- Digestibilidade verdadeira de todas as amostras, exceto a caseína, em função do volume de NaOH 0,1 N gasto para manter em 8,0 o pH da solução de proteínas após a adição da solução enzimática.

- Digestibilidade verdadeira das amostras de origem vegetal em função do volume de NaOH 0,1 N gasto para manter em 8,0 o pH da solução de proteínas após a adição da solução enzimática.

- Digestibilidade verdadeira das amostras de origem animal em função do volume de NaOH 0,1 N gasto para manter em 8,0 o pH da solução de proteínas após a adição da solução enzimática.

3.5. Determinação e quantificação dos aminoácidos

Estas análises foram realizadas no Centro Interdepartamental de Química de Proteínas da USP-Ribeirão Preto, SP, sob a orientação do Professor José César Rosa, utilizando-se o método feniltiocarbamil aminoácidos (PTC) (análise de aminoácidos: derivação pré-coluna com fenilisotiocianato) (ROSA et al., 1987; BIDLINGMEYER et al., 1984).

A técnica de análise de aminoácidos através de derivação pré-coluna fornece dois resultados distintos: a) a composição relativa dos aminoácidos presentes na amostra e b) a oportunidade de quantificar proteína na amostra.

A composição dos aminoácidos foi determinada em amostras previamente hidrolisadas com ácido clorídrico (HCl) 6 N bidestilado, seguida de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC), e a separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) ocorreu em coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag - 3,9 x 150 mm) com monitoração em comprimento de onda em 254 nm. A quantificação da amostra foi baseada na área de cada pico de aminoácido, tomando-se como referência a área do pico do padrão de aminoácidos com concentração conhecida, sendo o padrão derivado nas mesmas condições e ao mesmo tempo que as amostras.

A amostra passou por quatro etapas: A) hidrólise, B) derivação, C) separação e D) quantificação dos PTC aminoácidos.

A) Hidrólise

As amostras foram pesadas e preparadas em triplicatas contendo de 3,0 a 8,0 mg de cada amostra diretamente colocadas em ampolas. Adicionaram-se 500 μL de HCl 6 N bidestilado (Merck, P.A.) contendo de 0,1 a 0,5% de fenol (Merck, P.A.) (p/v). As ampolas foram submetidas a vácuo e seladas, sendo, então, mantidas à temperatura constante de $110\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 22 h. Após esse período, o HCl de cada ampola foi evaporado em concentrador rotatório Speed-Vac até a completa secura. As amostras foram diluídas em água, e alíquotas foram derivadas a PTC-AA.

B) Derivação

Cada amostra foi alcalinizada com 20 μL de uma mistura metanol:água:TEA (triethylamina) na proporção de 2:2:1 (v:v:v) (metanol, Pierce, grau cromatográfico; TEA, pierce, grau seqüencial; e água milli-Q, agitado e secado por 15 min em concentrador rotatório Speed-Vac.

Em seguida, adicionaram-se a cada tubo da amostra 20 μL do reagente de derivação: metanol:água:TEA:PITC na proporção de 7:1:1:1 (v:v:v:v) (PITC, Pierce), agitou-se e deixou-se reagir por 20 min à temperatura ambiente. Após esse período, o excesso do reagente foi removido em concentrador rotatório Speed-Vac por 2 h à temperatura ambiente. A amostra após derivada e secada permanece estável por até três dias, quando mantida a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Todo esse procedimento de derivação foi realizado também com a mistura de aminoácidos padrões da Pierce, no qual 20 μL de uma solução de 125 nmol/mL foram derivados para a padronização da análise.

C) Separação dos PTC-AA

A amostra e o padrão, após derivados e secados, foram ressuspensos em tampão de amostra: acetato de sódio (NaAc) 0,14 M (Pierce) com 0,06% de TEA (v/v), pH 7,5, contendo 5% de acetonitrila (AcN) (v/v). O volume de ressuspensão foi de 200 μL , e 20 μL (10% da amostra total hidrolisada) foram injetados na coluna. O padrão de aminoácidos contém 100 pmol de cada aminoácido em 20 μL aplicados.

Os aminoácidos foram separados segundo o protocolo de separação desenvolvido por Bidlingmeyer e col. (1984) e adaptado para o equipamento de HPLC do Centro de Química de Proteínas da FMRP-USP por Rosa et al. (1987). Para a separação de PTC-aas foi utilizada uma coluna C18 Pico-Tag Waters com dimensões de 3,9 mm de diâmetro interno x 150 mm de comprimento. A cromatografia foi desenvolvida à temperatura constante de $38,0 \pm 0,1$ °C, em equipamento Spectra System P4000 da ThermoSeparation, com sistema de bomba binária. Os aminoácidos fenitiocarbamil foram detectados pela sua absorvância em comprimento de onda de 254 nm e célula de fluxo contínuo de 10 µL. Os dados foram coletados e analisados pelo software ThermoChrom III da Thermo Separation Products. Os solventes utilizados para a separação dos aminoácidos foram como solvente A- acetato de sódio (NaAc) 0,14 M com 0,06% de TEA, pH 5,7 (filtrado em membrana 0,45 µm) e solvente B- acetonitrila (AcN) e água na proporção de 60:40 (v/v). Um gradiente não-linear de solvente B foi desenvolvido iniciando em 10 para 54% B sob a razão de fluxo constante de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

D) Quantificação dos PTC-AA

As análises foram realizadas em triplicatas de hidrólise e quantificadas por padrão de aminoácidos externo (C.V. 2,66-12,41%).

E) Quantificação das amostras

As amostras foram normalizadas em µmol de aminoácidos por grama de amostra. E depois convertidos para g de aminoácidos por 100 g de amostra e mg de aminoácido por g de proteína.

3.6. Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS)

Para o cálculo do PDCAAS foram utilizados os dados obtidos na determinação dos teores de nitrogênio, proteína, aminoácidos essenciais, escore de aminoácidos (FAO/WHO,1985) e digestibilidade verdadeira.

Calculou-se o PDCAAS multiplicando o escore mais baixo de aminoácido essencial pela digestibilidade da proteína. A proteína com PDCAAS igual ou superior a 1,0 foi considerada de boa qualidade (HENLEY; KUSTER, 1994).

3.7. Delineamento estatístico

Procedeu-se à análise estatística (ANOVA) para a determinação do valor de F. Para valores significativos, utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade, para comparação entre as médias. Para a obtenção das equações de digestibilidade *in vitro* foi utilizada a regressão não-linear.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teor de proteínas

O teor de proteínas nas amostras estudadas está representado na Tabela 1. A rã sem osso foi a que teve o maior teor de proteínas, diferindo ($p < 0,05$) de todas as demais. Carne bovina e caseína não diferiram entre si ($p > 0,05$), assim como também não apresentaram diferença ($p > 0,05$) as amostras de rã com osso e rã mecanicamente separada. Soja convencional com 41,85% de proteína e soja isenta de inibidor de tripsina kunitz e de lipoxigenases com 40,0% também exibiram valores de proteína iguais em nível de 5% de probabilidade. Os valores do presente trabalho estão próximos dos de Monteiro et al. (2003), que foram de 39,55 e 42,44% para variedades de soja convencional e soja (KTI⁻LOX⁻), respectivamente. De todas as amostras estudadas, o milho foi a que apresentou menor teor de proteínas (6,93%), diferindo das demais ($p < 0,05$) (Tabela 1).

4.2. Avaliação biológica das proteínas

A digestibilidade é o primeiro fator que reflete a eficiência da utilização protéica da dieta, portanto pode ser considerada um condicionante de sua qualidade (CHIARADIA, 1997). Os valores obtidos para a digestibilidade das amostras estudadas variaram entre 71,76% (soja convencional) e 93,37% (rã

Tabela 1 – Teores de proteínas das amostras analisadas

Fontes de Proteína	Proteínas (g/100 g)
Carne de rã sem osso desidratada	84,55 a
Carne bovina desidratada	81,76 b
Caseína comercial	81,57 b
Rã com osso desidratada	66,28 c
Carne de rã mecanicamente separada desidratada	65,80 c
Proteína texturizada de soja	53,28 d
Ovo em pó liofilizado	48,56 e
Farinha de soja	41,85 f
Farinha de soja KTILOX [®]	40,00 f
Farinha de feijão Pérola cozido e seco	20,30 g
Trigo (farinha de trigo)	11,56 h
Milho (fubá)	6,93 i

Os resultados são médias de triplicatas.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

sem osso) (Tabela 2). A digestibilidade verdadeira encontrada na rã sem osso foi superior à de todas as demais estudadas, porém não diferiu ($p > 0,05$) dos valores obtidos na digestibilidade da caseína (93,33%), CMS (92,57%), carne bovina (92,38%) e rã com osso (91,01%) (Tabela 2). Roman e Sgarbieri (2005) verificaram digestibilidade verdadeira de 93,78% na caseína comercial bem próxima da encontrada no presente trabalho.

Os resultados encontrados na carne de rã indicaram que o processo de obtenção da carne, seja manual ou mecânico, não causou alteração significativa nos valores de digestibilidade protéica, uma vez que não ocorreu diferença significativa entre os valores de digestibilidade das três fontes de carne de rã analisadas. Das proteínas de origem animal, a que apresentou menor digestibilidade foi a do ovo em pó (90,13%), não diferindo, porém em nível de 5% de probabilidade, das digestibilidades de CMS (92,57%), carne bovina (92,38%), rã com osso (91,01%) e trigo (89,44%) (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias da digestibilidade protéica *in vivo*, PER, PER (%), NPR e NPR (%) das amostras de proteína estudadas

Fontes de Proteína	Digestibilidade Verdadeira (%)	PER	RPER (%)	NPR	RNPR (%)
Caseína comercial	93,33 a	4,33b	100,00	5,14b	100,00
Rã sem osso desidratada	93,37a	4,43b	102,31	4,99b	97,02
Carne de rã mecanicamente separada desidratada	92,57 ab	3,75c	86,60	4,27cd	83,07
Carne bovina desidratada	92,38 ab	4,96a	114,37	5,69a	110,92
Rã com osso desidratada	91,01 abc	3,75c	86,60	4,34c	84,43
Ovo em pó liofilizado	90,13 bc	4,15b	95,80	4,92b	95,72
Trigo (farinha de trigo)	89,44 c	0,98g	22,61	2,38g	46,23
Proteína texturizada de soja	86,41d	2,97d	68,48	4,14cd	80,60
Milho (fubá)	82,38 e	0,68h	15,59	3,89d	75,79
Farinha de feijão Pérola cozido e seco	78,70 f	2,12e	48,96	3,36e	65,365
Farinha de soja KTI-LOX-	74,26 g	1,69f	39,06	2,87f	55,96
Farinha de soja	71,76 g	1,75f	40,35	2,91f	56,59

Os resultados são médias de seis repetições.

Médias seguidas da mesma letra dentro da mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As proteínas de origem animal apresentaram maiores valores de digestibilidade verdadeira que as de origem vegetal, possivelmente devido à ausência de fatores antinutricionais, os quais sabidamente contribuem para diminuir a digestibilidade em alimentos de origem vegetal. Segundo Cassidy (1996), fontes vegetais de proteínas podem diferir de fontes de origem animal dentro de condições de digestibilidade, composição de aminoácidos e presença de fatores antinutricionais. Segundo Bressani (1989), a maioria das proteínas de origem animal tem boa digestibilidade, o que implica uma absorção de aminoácidos de forma eficaz.

De todas as proteínas analisadas, aquela que apresentou menor digestibilidade verdadeira foi a da soja convencional (71,76%), não diferindo, porém ($p > 0,05$), da soja isenta de inibidor de tripsina kunitz e lipoxigenases, que teve 74,26% de digestibilidade. Isso evidencia que a eliminação genética desse inibidor não levou a um aumento significativo da digestibilidade protéica (Tabela 2). Já a PTS, com uma digestibilidade protéica de 86,41%, portanto superior aos valores encontrados na soja convencional (71,76%) e soja KTI

LOX⁻ (74,26%), indicou que o processamento ao qual é submetido o farelo de soja para a obtenção da proteína texturizada leva a uma melhora na digestibilidade protéica.

Monteiro et al. (2003) encontraram digestibilidade verdadeira de 86,36% na variedade de soja convencional e de 90,59% na soja isenta KTI⁻LOX⁻. Uma possível explicação para as diferenças observadas entre os valores de Monteiro et al. (2003) e os do presente trabalho pode estar no método de preparo das amostras, como tempo e temperatura utilizados para a remoção das cascas da soja. Herkelman et al. (1992), estudando o efeito de cultivar (com teor normal x baixo teor de KTI) e do tratamento térmico sobre a digestibilidade aparente da proteína da soja em suínos, observaram que animais que receberam dietas contendo soja convencional apresentaram desempenho inferior ao de animais que receberam dietas contendo soja com baixo teor de KTI, porém um adequado tratamento térmico é requerido para melhorar o valor nutricional de ambos os tipos de soja.

A digestibilidade verdadeira do trigo (89,44%) foi a maior encontrada entre as proteínas de origem vegetal, diferindo das outras proteínas vegetais ($p < 0,05$). Entretanto, não diferiu ($p > 0,05$) das proteínas de origem animal rã com osso e ovo em pó (Tabela 2). Isso indica que, utilizando-se o parâmetro digestibilidade protéica, a qualidade nutricional das proteínas do trigo é equivalente às da carne de rã com osso e do ovo em pó.

Os valores encontrados para PER e PER relativo estão apresentados na Tabela 2. A fonte protéica que apresentou maior valor de PER foi a carne bovina (4,96), diferindo ($p < 0,05$) de todas as demais, sendo inclusive superior ao tomado como padrão, que foi o da caseína, cujo PER foi de 4,33. Roman e Sgarbieri (2005) encontraram um valor de 3,36 para o PER de uma caseína comercial que possuía 91,98% de proteínas.

O PER relativo para carne bovina foi de 114,37% em relação à caseína, mostrando-se ser essa proteína de melhor qualidade nutricional do que todas as fontes estudadas. Pires (2003), estudando carne bovina originária de diferentes grupos genéticos, encontrou valores de PER entre 3,89 e 4,74 (98,06 e 119,34%, em relação à caseína). Das proteínas de origem animal, o ovo em pó foi aquela com menor valor de PER (4,15), não apresentando diferença ($p > 0,05$) em relação ao PER da caseína (4,33) e da rã sem osso

(4,43) (Tabela 2). A PTS com PER de 2,97 (68,48% de PER relativo) foi a que apresentou maior valor entre as proteínas vegetais, diferindo ($p < 0,05$) de todas as demais. Soja convencional e soja KTILOX[®] com valores de PER de 1,75 e 1,69 (40,35 e 39,06%, em relação à caseína) não apresentaram diferença em nível de 5% de probabilidade (Tabela 2). O PER encontrado nas duas fontes protéicas foi inferior àquele verificado na PTS, evidenciando-se uma melhora na qualidade nutricional de proteínas de soja submetidas a tratamento térmico.

Monteiro et al. (2003) encontraram valores de PER de 1,33 e 1,25 (35,37 e 33,24%), em relação à caseína, nas variedades de soja convencional e de soja isenta de inibidor de tripsina kunitz e lipoxigenases, respectivamente. Tanto Monteiro et al. (2003) quanto os dados do presente trabalho evidenciaram valores ligeiramente maiores de PER em soja convencional que em soja KTILOX[®], embora esses resultados não tenham sido significativos em nível de 5% de probabilidade em ambos os trabalhos.

O milho apresentou menor PER (0,68), diferindo ($p < 0,05$) do PER encontrado em todas as outras fontes protéicas estudadas (Tabela 2). Os valores de NPR variaram entre 2,38 e 5,69 (46,23 e 110,92% em relação à caseína). A carne bovina foi a que apresentou maior valor, diferindo ($p < 0,05$) de todas as demais e apresentando um NPR relativo de 110,92%. Pires (2003) encontrou valores de NPR entre 4,8 e 5,65 (101,00 e 118,90, em relação à caseína), estudando carne bovina proveniente de diferentes grupos genéticos submetidos a diferentes dietas.

Caseína, rã sem osso e ovo em pó apresentaram valores de NPR de 5,14; 4,99; e 4,92, respectivamente, mas não exibiram diferença entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Dentre as proteínas de origem vegetal, a proteína texturizada de soja foi a que apresentou maior valor de NPR (4,14), não diferindo, entretanto ($p > 0,05$), do NPR encontrado no milho (3,89). Brown et al. (1998) citaram que o valor de NPR do milho pode representar até 61,5% do verificado na caseína. Costa et al. (1996) constataram valores de NPR relativos no milho de 52% em relação à caseína.

Os valores de NPR relativos da PTS e do milho foram de 80,60 e 75,79%, respectivamente, em relação ao padrão caseína. Soja convencional e soja KTILOX[®] com valores de NPR de 2,91 e 2,87 (56,59 e 55,06% em relação

à caseína) também não tiveram diferença entre si ($p>0,05$). Gomes et al. (2000), trabalhando com ratos, encontraram valores de NPR de 4,70 em caseína e 2,70 em farelo de soja.

Monteiro et al. (2003) verificaram valores de NPR de 2,21 e 2,34 (49,77 e 52,70% em relação à caseína) em variedades de soja convencional e soja KTILOX[®], respectivamente. A fonte protéica com menor valor de NPR foi o trigo com um NPR de 46,23% em relação ao padrão caseína, diferindo de todas as outras, a 5% de probabilidade.

4.3. Escore químico de aminoácidos (EQ) e escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS)

A composição de aminoácidos expressa em μmol de aminoácidos por gramas de amostras está apresentada na Tabela 3. A composição de essenciais e não-essenciais expressa em g de aminoácido por 100 g de amostra encontra-se na Tabela 4.

Para o cálculo do escore químico e do PDCAAS, os valores do conteúdo de aminoácidos foram expressos em mg de aminoácido por grama de proteína e comparados com o padrão da FAO/WHO (1985) (Tabela 5). Os valores obtidos nos aminoácidos essenciais foram divididos pelos valores recomendados por FAO/WHO (1985), e o resultado, denominado escore químico de aminoácido, permitiu determinar os aminoácidos limitantes em cada fonte de proteína (Tabela 6).

Uma proteína que apresenta escore químico maior que 1,0 para todos os aminoácidos é considerada de alto valor nutricional. O aminoácido que apresentar escore químico menor que 1,0 é chamado de aminoácido limitante. Das proteínas estudadas, as de origem animal não apresentaram aminoácidos limitantes, sendo, portanto, todas de alto valor nutricional, possuindo a capacidade dietética de suprir o organismo humano com níveis adequados de aminoácidos essenciais (Tabela 6). Já as proteínas de origem vegetal apresentaram um ou mais aminoácidos essenciais com EQ menor que 1,0 em pelo menos um dos aminoácidos essenciais.

Tabela 3 – Composição aminoacídica das amostras estudadas

Aminoácidos	Rã sem Osso	Rã com Osso	CMS	Ovo em Pó	Carne Bovina	Caseína	Feijão	Trigo	Milho	Soja	Soja KTILOX [®]	PTS
µmol Aminoácido/g Amostra												
Asp	467,15	443,74	466,03	468,62	447,74	403,96	156,09	24,74	23,70	227,17	203,67	467,07
Glu	678,17	673,77	700,81	438,22	696,65	1210,26	178,90	199,88	75,22	446,93	211,29	623,95
Ser	253,13	257,57	291,65	289,53	228,17	397,32	71,45	27,76	20,87	172,99	148,93	178,42
Gly	359,07	450,99	510,68	211,70	331,18	194,98	82,01	34,05	22,40	223,49	228,15	221,99
His	118,49	114,88	115,69	66,48	145,15	99,05	29,36	11,62	9,85	76,28	66,10	90,06
Arg	238,43	221,67	205,64	193,10	232,70	179,03	69,95	16,32	9,65	177,07	133,14	232,89
Thr	250,43	234,25	259,72	218,04	249,23	305,75	66,56	16,61	12,74	161,57	138,34	166,89
Ala	433,75	439,15	500,62	293,29	483,61	324,35	67,03	25,42	42,61	208,18	194,01	209,61
Pro	215,72	256,84	311,49	193,84	235,74	777,43	95,96	93,04	57,73	189,55	157,57	265,38
Tyr	123,03	112,33	121,88	118,55	115,24	239,24	40,17	11,35	13,20	80,63	74,10	99,23
Val	186,73	192,81	210,99	197,61	226,68	396,57	58,08	19,16	11,70	154,63	102,02	152,30
Met	114,42	99,41	111,15	125,87	141,80	164,37	21,46	9,40	7,18	45,24	40,95	59,09
Ile	123,08	140,15	163,88	126,20	182,12	296,57	39,14	14,32	8,76	128,59	82,84	127,45
Leu	294,98	289,08	344,86	305,66	425,99	588,29	97,59	49,03	50,55	228,79	209,16	280,54
Phe	117,10	119,91	164,33	144,77	169,94	267,92	63,83	30,36	13,88	120,32	123,01	162,03
Lys	422,85	355,99	375,26	294,08	388,47	439,04	103,86	13,74	8,59	205,35	175,50	280,08

Tabela 4 – Composição aminoacídica das amostras estudadas

Aminoácidos	Fontes de Proteínas											PTS
	Rã sem Osso	Rã com Osso	Rã CMS	Ovo em Pó	Carne Bovina	Caseína	Feijão	Trigo	Milho	Soja	Soja LOX ⁺ KTI ⁻	
g aminoácidos/100 g de amostra												
Essenciais												
Phe+Tyr	3,73	3,59	4,40	4,06	4,38	7,83	1,59	0,63	0,42	3,08	3,02	4,00
His	1,62	1,57	1,58	0,91	1,99	1,36	0,40	0,16	0,13	1,04	0,910	1,23
Ile	1,39	1,58	1,85	1,43	2,06	3,35	0,44	0,16	0,10	1,45	0,94	1,44
Leu	3,33	3,27	3,90	3,45	4,81	6,65	1,10	0,55	0,57	2,58	2,36	3,17
Lys	5,41	4,56	4,80	3,76	4,97	5,62	1,33	0,18	0,11	2,63	2,25	3,58
Met	1,50	1,30	1,46	1,65	1,86	2,15	0,28	0,12	0,09	0,59	0,54	0,77
Thr	2,53	2,37	2,62	2,20	2,52	3,09	0,67	0,17	0,13	1,63	1,40	1,68
Trp	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Val	1,85	1,91	2,01	1,96	2,24	3,93	0,57	0,19	0,12	1,53	1,01	1,51
Não-Essenciais												
Ala	3,08	3,12	3,55	2,08	3,43	2,30	0,48	0,18	0,30	1,48	1,38	1,49
Arg	3,72	3,46	3,21	3,01	3,63	2,79	1,09	0,25	0,15	2,76	2,08	3,63
Asp	5,37	5,10	5,36	5,39	5,15	4,65	1,79	0,28	0,27	2,61	2,34	5,37
Glu	8,75	8,69	9,04	5,65	8,99	15,61	2,31	2,58	0,97	5,76	2,73	8,05
Gly	2,05	2,57	2,91	1,21	1,89	1,11	0,47	0,19	0,13	1,27	1,30	1,26
Pro	2,09	2,49	3,02	1,88	2,29	7,54	0,93	0,90	0,56	1,84	1,53	2,57
Ser	2,20	2,24	2,54	2,52	1,98	3,46	0,62	0,24	0,18	1,50	1,29	1,55

nd: não-determinado (destruído no processo de hidrólise).

Tabela 5 – Composição de aminoácidos essenciais das proteínas estudadas

Aminoácidos Essenciais	mg aminoácido/g proteína												
	Rã sem Osso	Rã com Osso	Rã CMS	Ovo em Pó	Carne Bovina	Caseína	Feijão	Trigo	Milho	Soja	Soja KTI'LOX [®]	PTS	Padrão FAO/WHO 2-5 Anos
Phe+Tyr	76,64	75,14	84,11	98,64	83,86	109,71	113,08	92,85	98,92	96,99	120,36	96,77	63
His	33,38	32,91	30,28	22,12	38,10	18,99	28,55	23,41	31,83	32,88	36,14	29,85	19
Ile	28,60	33,11	35,38	34,64	39,43	46,91	31,39	23,81	23,35	45,71	37,36	34,85	28
Leu	68,55	68,30	74,45	83,90	92,24	93,05	78,28	81,48	134,78	81,34	94,32	76,70	66
Lys	111,31	95,28	91,77	91,44	95,28	78,66	94,36	25,87	25,96	82,69	89,65	86,74	58
Met	30,83	27,23	27,82	40,05	35,59	30,14	19,95	18,12	22,21	18,65	21,41	18,73	25
Thr	52,02	49,47	50,12	53,50	48,23	43,22	47,72	24,67	30,36	51,34	55,76	40,78	34
Trp	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	11
Val	38,02	39,91	39,91	47,52	43,00	54,95	40,81	27,89	27,34	48,16	40,30	36,48	35

nd: não-determinado (destruído no processo de hidrólise).

FAO/OMS: Met+Cys.

Tabela 6 – Escore químico de aminoácidos das proteínas estudadas

Aminoácidos Essenciais	Escore de Aminoácido (mg/g Proteína Amostra)/(mg/g Proteína-Padrão FAO/WHO)											PTS
	Rã sem Osso	Rã com Osso	Rã CMS	Ovo em Pó	Carne Bovina	Caseína	Feijão	Trigo	Milho	Soja	Soja KTILOX [®]	
Phe+Tyr	1,22	1,19	1,34	1,57	1,33	1,74	1,79	1,47	1,57	1,54	1,91	1,54
His	1,76	1,73	1,59	1,16	2,01	1,00	1,50	1,23	1,68	1,73	1,90	1,57
Ile	1,02	1,18	1,26	1,24	1,41	1,68	1,12	0,85	0,83	1,63	1,33	1,24
Leu	1,04	1,03	1,13	1,27	1,40	1,41	1,19	1,23	2,04	1,23	1,43	1,16
Lys	1,92	1,64	1,58	1,58	1,64	1,36	1,63	0,45	0,45	1,43	1,55	1,50
Met	1,23	1,09	1,11	1,60	1,42	1,21	0,80	0,72	0,89	0,75	0,86	0,75
Thr	1,53	1,46	1,47	1,57	1,42	1,27	1,40	0,73	0,89	1,51	1,64	1,20
Trp	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Val	1,09	1,14	1,14	1,36	1,23	1,57	1,17	0,80	0,78	1,38	1,15	1,04

nd: não-determinado (destruído no processo de hidrólise).

FAO/OMS: Met+Cys.

Feijão, soja, soja KTI'LOX[®] e PTS apresentaram o aminoácido sulfurado metionina como limitante (Tabela 6). Soja KTI'LOX[®] com um escore de 0,86 para a metionina indicou que há um ligeiro aumento no teor desses aminoácidos quando comparados com o escore de 0,75 da soja convencional (Tabela 6). Tais resultados evidenciam que o melhoramento genético para a retirada do inibidor de tripsina kunitz e das lipoxigenases de certa forma levou a uma melhora no perfil aminoacídico da soja.

A PTS e a soja convencional apresentaram o mesmo escore químico no aminoácido metionina (0,75). Como o seu perfil de aminoácidos da PTS é similar ao da variedade de soja convencional estudada neste trabalho, acredita-se que a PTS adquirida no mercado local seja proveniente de uma variedade de soja convencional semelhante.

Trigo e milho tiveram como limitantes os seguintes aminoácidos essenciais: isoleucina, lisina, metionina, treonina e valina, sendo as fontes protéicas mais deficientes em aminoácidos essenciais e, portanto, as de menor valor nutricional. Tanto trigo quanto milho apresentaram a lisina como aminoácido mais limitante, com um escore químico de 0,45 (Tabela 6). Onyango et al. (2004) verificaram que a lisina é o aminoácido limitante da proteína de milho, encontrando um teor desse aminoácido de 32 mg/g de proteína, ligeiramente superior ao encontrado neste trabalho, que foi de 25,96 mg/g de proteína, sendo ambos inferiores ao valor recomendado por FAO/WHO (1985), que é de 58 mg de lisina por gramas de proteína (Tabela 5). Segundo Paredes-Lopez et al. (2000), a proteína do milho é de baixa qualidade, pois é deficiente nos aminoácidos essenciais lisina e triptofano.

O escore químico encontrado nos aminoácidos sulfurados pode estar subestimado, uma vez que o teor de cisteína não foi determinado e, para a determinação do escore químico, o padrão da FAO (1985) se refere à soma de metionina+cisteína.

Os resultados do escore químico corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS) das amostras estudadas encontram-se na Tabela 7. Para o cálculo do PDCAAS, tomou-se por base o valor do escore químico do aminoácido essencial mais limitante de cada fonte de proteína. Esse valor foi multiplicado pela respectiva digestibilidade protéica verdadeira. Para as proteínas de origem animal, as quais não apresentaram aminoácido limitante, não foi determinado o valor de PDCAAS (Tabela 7). Entretanto, os valores de PDCAAS foram calculados para todas as proteínas vegetais.

Tabela 7 – Escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS) das proteínas de origem vegetal

Fontes de proteína	Lys			Met		
	EQ	Digestibilidade	PDCAAS (%)	EQ	Digestibilidade	PDCAAS (%)
Feijão	-	-	-	0,80	78,70	62,96
Trigo	0,45	89,44	40,25	-	-	-
Milho	0,45	82,38	37,07	-	-	-
Soja convencional	-	-	-	0,75	71,76	53,82
Soja KTILOX [®]	-	-	-	0,86	74,26	64,29
PTS	-	-	-	0,75	86,41	64,81

PDCAAS = 1^o aminoácido limitante x digestibilidade verdadeira do experimento com ratos.

O milho foi o que apresentou menor PDCAAS com um valor de 37,07%, seguido pelo trigo com PDCAAS de 40,25%, sendo o aminoácido limitante nas duas fontes a lisina (Tabela 7). Trigo, ao ser avaliado por meio da digestibilidade, mostrou-se uma fonte de boa qualidade protéica, com uma digestibilidade verdadeira de 89,44%, não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) dos valores de digestibilidade verdadeira encontrada nas proteínas de origem animal rã com osso (91,01%) e ovo em pó (90,13%) (Tabela 2). Entretanto, ao ser determinado seu PDCAAS, pode-se verificar que se trata de uma fonte protéica de baixa qualidade, pois apresenta vários aminoácidos essenciais limitantes e um PDCAAS para a lisina de 40,25%.

Soja convencional, soja KTILOX[®] e PTS apresentaram os seguintes valores de PDCAAS, 53,82; 64,29; e 64,81%, respectivamente, sendo o aminoácido sulfurado (metionina) o primeiro limitante (Tabela 7). Soja KTILOX[®] e PTS tiveram valores mais elevados de PDCAAS do que a variedade de soja convencional, evidenciando-se que o melhoramento genético (soja KTILOX[®]) e o processamento (PTS) levaram a uma melhoria na qualidade nutricional das proteínas de soja (Tabela 7).

O tratamento térmico é uma alternativa utilizada para melhorar a qualidade nutricional de produtos à base de soja (QUEDRAOGO et al., 1999). Outra alternativa para diminuir ou mesmo eliminar os efeitos de fatores antinutricionais e aumentar a qualidade nutricional da soja tem sido o desenvolvimento de novas linhagens com ausência de inibidor de tripsina e de lectina (DOUGLAS et al., 1998). Monteiro et al. (2003) encontraram como

limitante o aminoácido lisina com PDCAAS de 75 e 78%, nas variedades de soja convencional e soja (KTILOX), respectivamente.

Entre as proteínas de origem vegetal, o feijão, que também teve como limitante os aminoácidos sulfurados, apresentou um valor de PDCAAS de 62,96%, mostrando-se de melhor qualidade protéica que soja convencional (Tabela 7). Segundo Cruz et al. (2003), o feijão apresenta baixo valor nutricional de suas proteínas, decorrente, por um lado, da sua baixa digestibilidade e, de outro, dos reduzidos teores e biodisponibilidade de aminoácidos sulfurados. Esses dois fatores irão, portanto, contribuir para um PDCAAS inferior a 1 para os aminoácidos sulfurados de proteínas de feijão.

4.4. Digestibilidade *in vitro*

4.4.1. Método da queda de pH (Métodos 1 e 2)

A digestibilidade *in vitro* foi caracterizada pela queda de pH da solução de proteínas medida após 10 e 20 min da adição da solução enzimática. Os valores de pH foram medidos para cada amostra após 15 seg da adição da solução de enzimas e a partir do primeiro minuto a cada minuto até 20 min (Figura 1). A solução protéica que continha caseína foi aquela que apresentou maior queda de pH e a amostra contendo feijão, a menor (Figura 1). A queda mais drástica do pH aconteceu antes do primeiro minuto e logo após, mais lentamente, podendo-se observar que a partir do 10^o min a taxa de queda se torna muito pequena, mantendo-se próximo do valor mínimo atingido (Figura 1).

4.4.1.1. Curvas de digestibilidade em função da queda de pH (medido a 10 min) – Método 1

Para a elaboração das equações de digestibilidade *in vitro* foram anotados os valores de pH observados em 10 min após a adição da solução de enzimas. Esses valores foram correlacionados com as respectivas digestibilidades *in vivo* das amostras, sendo escolhido o melhor modelo matemático para descrever o sistema.

Queda de pH após a Adição da Solução de Enzimas

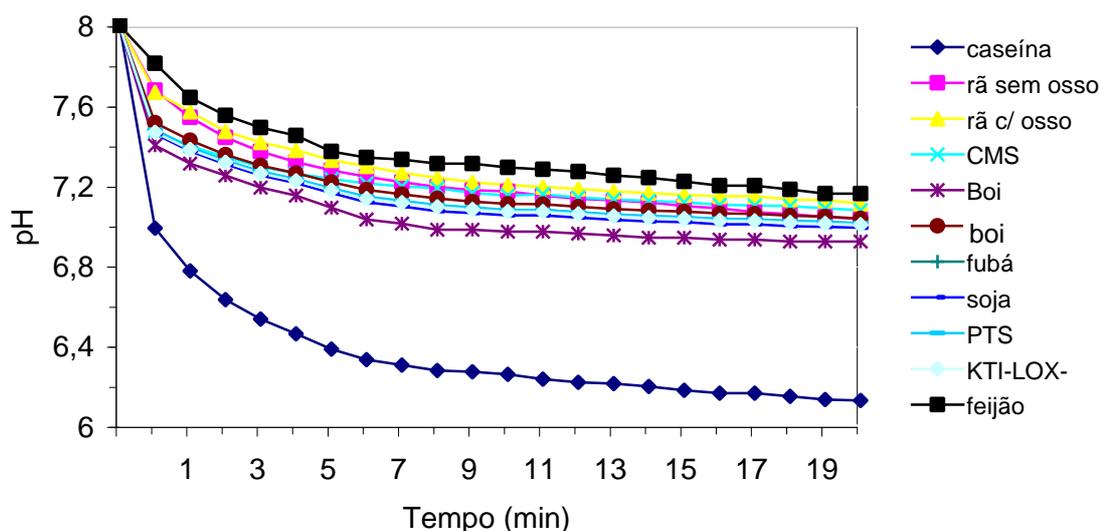


Figura 1 – Queda de pH das amostras de proteína analisadas após a adição da solução enzimática (Métodos 1 e 2).

As equações elaboradas a partir de valores de pH medidos após 10 min da solução de enzimas estão mostradas nas Figuras 2, 3, 4 e 5.

Na Figura 2 está a equação obtida usando os dados de digestibilidade *in vivo* e queda de pH de todas as fontes proteicas. A equação obtida é polinomial e possui um R^2 de 52,63%. Na Figura 3 foram utilizadas todas as fontes de proteína, com exceção da caseína, obtendo-se, assim, uma equação com R^2 de 79,02%. Já na Figura 4 estão somente as proteínas de origem vegetal, as quais permitiram a obtenção de uma equação polinomial de digestibilidade em função de pH com um valor de R^2 de 81,78%. As equações obtidas nas Figuras 3 e 4 foram as que melhor explicaram o comportamento da queda de pH após 10 min, em função da digestibilidade *in vivo*. Já a equação obtida pela Figura 5, na qual foram utilizados somente dados de proteínas de origem animal, foi a que permitiu pior ajuste, com um valor de R^2 de 19,86%, sendo, então, a equação que menos explicou o comportamento da digestibilidade *in vitro* em relação aos valores de digestibilidade *in vivo*. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de os valores de digestibilidade das proteínas de origem animal serem muito próximos e, ao se medir a queda de pH, os valores encontrados diferirem em fonte protéica.

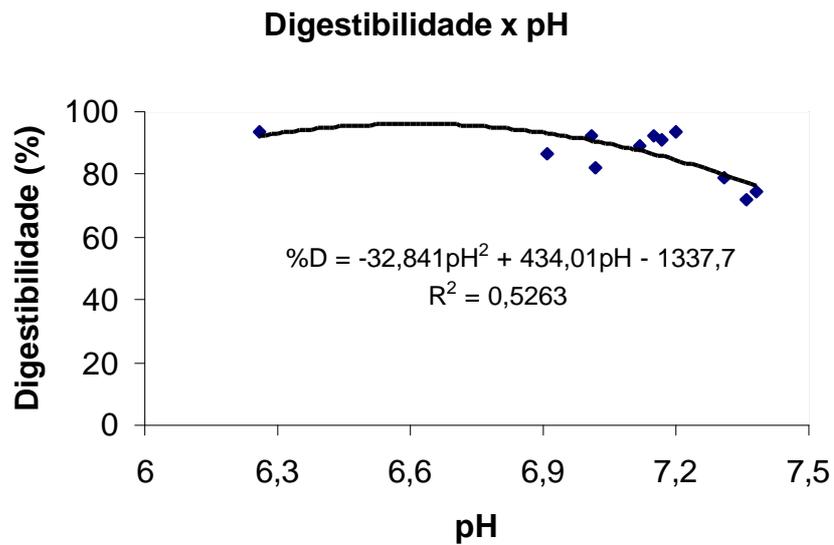


Figura 2 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir da queda de pH (Método 1) e da digestibilidade *in vivo* de todas as proteínas estudadas. Cada ponto representa a média de seis repetições.

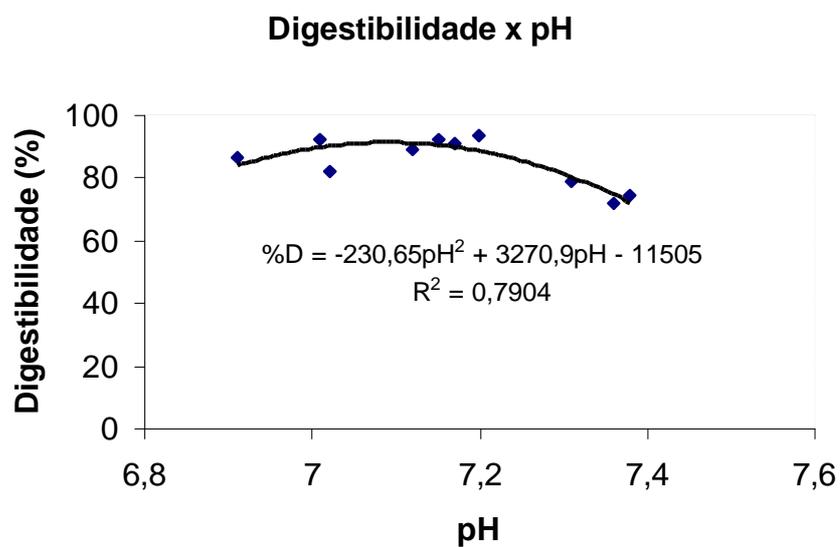


Figura 3 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir da queda de pH (Método 1) e da digestibilidade *in vivo* de todas as proteínas estudadas, exceto a caseína. Cada ponto representa a média de seis repetições.

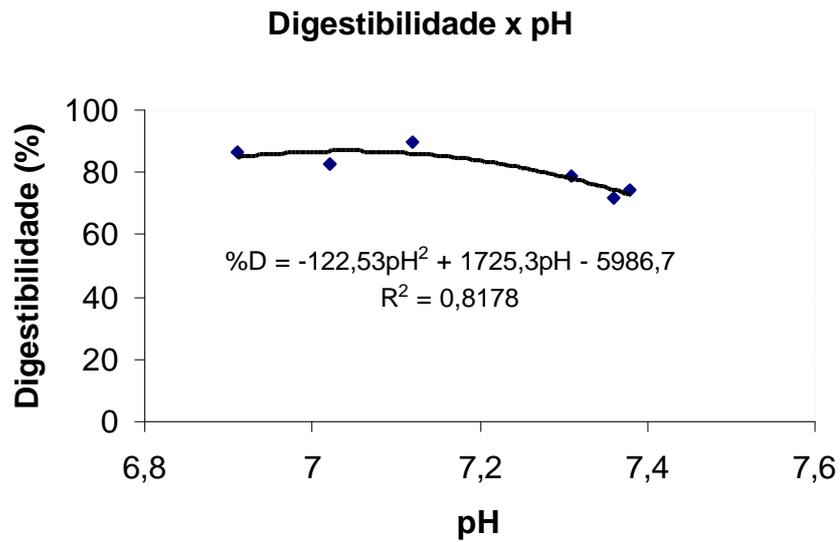


Figura 4 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir da queda de pH (Método 1) e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem vegetal. Cada ponto representa a média de seis repetições.

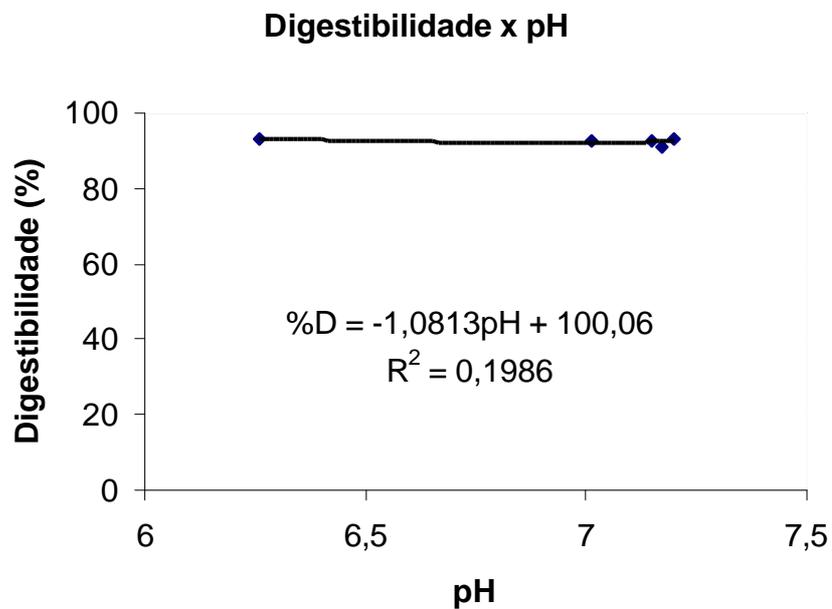


Figura 5 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir da queda de pH (Método 1) e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem animal. Cada ponto representa a média de seis repetições.

O fato de a equação obtida na Figura 2 possuir baixo valor de R^2 deve estar associado à grande queda de pH obtida na caseína, sendo bem abaixo do valor de pH encontrado nas outras amostras. Portanto, esse ponto ficou muito distante dos demais, o que comprometeu o comportamento da equação. Nas equações obtidas nas Figuras 3 e 4, o fato de os valores encontrados na caseína não serem usados permitiu melhores ajustes das equações. Os valores de digestibilidade *in vitro* encontrados a partir das equações obtidas nas Figuras 2, 3 e 4, comparados com os respectivos valores de digestibilidade *in vivo*, estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores de digestibilidade *in vitro* calculados por cada uma das equações a 10 min (Métodos 1 e 2)

Fontes de Proteína	Digestibilidade Verdadeira <i>in vivo</i> (%)	Digestibilidade <i>in vitro</i>					
		Método 1			Método 2		
		Todas as Amostras ¹	Sem Caseína ²	Proteínas Vegetais ³	Todas as Amostras ⁴	Sem Caseína ⁵	Proteínas Vegetais ⁶
Caseína	93,33	92,24	-	-	92,64	-	-
Rã sem osso	93,37	85,83	89,89	-	87,51	89,83	-
CMS	92,57	86,26	90,53	-	85,82	88,52	-
Carne bovina	92,38	90,90	89,84	-	90,71	89,68	-
Rã com osso	91,01	84,69	88,58	-	84,73	87,33	-
Trigo	89,44	87,60	91,14	85,85	86,17	88,85	83,32
PTS	86,41	93,21	90,19	86,58	93,19	85,37	85,38
Milho	82,38	90,63	83,82	84,55	90,45	89,86	85,72
Feijão Pérola	78,70	80,02	80,24	77,72	82,80	84,65	80,18
Soja KTI-LOX-	74,26	76,63	72,03	72,49	75,63	70,30	71,53
Soja	71,76	77,63	74,61	74,11	78,96	77,66	75,80

¹%D = $-32,841\text{pH}^2 + 434,01\text{pH} - 1337,7$ ($R^2 = 0,5263$).

²%D = $-230,65\text{pH}^2 + 3270,9\text{pH} - 11505$ ($R^2 = 0,7904$).

³%D = $-122,53\text{pH}^2 + 1725,3\text{pH} - 5986,7$ ($R^2 = 0,8178$).

⁴%D = $-29,623\text{pH}^2 + 384,14\text{pH} - 1149,2$ ($R^2 = 0,4851$).

⁵%D = $-171,8\text{pH}^2 + 2398\text{pH} - 8277,6$ ($R^2 = 0,6441$).

⁶%D = $-76,947\text{pH}^2 + 1060,1\text{pH} - 3565,4$ ($R^2 = 0,6808$).

Pode-se observar que os valores de digestibilidade *in vitro* obtidos pelas equações 2 e 3 estão mais próximos daqueles de digestibilidade *in vivo*. Com relação à digestibilidade *in vitro* das proteínas de origem animal, a equação 2

foi a que permitiu valores mais próximos quando comparada com a digestibilidade *in vitro* (Tabela 8). Já para as proteínas de origem vegetal, embora a equação 2 tenha possibilitado bons resultados, a equação 3 foi a que levou à obtenção de resultados mais próximos entre as digestibilidades *in vivo* e *in vitro* (Tabela 8).

4.4.1.2. Curvas de digestibilidade em função da queda de pH (medido a 20 min) – Método 2

Para a elaboração das equações de digestibilidade *in vitro* foram anotados os valores de pH observados 20 min após a adição da solução de enzimas. Esses valores foram correlacionados com as respectivas digestibilidades *in vivo* das amostras, sendo escolhido o melhor modelo matemático para descrever o sistema.

As equações elaboradas a partir de valores de pH medidos após 20 min da solução de enzimas estão mostradas nas Figuras 6, 7, 8 e 9.

Na Figura 6 está a equação obtida usando os dados de digestibilidade e queda de pH de todas as fontes protéicas. A equação obtida é polinomial e possui um R^2 de 48,51%. Na Figura 7 foram utilizadas todas as fontes de proteína, à exceção da caseína, obtendo-se, assim, uma equação com R^2 de 64,44%. Já na Figura 8 estão somente as proteínas de origem vegetal, as quais permitiram a obtenção de uma equação polinomial de digestibilidade em função de pH com um valor de R^2 de 68,08%. As equações obtidas nas Figuras 7 e 8 foram as que melhor explicaram o comportamento da queda de pH após 20 min em função da digestibilidade *in vivo*.

A equação obtida pela Figura 9, na qual se utilizaram somente dados de proteínas de origem animal, foi a que permitiu o pior ajuste, com um valor de R^2 de 16,15%, sendo, então, a equação que menos explicou o comportamento da digestibilidade *in vitro* em relação aos valores de digestibilidade *in vivo*. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de os valores de digestibilidade das proteínas de origem animal serem muito próximos e de, ao medir a queda de pH, os valores de pH encontrados em cada fonte protéica terem diferido, embora as digestibilidades *in vivo* fossem muito próximas.

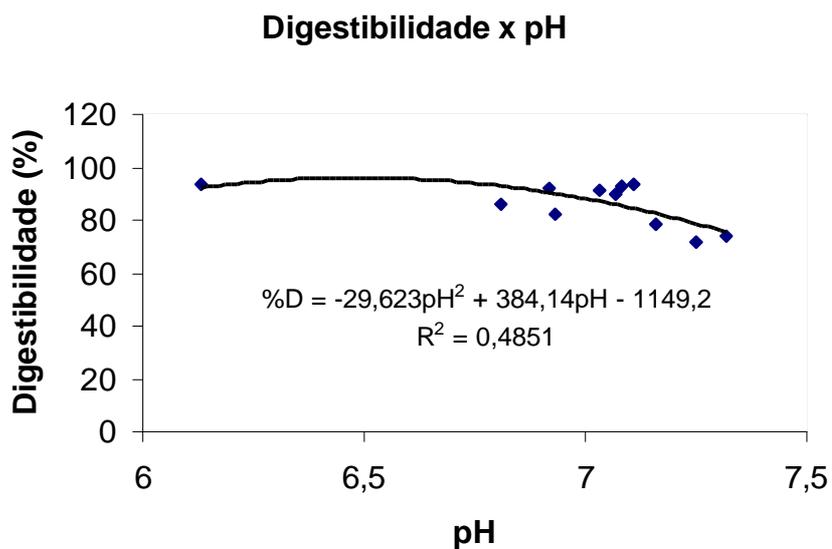


Figura 6 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir da queda de pH (Método 2) e da digestibilidade *in vivo* de todas as proteínas estudadas. Cada ponto representa a média de seis repetições.

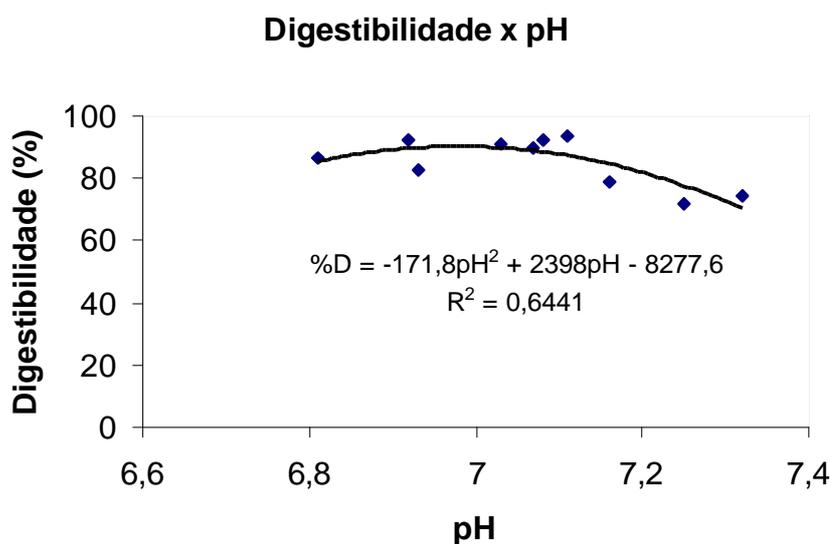


Figura 7 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir da queda de pH (Método 2) e da digestibilidade *in vivo* de todas as proteínas estudadas, exceto a caseína. Cada ponto representa a média de seis repetições.

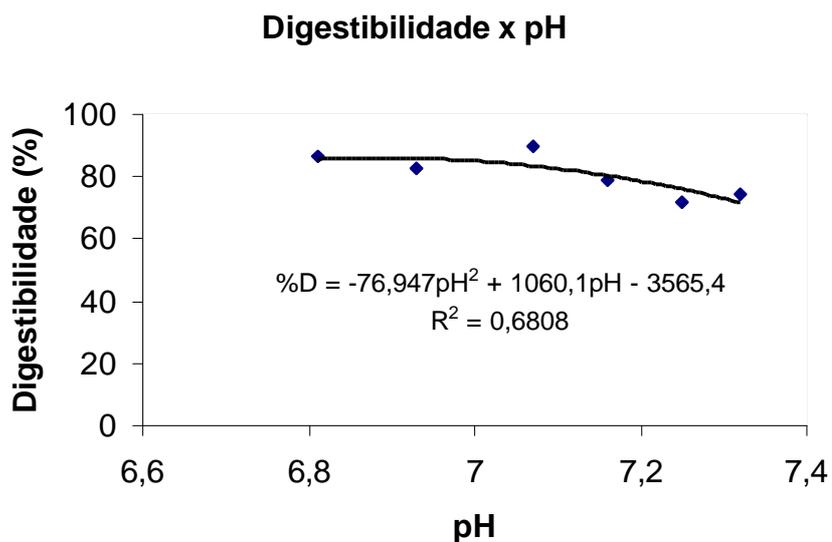


Figura 8 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir da queda de pH (Método 2) e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem vegetal. Cada ponto representa a média de seis repetições.

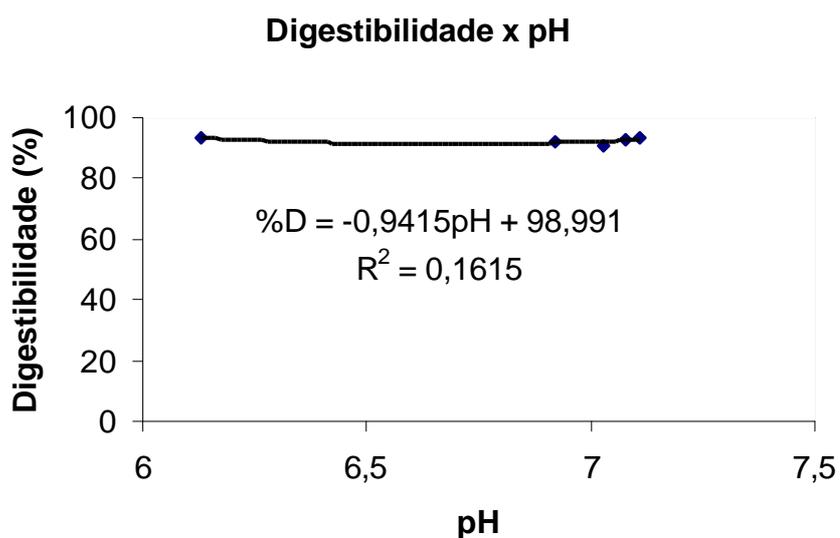


Figura 9 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir da queda de pH (Método 2) e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem animal. Cada ponto representa a média de seis repetições.

Como aconteceu nas equações obtidas a 10 min (Método 1) das equações de digestibilidade *in vitro* confeccionadas com valores de pH coletados após 20 min, aquela na qual foi usada a caseína proporcionou o pior ajuste (Figura 6).

Os valores de digestibilidade *in vitro* encontrados a partir das equações obtidas nas Figuras 6, 7 e 8, comparados com os respectivos valores de digestibilidade *in vivo*, estão apresentados na Tabela 8.

Ao comparar as equações obtidas a 10 min (Método 1) e a 20 min (Método 2), pode-se observar que aquelas feitas a partir de dados de pH coletados após 10 min foram as que permitiram obter valores de digestibilidade *in vitro* mais próximos aos de digestibilidade *in vivo*, independentemente da presença ou ausência de caseína. Pode-se notar na Tabela 8 que as digestibilidades *in vitro* calculadas pelas três equações levaram à obtenção de valores mais distantes da digestibilidade *in vivo* que aqueles calculados pela equações de queda de pH após 10 min (Tabela 8).

4.4.2. Método do pH estático (Método 3)

Para a determinação da digestibilidade *in vitro* pelo método do pH estático, foi medido o volume de solução de NaOH 0,1 N adicionado necessário para manter em 8,0 o pH da solução de proteínas após a adição da solução de enzimas (tripsina+pancreatina), independentemente do tempo.

As equações obtidas pelas Figuras 10 e 11 foram as que permitiram a obtenção de melhores ajustes com valores de R^2 de 84,98 e 83,78%, respectivamente. Para a obtenção da equação da Figura 10, foram utilizadas todas as fontes protéicas e para a equação da Figura 11, todas as proteínas, à exceção da caseína. As equações que menos explicaram o comportamento da digestibilidade em função do volume de NaOH 0,1 N adicionado foram aquelas obtidas por meio das Figuras 12 e 13, as quais foram confeccionadas usando-se apenas as proteínas de origens vegetal e animal, respectivamente, permitindo a obtenção de um R^2 de 43,29% (Figura 12) e de 26,64% (Figura 13).

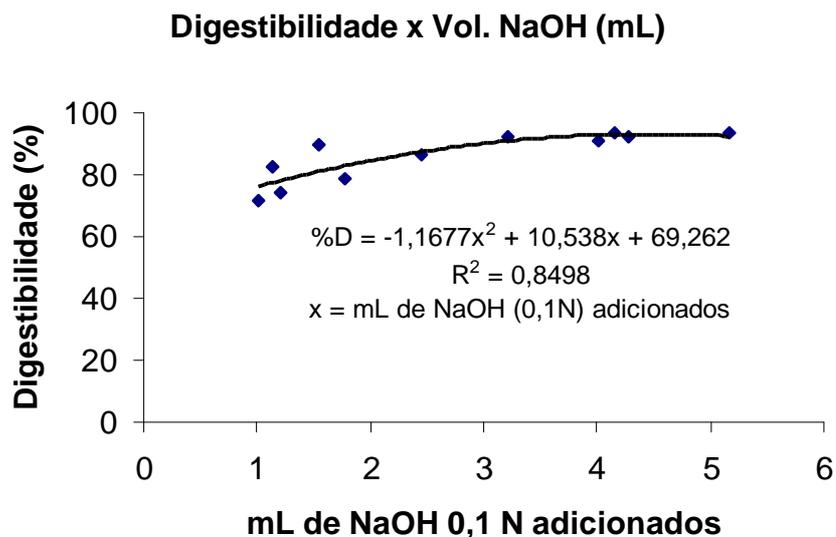


Figura 10 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 e da digestibilidade *in vivo* de todas as proteínas estudadas (Método 3). Cada ponto representa a média de seis repetições.

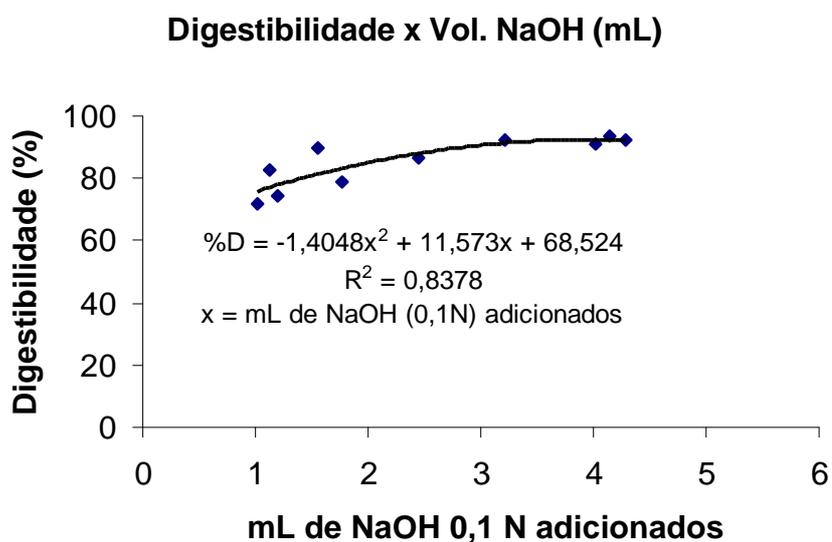


Figura 11 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 e da digestibilidade *in vivo* de todas as proteínas estudadas, exceto a caseína (Método 3). Cada ponto representa a média de seis repetições.

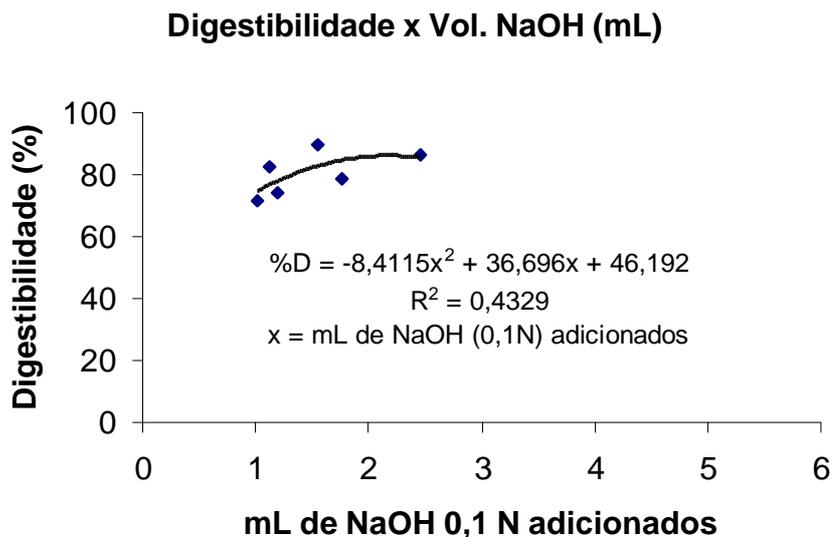


Figura 12 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem vegetal (Método 3). Cada ponto representa a média de seis repetições.

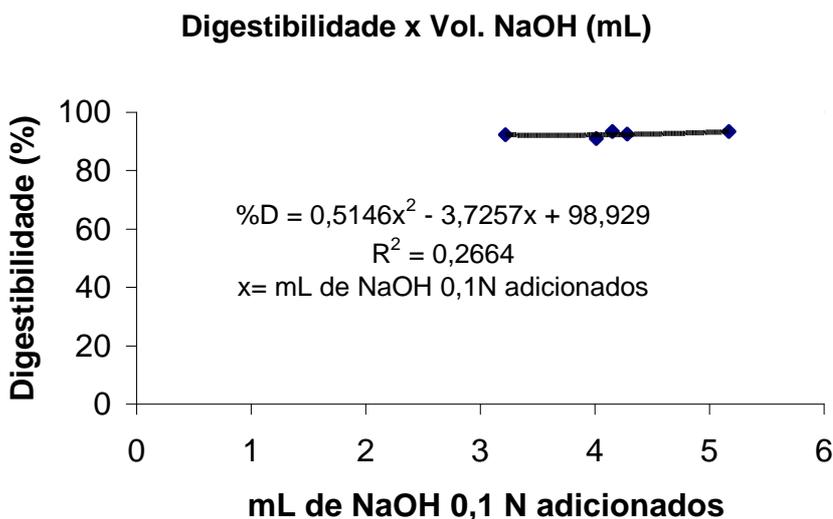


Figura 13 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem animal (Método 3). Cada ponto representa a média de seis repetições.

Os resultados da digestibilidade *in vitro* calculados utilizando-se cada uma das equações obtidas pelo método do pH estático (Método 3) estão apresentados na Tabela 9. As equações obtidas com todas as proteínas e a equação obtida sem a presença de caseína permitiram a obtenção de valores de digestibilidade *in vitro* bem próximos aos da digestibilidade *in vivo*, principalmente com relação a proteínas de origem animal. Já na equação obtida usando somente as proteínas de origem vegetal os valores de digestibilidade *in vitro* se mostraram um pouco distantes em relação aos de digestibilidade *in vivo*. Para o cálculo de digestibilidade *in vitro* pelo método do pH estático, pode ser observado que ele se torna mais eficiente na presença das proteínas de origem animal juntamente com as de origem vegetal. Quando se trabalha somente com proteínas de origem vegetal, a correlação da digestibilidade *in vitro* com a *in vivo* é baixa, uma vez que o R² foi de apenas 43,29%.

Tabela 9 – Valores de digestibilidade *in vitro* calculados por cada uma das equações pelo método do pH estático (Método 3)

Fontes de Proteína	Digestibilidade Verdadeira <i>in vivo</i> (%)	Todas as Amostras ¹	Sem Caseína ²	Proteínas Vegetais ³
Caseína	93,33	92,53	-	-
Rã sem osso	93,37	92,74	92,34	-
CMS	92,57	92,88	92,36	-
Carne bovina	92,38	92,97	92,32	-
Rã com osso	91,01	91,09	91,22	-
Trigo	89,44	82,79	83,09	82,86
PTS	86,41	79,68	79,81	76,92
Milho	82,38	78,71	78,78	74,67
Feijão Pérola	78,70	88,07	88,45	85,61
Soja KTILOX	74,26	80,23	80,39	78,11
Soja	71,76	84,26	84,61	84,79

¹%D = -1,1677x² + 10,538x + 69,262 (R² = 0,8498).

²%D = -1,4048x² + 11,573x + 68,524 (R² = 0,8378).

³%D = -8,4115x² + 36,696x + 46,192 (R² = 0,4329).

em que: x = mL de NaOH (0,1 N) adicionados.

Dados de digestibilidade *in vitro* de proteínas de feijão, utilizando-se o sistema pepsina-pancreatina (PEREIRA, 1998; MELITO; TOVAR, 1995; RODRIGUES, 1995; ANTUNES et al., 1995), não foram correlacionados com os ensaios *in vivo*, sendo os resultados apresentados em porcentagem de hidrólise.

Bodwell et al. (1980) e Satterlee et al. (1979) empregaram os métodos com um solução de enzimas contendo tripsina, quimotripsina e peptidase para determinação da digestibilidade protéica *in vitro* e sua correlação com os ensaios *in vivo*, em diferentes fontes protéicas, porém não verificaram a digestibilidade e a correlação de feijões através dessas técnicas.

Pires (2002), estudando a digestibilidade de 11 variedades de feijão, encontrou para digestibilidade *in vitro* valores em média de 70,5% daqueles de digestibilidade *in vivo*. Marques e Lajolo (1981) verificaram que a digestibilidade *in vitro* (21, 40 e 31%) é menor que a *in vivo* (71, 69 e 72%) nas variedades Carioca, Rosinha G2 e Rico, respectivamente.

Cardoso (2003) determinou a digestibilidade *in vitro* de genótipos de soja pelo sistema pepsina-pancreatina, de acordo com o método de Saunders et al. (1973). Ele constatou, para a porcentagem de digestibilidade *in vitro* em relação à digestibilidade *in vivo*, valores que variaram de 5,28 a 5,60% na farinha de soja crua, de 10,54 a 25,32% na farinha processada a 120 °C/9 min, de 12,38 a 22,54% na farinha processada a 120 °C/12 min, de 11,55 a 36,43% na farinha processada a 120 °C/15 min e de 18,53 a 29,02% na farinha processada a 120 °C/18 min.

Pelo método do pH estático para digestibilidade *in vitro*, Cruz (2003) obteve os maiores valores de R² comparados com os ensaios de digestibilidade *in vivo* de diferentes variedades de feijões recém-colhidos e armazenados. O método permitiu obter valores de R² que variaram de 0,75 a 0,83%.

Os métodos ajustados neste trabalho para proteínas de origens animal e vegetal proporcionaram, portanto, valores de digestibilidade *in vitro* bem próximos daqueles *in vivo*, permitindo, assim, o uso dessas metodologias como uma forma rápida e barata para a predição da digestibilidade de proteínas.

As equações desenvolvidas pelo método do pH estático permitiram a obtenção de valores de digestibilidade *in vitro* com alto grau de correlação com

os resultados de digestibilidade *in vivo*. Tal fato indica a possibilidade de utilização, pelas indústrias de alimentos, de ensaios da digestibilidade *in vitro* de produtos alimentícios, desde que sejam devidamente respeitados todos os critérios adequados para o uso desse parâmetro bioquímico.

As Figura 14 a 24 ilustram os diferentes valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* (Métodos 1, 2 e 3) em cada fonte de proteína.

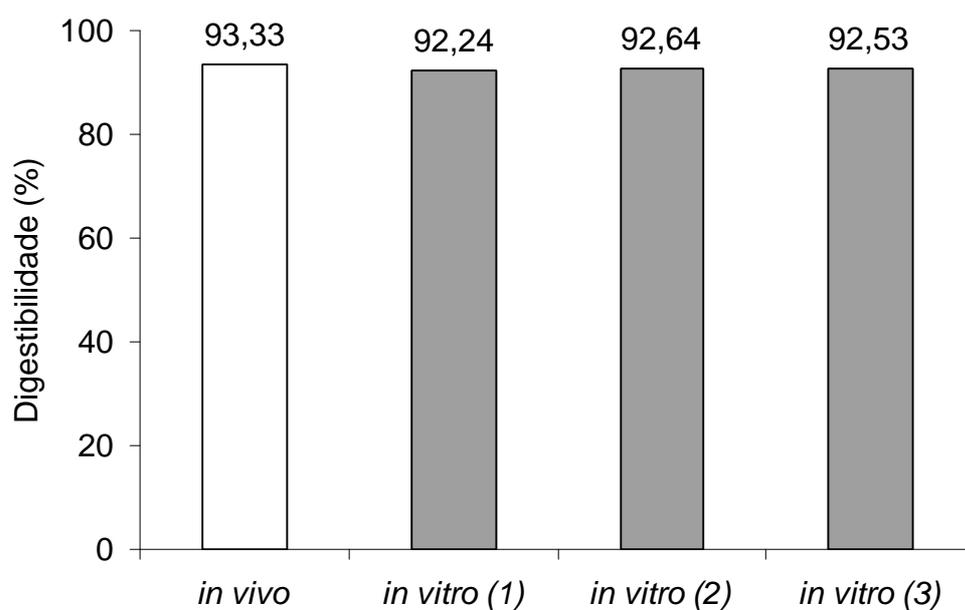


Figura 14 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* (Métodos 1, 2 e 3) de caseína pelos Métodos 1, 2 e 3.

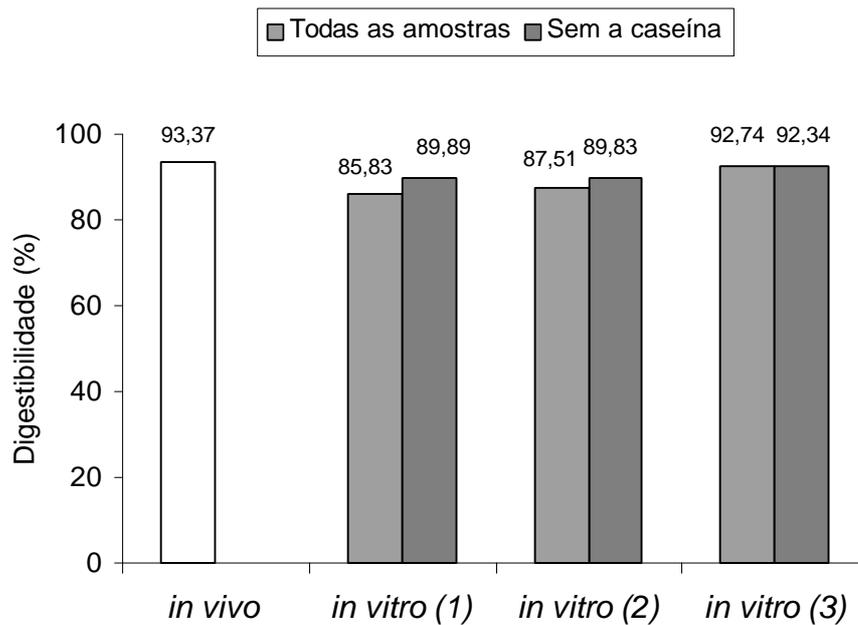


Figura 15 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* (Métodos 1, 2 e 3) de carne de rã sem osso pelos Métodos 1, 2 e 3.

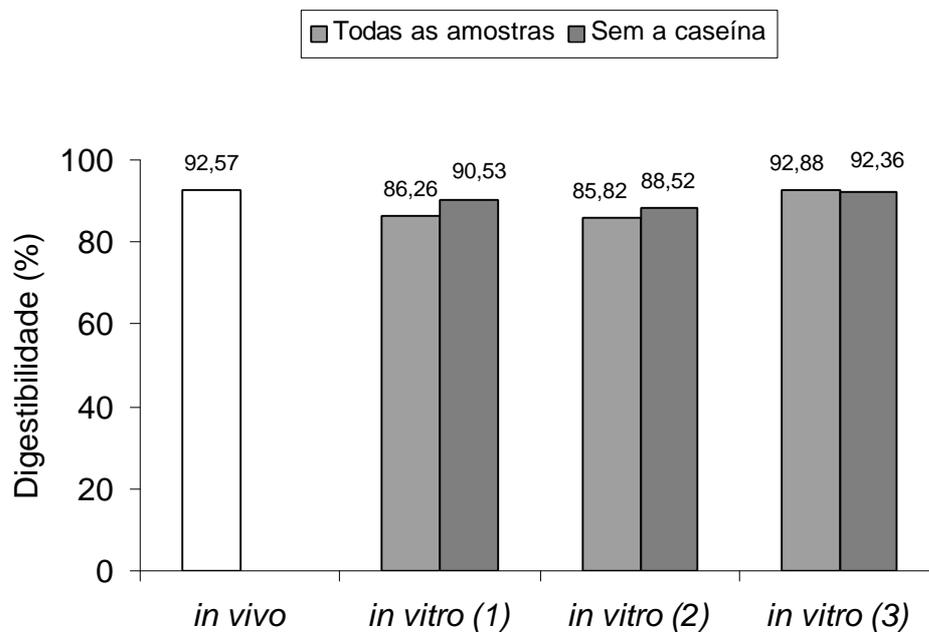


Figura 16 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* (Métodos 1, 2 e 3) de carne de rã mecanicamente separada (CMS).

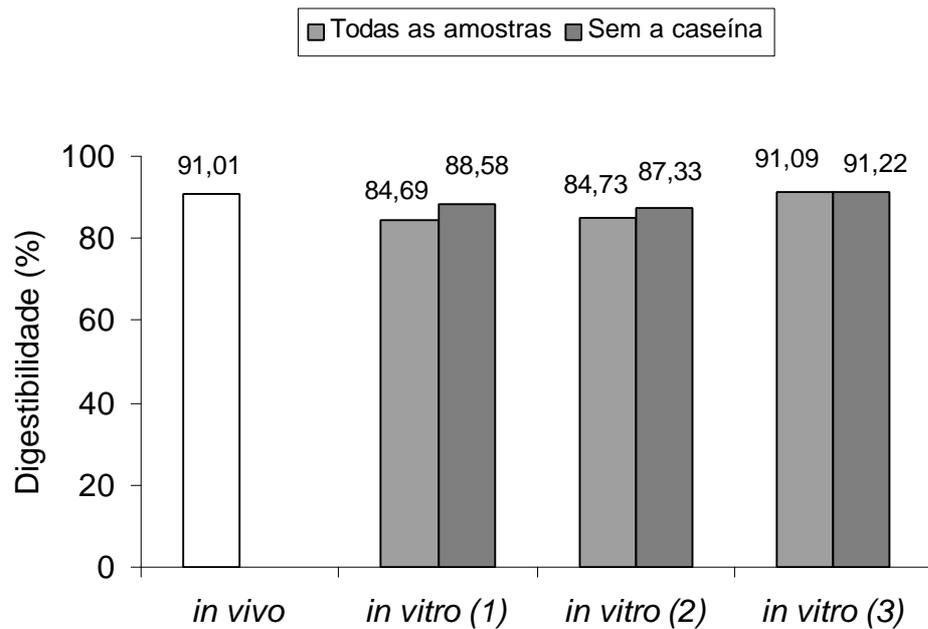


Figura 17 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* (Métodos 1, 2 e 3) de carne de rã com osso.

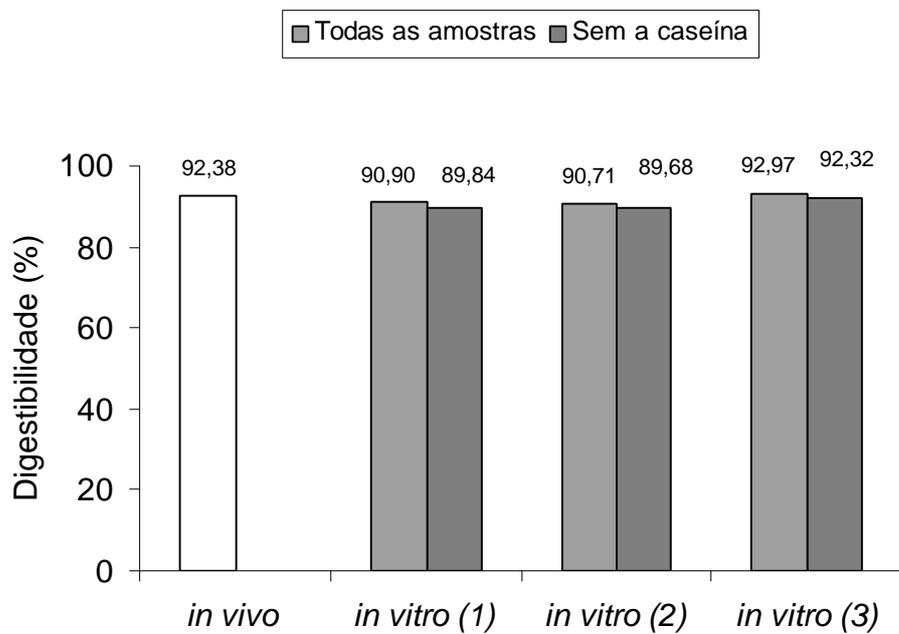


Figura 18 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* (Métodos 1, 2 e 3) de carne bovina.

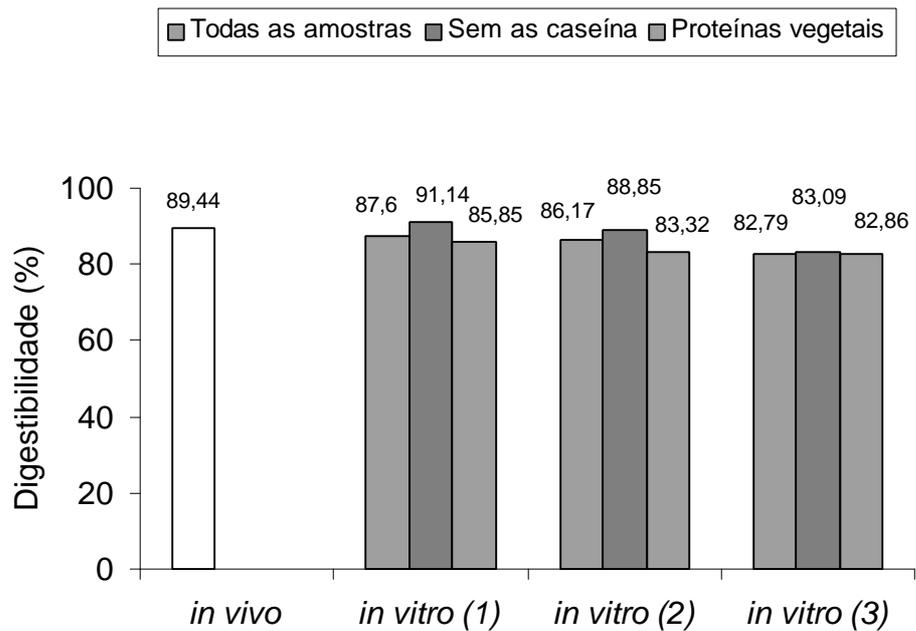


Figura 19 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* (Métodos 1, 2 e 3) de trigo.

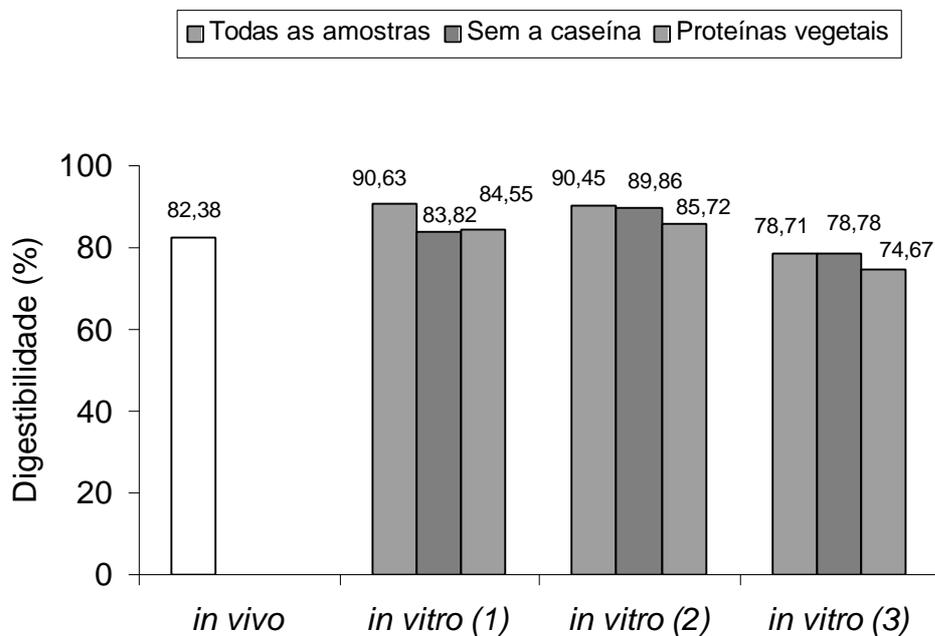


Figura 20 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* (Métodos 1, 2 e 3) de milho.

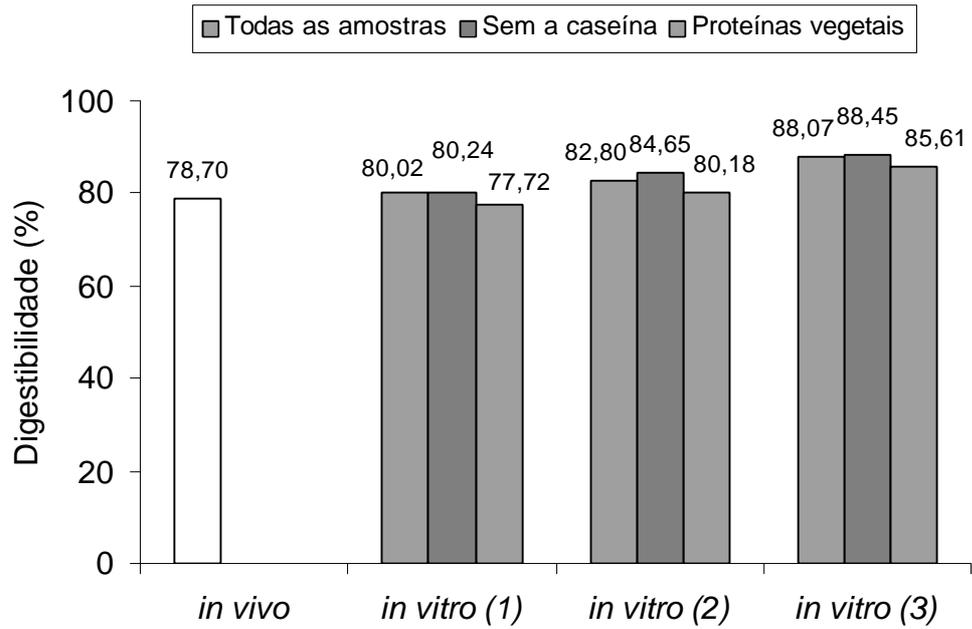


Figura 21 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* (Métodos 1, 2 e 3) de feijão.

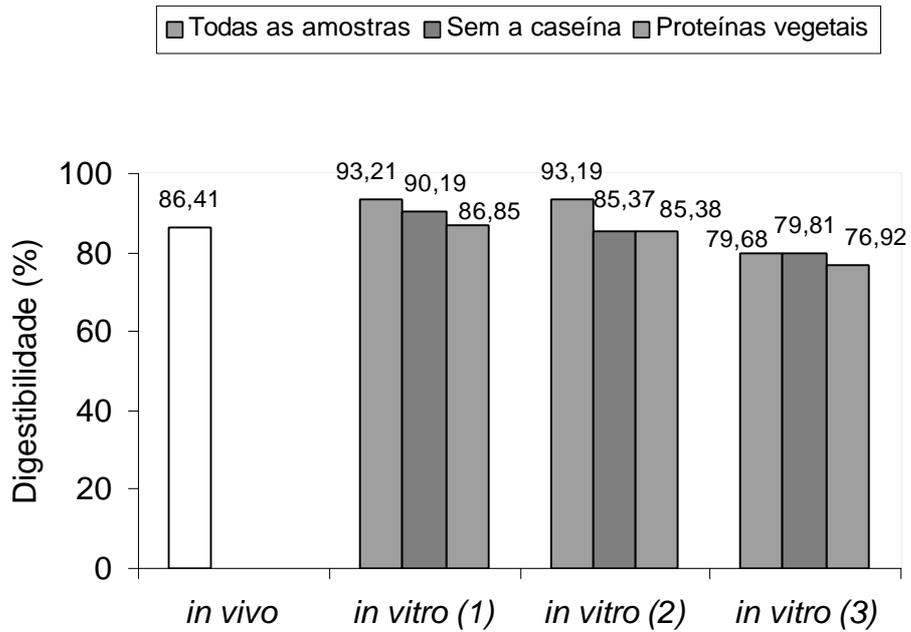


Figura 22 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* (Métodos 1, 2 e 3) de proteína texturizada de soja.

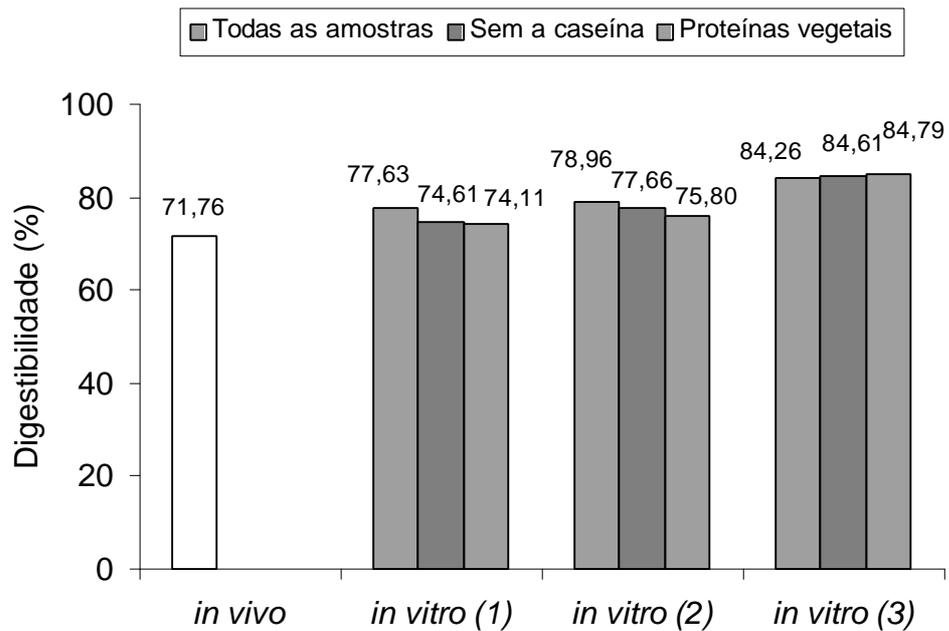


Figura 23 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* (Métodos 1, 2 e 3) de soja convencional.

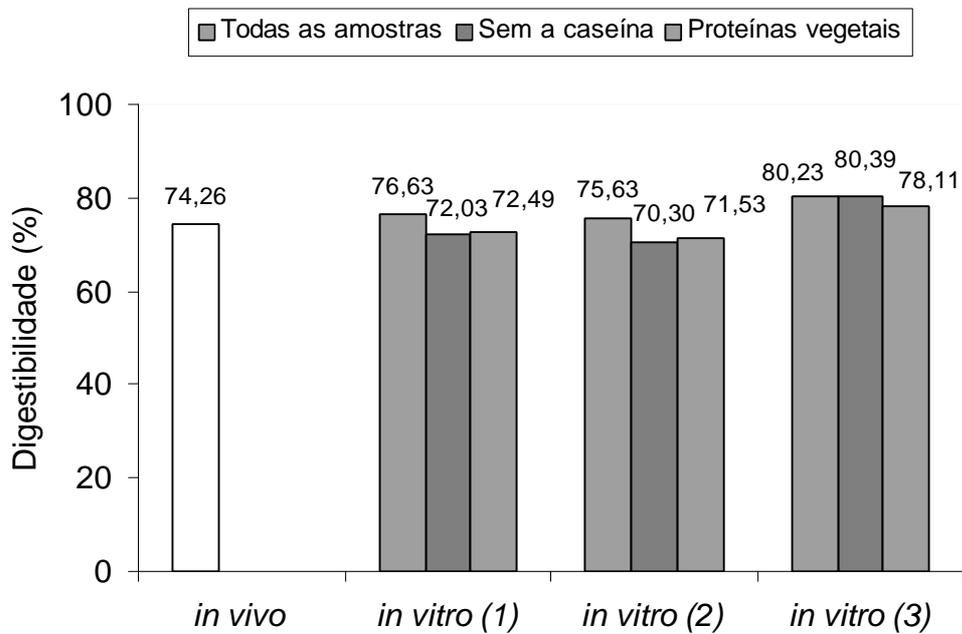


Figura 24 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* (Métodos 1, 2 e 3) de soja KTI'LOX.

4. CONCLUSÕES

As proteínas de origem animal apresentaram os maiores valores de digestibilidade verdadeira que as de origem vegetal. A carne de rã sem osso foi a proteína com maior digestibilidade, porém não diferiu das amostras de carne de rã com osso e carne de rã mecanicamente separada, indicando que o processo de obtenção da carne de rã não interferiu significativamente ($p < 0,05$) na digestibilidade protéica verdadeira.

Das proteínas de origem animal, o ovo em pó foi aquela que apresentou menor digestibilidade protéica. A proteína texturizada de soja exibiu valor de digestibilidade protéica superior aos da soja convencional e da soja isenta de inibidor de tripsina Kunitz e de lipoxigenases, evidenciando melhora na digestibilidade da proteína de produtos à base de soja submetidos a processamento térmico. Com relação aos valores de PER e NPR, soja convencional e soja KTI'LOX' não apresentaram diferença ($p < 0,05$), enquanto o milho exibiu menor valor de PER que todas as fontes protéicas.

Nenhuma das proteínas de origem animal apresentou aminoácidos essenciais limitantes quando comparadas com o padrão da FAO/WHO.

O mecanismo de obtenção da carne de rã não casou limitação em nenhum dos aminoácidos essenciais, uma vez que as três fontes de carne de rã possuíram escore químico aminoacídico superior a 1 em todos os aminoácidos.

Feijão, soja, soja KTI'LOX e PTS tiveram os aminoácidos sulfurados (metionina+cisteína) como limitantes, enquanto no trigo e milho o aminoácido mais limitante foi a lisina. Trigo e milho foram às proteínas de mais baixa qualidade ao se avaliar o escore químico aminoacídico, pois tiveram como limitantes, além da lisina, os aminoácidos isoleucina, metionina+cisteína, treonina e valina.

Ao ser avaliado quanto à digestibilidade, a proteína do trigo se mostrou de boa qualidade, entretanto, ao serem analisados os valores de PER, NPR e PDCAAS, pôde-se concluir que se trata de uma proteína de baixo valor biológico.

Soja KTI'LOX e PTS apresentaram valores de PDCAAS superiores aos da soja convencional, evidenciando, portanto, uma elevação na qualidade protéica da soja melhorada geneticamente e da proteína de soja processada.

A digestibilidade *in vitro* foi calculada por meio de nove equações, três pelo método da queda do pH após 10 min, três pela queda do pH após 20 min e três pelo método do pH estático.

No método da queda do pH após 10 min, as melhores equações que correlacionam digestibilidade com queda de pH foram obtidas quando se trabalhava sem a caseína. Obtendo-se valores de R^2 de 79,04 e 81,78%, respectivamente, em todas as fontes, exceto a caseína, e proteínas de origem vegetal. O mesmo ocorreu pelo método da queda do pH após 20 min. Entretanto, os valores de R^2 obtidos aqui foram todos inferiores aos encontrados após 10 min da adição da solução de enzimas.

No método do pH estático, quando se correlacionou a digestibilidade com o volume de NaOH necessário para manter em 8,0 o valor de pH, as melhores equações foram obtidas quando se trabalhou com todas as proteínas (R^2 de 84,98%) e aquela na qual estava ausente somente a caseína (R^2 de 83,78%). Já, quando se trabalhava somente com proteínas de origem vegetal, obtinha-se o menor ajuste com um R^2 de 43,29%.

Para a predição da digestibilidade *in vitro*, o melhor método foi aquele do pH estático (Método 3), pois permitiu a obtenção de equações com melhores ajustes, podendo ser aplicada em todas as fontes de proteína.

Como o método do pH estático permitiu a obtenção de maiores valores de R^2 , isso usando todas as fontes protéicas, os resultados indicam uma

possibilidade da utilização, pelas indústrias de alimentos, de ensaios da digestibilidade *in vitro* por esse método, desde que sejam devidamente respeitados todos os critérios adequados para a utilização desse parâmetro bioquímico.

O uso de técnicas *in vitro* para a determinação da digestibilidade protéica trará uma série de benefícios, pois requer menos tempo, é mais barato e necessita de menos mão-de-obra e espaço físico. Essa técnica permite que as análises sejam realizadas em um laboratório simples, necessitando apenas de um banho-maria, um pH metro e um “freezer” para armazenamento das amostras e das enzimas, além de gastar pequena fração da fonte de proteína, ao contrário do que acontece em ensaios *in vivo*, em que é preciso muito material para o preparo das dietas. Por meio dessa técnica, evita-se também trabalhar com ratos, os quais, ao serem usados nos ensaios *in vivo*, devem ser sacrificados no final do experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A. Pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **J. Nutr.**, v. 83, p. 257-261, 1964.

ANGELIS, R. C. de. Métodos biológicos de avaliação do valor nutricional de proteínas. **Alimentação**, São Paulo, n. 50, p. 51-54, out. 1999.

ANTUNES, P. L.; BILHALVA, A. B.; ELIAS, M. C.; SOARES, G.J.D. Valor Nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) cultivares Rico 23, Carioca, Pirata-1 e Rosinha – G2. **Rev. Brás. Agroc.**, v. 1, n. 1, p. 12-18, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington, 1975. 1094 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Washington, 1995.

BENDER, A. E.; DOELL, B. H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal Nutrition**, v. 11, p. 138-143, 1957.

BIDLINGMEYER, B. A.; COHEN, S. A.; TARVIN, T. L. Rapid analysis of aminoacids using pre-column derivatization. **J. Cromatogr.**, v. 336, n. 1, p. 93-104, 1984.

BLANCO, A.; BRESSANI, R. Biodisponibilidad de aminoácidos in el frijol (*Phaseolus vulgaris*). **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 41, n. 1, p. 38-51, 1991.

BODWELL, C. E.; SATTERLEE, L. D.; HACKLER, L. R. Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by in vitro enzimic digestion methods. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 33, p. 677-686, 1980.

BORSOI, M. A. **Nutrição e dietética**: noções básicas. São Paulo: SENAC-SP, 2001.

BRESSANI, R. Revisión sobre la calidad del grano de frijol. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 39, n. 3, p. 419-442, 1989.

BROWN, W. L.; BRESSANI, R.; GLOVERE, D. V. **Quality protein**. Washington, D. C.: National Academy Press, 1998. p. 18-56.

BUCHMANN, N. B. In vitro digestibility of protein from barley and others cereals. **J. Sci. Food. Agric.**, v. 30, p. 538-589, 1979.

BURNS, R. A. Protease inhibitors in processed plant foods. **J. Food Prot.**, v. 50, p. 161-166, 1987.

CARDOSO, L. R. **Caracterização bromatológica e digestibilidade in vitro e in vivo de proteínas de farinhas de soja**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CASSIDY, A. Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 55, p. 399-417, 1996.

CHEFTEL, J. C. Proteins and amino acids. In: TANNENBAUM, S. R. (Ed.). **Nutritional and safety aspects of food processing**. New York, NY: Marcel Dekkar, 1979. p. 153-215.

CHIARADIA, A. C. N. **Determinação da estrutura de pigmentos de feijão e estudo da sua ação na qualidade protéica**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 107 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

COSTA, N. M. B.; PAES, M. C. D.; GUIMARÃES, P. E. O. Avaliação da qualidade protéica do milho QMP. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 1996, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1996. p.153.

CRUZ, G. A. D. R. **Efeito do armazenamento sobre a digestibilidade e qualidade protéica de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 95 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CRUZ, G. A. D. R.; OLIVEIRA, M.G.A.; PIRES, C.V.; GOMES, M.R.A.; COSTA, N.M.B.; BRUMANO, M.H.N.; MOREIRA, M.A. Protein quality and *in vivo* digestibility of different varieties of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 157-162, 2003.

DOUGLAS, M. E.; PARSONS, C. M.; HYMOWITZ, T. Nutrition evaluation of lectin free soybeans for poultry. **Poultry Sci.**, v. 78, p. 91-95, 1998.

DUARTE, M. S. L. **Digestibilidade *in vivo* e *in vitro* de proteínas de feijão preto**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 63 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; VANNUCCHI, H. The protein requirement of brazilian rural works studies with a rice and a bean a diet. In: RAND, W. M. **Protein-energy requirements of developing countries: results of international research**. Tokio: United University, 1983. p. 98-114.

FAO/OMS. INFORME DE UNA REUNIÓN CONSULTIVA CONJUNTA FAO/OMS/UNU DE EXPERTOS. **Necessidades de energia y de proteínas**. Ginebra, 1985. 220 p.

FIDELIS, I. C. **Qualidade protéica e biodisponibilidade de ferro e cálcio em carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*, SHAW 1802)**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Energy and protein requirements**. Geneva, 1985. 724 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Protein quality evaluation**. Rome, 1991. 66 p. (FAO Food and Nutrition, Paper 51).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Protein quality evaluation: report of a joint FAO/WHO expert consultation group**. Rome: FAO/WHO, 1990.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/World Health Organization. **Report of the FAO/WHO working group on analytical issues related to food composition and protein quality**. Rome, Italy: FAO, 2001.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins form different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 6-29, 1996.

GOMES, J. C.; MAGALHÃES, E. C. S.; PEREIRA, C. A. S. Avaliação do efeito de Bipiri (paraquat) em cultura de soja quanto às características nutricionais de proteína do farelo desengordurado. **Ciências Agrotecnológicas**, v. 24, n. 4, p. 961-967, 2000.

GUEN, M. P.; BIRK, Y. Portease inhibitors from legume seeds: nutritional effects, mode of action and structure-function relationship. In: van der POEL, A. F. B.; HUISMAN, J.; SAINI, H. S. **Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds**. [S.l.: s.n.], 1993. p.157-171.

HEGSTED, D. M. **Protein quality and its determination**. In: WHITAKER, J. R.; TANNENBAUM, S. R. **Food proteins**. Westport, Connecticut: AVI, 1977. p. 347-362.

HENLEY, E. C.; KUSTER, J. M. Protein quality evaluation by protein digestibility corrected amino acid scoring. **Food Technology**, v. 4, p. 74-77, 1994.

HERKELMAN, K. L.; CROMWELL, G. L.; PFEIFFER, T. W.; KNABE, D. A. Apparent digestibility of amino acids in raw and heated conventional and low trypsin inhibitor soybeans for pigs. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 818-826, 1992.

HERNÁNDEZ, M.; LA VEJA, A.; SOTELO, A. Determination de la digestibilidad proteínica *in vitro* e *in vivo* en cereais y leguminosas, crudos e cocidos. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 34, n. 3, p. 513-522, 1984.

HSU, H. W.; VAVAK, D.L.; SATERLEE, L.D.; MILLER, G.A. Multienzyme technique for estimating protein digestibility. **J. Food Sci.**, v. 42, n. 5, p. 1269-1273, 1977.

HURRELL, R. F. Reactions of food proteins during processing and storage and their nutritional consequences. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.). **Developments in food proteins**. London, England: Applied Science Publishers, 1984. p. 213-244.

JOHNSTON, J.; COON, C. N. A comparison of six protein quality assays using commercially available protein meals. **Poultry Sci.**, v. 58, p. 919-927, 1979.

JOINT FAO/WHO/UNU. **Expert consultation on energy and protein requirements**. Rome: WHO, 1981. (Report.Geneva – WHO-Technical Report Series, 724).

KAUR, J. R.; KAPOOR, A. C. Nutrient composition and antinutritional factors of rice and bean (*Vigna umbellate*). **Food Chem.**, v. 43, n. 22, p. 119-124, 1992.

LAJOLO, F. M.; TIRAPEGUI, J. Proteínas e aminoácidos. In: OLIVEIRA, J.E.D. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. cap. 3, p. 41-65.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 1, n. 34, p. 31-67, 1994.

LIENER, I. E. Phytohemagglutinins (phytolectins). **Ann. Rew. Plant Physiol.**, v. 27, p. 291-319, 1976.

LIU, K. Celular biological and physicochemical basis for the hard-to-cook defect in legumes seeds. CRC. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 263, 1995.

LUJAN, D. L. B. **Variedades de feijão e efeitos na qualidade protéica, na glicemia e nos lipídios sanguíneos em ratos**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MAGA, J. A.; LORENZ, K.; ONAYEMI, O. Digestive acceptability of proteins as measured by the initial rate of in vitro proteolysis. **J. Food Sci.**, v. 38, p. 173-174, 1973.

MARQUEZ, U. M. L.; LAJOLO, F. M. Composition and digestibility of albumin, globulins and glutelins from Phaseolus vulgaris. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 1211-1215, 1981.

MARTINEZ, W. H.; HOPKINS, D. T. Cottonseed products: variation in protein quality with product and process. In: FRIEDMAN, M. (Ed.). **Protein nutritional quality of foods and feeds**, Part 2. New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 1975. p. 355-374.

MAURON, J.; MOTTO, F.; BUJARD, E.; EGLY, R. H. The availability of lysine, methionine and tryptophan in condensed milk and milk powder. In vitro digestion studies. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 59 p. 433-451, [s.d.].

McDONOUGH, F. E.; STEINKE, F. H.; SARWAR, G.; EGGUM, B. O.; BRESSANI, R. In vivo rat assay for the protein digestibility: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 73, p. 801-805, 1990.

MELITO, C.; TOVAR, J. Cell walls limit in vitro protein digestibility in processed legume seed. **Food Chem.**, v. 53, p. 305-307, 1995.

MERTZ, E. T. et al. Pepsin digestibility of proteins in sorghum and other major cereals. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, p. 1-2, 1984.

MITCHELL, H. A. A method of determining the biological value of proteins. **Journal Biology Chemistry**, v. 58, p. 873-922, 1923.

MONTEIRO, J. B. R.; COSTA, N. M. B.; ESTEVES, E. A.; MILAGRES, K. H. Avaliação da qualidade protéica de dois formulados em pó, à base de soja enriquecidos com zinco, selênio e magnésio para utilização em nutrição enteral. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 1, p. 006-010, 2004.

MONTEIRO, M. R. P.; MOREIRA, M. A.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V. Avaliação da digestibilidade protéica de genótipos de soja com ausência e presença do inibidor de tripsina kunitz e lipoxigenases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 1, p. 99-107, 2003.

NACZK, M.; NICHOLS, T.; PINK, D.; SOSULSKI, F. Condensed tannins in canola hulls. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, n. 10, p. 2196-2200, 1994.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002.

NIELSEN, S. S. **Food analysis**. 2. ed. West Lafayette, Indiana, 1998.

OLIVEIRA, J. E. D. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998.

OLIVEIRA, J. E.; SANTOS, A. C.; WILSON, E. D. **Nutrição básica**. São Paulo:

ONYANGO, C.; HORST NOETZOLD, H.; BLEY, T.; HENLE, T. Proximate composition and digestibility of fermented and extruded uji from maize-finger millet blend. *Lebensm-Wiss. U.-Technol.*, v. 37, p. 827-832, 2004.

PAREDES-LOPEZ, O.; SERNA-SALDIVAR, S. O.; GUZMAN-MALDONADO, H. In: EL COLEGIO DE SINALOA (Ed.). **Los alimentos mágicos de las culturas indígenas de México, el caso de la tortilla culiacan**. Sinaloa, México, 2000.

PARTEARROYO, M. A.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; CID, C. Sustancias antinutritivas en alimentos de origen vegetal. Su significado en la alimentación humana. *Alimentaria*, v. 267, p. 115-120, 1995.

PEDERSEN, B.; EGGUM, B. O. Prediction of protein digestibility by in vitro enzymatic pH-stat procedure. *Z. Tierphysiol., Tierernahrg. U. Futtermittelkde*, v. 49, p. 265-277, 1983.

PEREIRA, C. A. S. **Digestibilidade in vitro e in vivo de proteínas de feijão preto sem casca**. Viçosa, MG: UFV, 1988. 72 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PIRES, C. V. **Caracterização bromatológica e digestibilidade in vitro de proteínas de cultivares de feijão (Phaseolus Vulgaris L.)**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 84f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PIRES, I. S. C. **Carne de novilhos precoces alimentados com diferentes fontes lipídicas: valor nutricional e efeitos sobre a lipemia de ratos**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 114 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

POEL, T. F. B.; BLONK, J.; ZUILICHEM, D. J.; OORT, M. G. Thermal inactivation of lectins and trypsin inhibitor activity during steam processing of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) and effects on protein quality. *J. Sci. Food Agric.*, v. 53, n. 2, p. 215-228, 1990.

QUEDRAOGO, C. L.; COMBE, E.; LALLES, J.P.; TOULLEC, R.; TRECHE, S.; GRONGNET, J.F. Nutritional value of the proteins of soybeans roasted at a small-scale unit level in Africa as assessed using growing rats. *Reprod Nutr.*, v. 39, p. 201-12, 1999.

RACKIS, J. J.; GUMBMANN, M. R. Protease inhibitors: physiological properties and nutritional significance. In: ORY, R. L. (Ed.). **Antinutrients and natural toxicants in food**. Westport, CT: Food & Nutrition Press Inc., 1981. p. 203-207.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of nutrition ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RODRIGUES, M. L. G. **Digestibilidade e biodisponibilidade de metionina de frações protéicas do feijão (*Phaseolus vulgaris*): estudo *in vitro***. São Paulo, SP: USP, 1995. 217 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. **Rev. Nutr.**, v. 18, n. 1, p. 75-83, 2005.

ROSA, J. C.; IZUMI, C.; BELTRAMINI-SABBAG, L. M.; GREENE, L. J. Quantitative HPLC analysis of phenylisothio-carbamyl-amino acids at picomol levels. XVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica (SBBq) – Caxambu, MG, 22 a 25/04/87 – **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 30, n. 1, p. 35, 1987.

SANTOS, J. E.; HOWE, J. M.; DUARTE, F. A. M.; DUTRA DE OLIVEIRA, J. E. Relationship between the nutritional efficacy of a rice and bean diet and energy intake in pre-school children. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 32, p. 1541-4, 1979. Sarvier, 1982.

SARWAR, G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 758-764, 1997.

SATERLEE, L. D.; MARSHALL, H. F.; TENNYSON, J. M. Measuring protein quality. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, v. 56, p. 103-109, 1979.

SAUNDERS, R. M.; CONNOR, A. N.; BOOTH, E. M.; KOHLER, G. O. measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by in vivo and in vitro methods. **J. Nutr.**, v. 103, p. 530-535, 1973.

SCHAAFSMA, G. **Nutritional appreciation of proteins**. Zeist, The Netherlands: Nutrition and Food Research Institute, 1994. (Report V94. 135, TNO).

SCHWASS, D. E.; FINLEY, J. W. Heat and alkaline damage to proteins: racemization and lysinoalanine formation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 32, p. 1377-1382, 1984.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.

SGARBIERI, V. C.; WHITAKER, J. R. Physical, chemical and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. **Adv. Food Res.**, v. 28, n. 3, p. 93-166, 1982.

SGARBIERI, V.C. Métodos de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. In: SGARBIERI, V.C. **Alimentação e nutrição** – Fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Almed, 1987. p. 250-261.

TORRE, M.; RODRIGUES, A. R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 1991.

VARGAS, E.; BRASSANI, R.; NAVARRETE, D. Digestibilidad de la proteína y energía de dietas elaboradas a base de arroz y frijoles en humanos adultos. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 34, n. 1, p. 109-129, 1984.

YADAV, S.; KHETARPAUL, N. Indigenous legume fermentation: effect of some antinutrients and in vitro digestibility of starch and protein. **Food Chemistry**, v. 50, p. 403-406, 1994.