

**FABRÍCIA QUEIROZ MENDES**

QUALIDADE PROTEICA DE ALIMENTOS, APRIMORAMENTO DE  
MÉTODOS DE DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* E QUALIDADE DE GRÃOS  
ATACADOS POR INSETOS-PRAGA

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

2009

FABRÍCIA QUEIROZ MENDES

QUALIDADE PROTEICA DE ALIMENTOS, APRIMORAMENTO DE MÉTODOS DE  
DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* E QUALIDADE DE GRÃOS ATACADOS POR INSETOS-  
PRAGA

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: 20 de fevereiro de 2009.

---

Prof<sup>ª</sup> Neuza Maria Brunoro Costa  
(Co-orientadora)

---

Prof. Thiago Rennó dos Mares Guia  
(Co-orientador)

---

Prof. Christiano Vieira Pires

---

Prof<sup>ª</sup> Maria do Carmo Gouveia Peluzio

---

Prof<sup>ª</sup> Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(Orientadora)

Aos meus pais, que fizeram este sonho ser possível  
Aos meus irmãos, que ajudaram durante toda caminhada  
Ao André, por todo amor e carinho  
Ao Mateus, que fez nossa vida mais alegre

Dedico

## AGRADECIMENTOS

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.

À Fundação de Amparo à Pesquisa em Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, mais do que uma orientadora, pela orientação, pelos ensinamentos, pela oportunidade, confiança e amizade.

À professora Neuza Maria Brunoro Costa, pela co-orientação, amizade e incentivo durante a execução deste trabalho.

Ao professor Christiano Vieira Pires, pela ajuda e pelas sugestões durante o curso deste trabalho.

Aos professores Raul Narciso Carvalho Guedes, Joel Antônio de Oliveira e Thiago Rennó dos Mares Guia, pela co-orientação e pelas críticas e sugestões apresentadas.

À professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, que participou da banca de defesa desta tese, pelas sugestões e atenção.

À professora Mônica Ribeiro Pirozi pelo apoio e amizade.

Ao professor Paulo César Corrêa e ao André Goneli, pela ajuda no planejamento do experimento.

À professora Leda Faroni e ao professor José Eustáquio pela atenção e ajuda.

Ao Adalberto, pela disponibilidade e ajuda na condução dos experimentos.

À EMBRAPA Arroz e Feijão, à EMBRAPA Milho e Sorgo, ao professor Moacil, e ao doutor André Lourenção (IAC) por nos ceder as amostras.

À EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, por nos receber e ceder os equipamentos necessários.

Ao André, pela enorme paciência, compreensão, amor, carinho e dedicação, do início ao fim.

Aos meus pais, Manoel e Luzia, pelo amor e carinho, por sempre acreditarem e apoiarem os meus estudos.

Aos meus irmãos Flávia, Fábio e Felipe, por terem me dado forças para vencer cada etapa e driblar as dificuldades.

Ao Mateus, pela alegria que nos proporciona todos os dias.

Às amigas Patrícia e Rita, por todo apoio, ajuda, Kjeldhals.

À Camila, Zaira e Liliane pela amizade, ensinamentos, apoio.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Enzimologia: Rita, Camila, Liliane, Patrícia, Angélica, Eduardo, Franciny, Anderson, Kênia, Gilson, Lilian, Zaira, Natálias, Fabrício, Fernandas, pelo convívio diário, cafés, momentos de descontração.

À Gláucia e à Marlene, pelo convívio.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial ao Eduardo, Adenilson, Jorge Luiz e José Fausto.

Aos técnicos de laboratório Naldo e Cassiano pelo apoio durante a realização dos experimentos.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

FABRÍCIA QUEIROZ MENDES, filha de Manoel Francisco Solano Mendes e Luzia Carvalho de Queiroz Mendes, nasceu em 16 de novembro de 1977, em Teixeira, Minas Gerais.

Em março de 1996, iniciou o curso de graduação em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concluindo-o em setembro de 2002.

Em março de 2003, ingressou no Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na UFV, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae* em fevereiro de 2005, com a defesa da dissertação.

Em março de 2005 iniciou o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola em nível de Doutorado pela Universidade Federal de Viçosa.

Em dezembro de 2008 foi contratada como professora da Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba.

Em fevereiro de 2009, submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

## ÍNDICE

LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE APÊNDICES.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	6
1.1. Valor nutricional de Proteínas.....	6
1.2. Métodos para avaliar a qualidade proteica.....	8
1.2.1. Coeficiente de eficiência proteica (PER).....	8
1.2.2. Razão proteica líquida (NPR).....	10
1.2.3. Escore químico de aminoácido (EQ).....	10
1.2.4. Escore químico corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS).....	10
1.2.5. Digestibilidade.....	10
1.2.6. Digestibilidade <i>in vitro</i> .....	12
1.3. Armazenamento de grãos.....	13
1.4. Grãos armazenados atacados por insetos.....	14
1.5. Referências Bibliográficas.....	16
CAPÍTULO 2: APRIMORAMENTO DE TÉCNICAS DE DIGESTIBILIDADE PROTEICA	
<i>IN VITRO</i> .....	22
2.1. RESUMO.....	22
2.2. INTRODUÇÃO.....	23
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.3.1. Local do experimento.....	25
2.3.2. Preparo das Amostras.....	26
2.3.3. Determinação do teor de nitrogênio.....	26

2.3.4. Ensaio Biológico.....	27
2.3.5. Digestibilidade Verdadeira.....	29
2.3.6. Digestibilidade <i>in vitro</i> .....	30
2.3.7. Delineamento estatístico.....	32
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
2.5. CONCLUSÃO.....	47
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CAPÍTULO 3: QUALIDADE PROTEICA DE DIVERSOS ALIMENTOS.....	51
3.1. RESUMO.....	51
3.2. INTRODUÇÃO.....	52
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.3.1. Local do experimento.....	54
3.3.2. Preparo das Amostras.....	55
3.3.3. Determinação do teor de nitrogênio.....	55
3.3.4. Ensaio Biológico.....	56
3.3.5. Digestibilidade Verdadeira.....	56
3.3.6. Coeficiente de eficiência proteica (PER).....	60
3.3.7. Razão proteica líquida (NPR).....	60
3.3.8. Determinação de atividade inibidor de tripsina nas farinhas de soja.....	61
3.3.9. Delineamento estatístico.....	63
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.4.1. Teor de proteínas.....	63
3.4.2. Avaliação biológica das proteínas.....	63
3.4.3. Teste de Urease.....	68
3.4.4. Atividade de inibidores de tripsina.....	68
3.5. CONCLUSÃO.....	69
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTEICA DE GRÃOS DE FEIJÃO, MILHO E TRIGO ATACADOS POR INSETOS-PRAGA.....	74
4.1. RESUMO.....	74

4.2. INTRODUÇÃO.....	75
4.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	77
4.3.1. Local do experimento.....	77
4.3.2. Infestação dos grãos.....	77
4.3.3. Caracterização bromatológica das farinhas.....	80
4.3.4. Avaliação da qualidade nutricional de grãos atacados por insetos-praga.....	81
4.3.5. Determinação e quantificação dos aminoácidos.....	85
4.3.6. Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS).....	87
4.3.7 Delineamento estatístico.....	88
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
4.4.1. Infestação dos grãos.....	88
4.4.2. Caracterização bromatológica das farinhas.....	101
4.4.3. Avaliação da qualidade nutricional de grãos atacados por insetos-praga.....	104
4.5. CONCLUSÃO.....	114
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
CONCLUSÃO GERAL.....	121
APÊNDICES.....	122

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1: Ingestão Dietética de Referência (IDR) para proteínas.....	9
--	---

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2: APRIMORAMENTO DE TÉCNICAS DE DIGESTIBILIDADE PROTEICA

#### *IN VITRO*

Tabela 1: Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico (g/100g de mistura).....	28
Tabela 2: Médias da digestibilidade proteica <i>in vivo</i> das amostras das 18 proteínas estudadas.....	34
Tabela 3: Valores de digestibilidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> calculados para cada uma das equações a 10 min (Método queda de pH).....	39
Tabela 4: Valores de digestibilidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> calculados para cada uma das equações (Método pH estático).....	44
Tabela 5: Valores de digestibilidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> calculados para cada uma das amostras pelo Método de queda de pH.....	46

### CAPÍTULO 3: QUALIDADE PROTEICA DE DIVERSOS ALIMENTOS

Tabela 1: Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico (g/100g de mistura).....	58
Tabela 2: Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico (g/100g de mistura).....	59
Tabela 3: Teores de proteínas das amostras analisadas.....	63
Tabela 4: PER, RPER (PER relativo), NPR, RNPR (NPR relativo) e digestibilidade para o primeiro experimento.....	64
Tabela 5: PER, RPER (PER relativo), NPR, RNPR (NPR relativo) e digestibilidade para o segundo experimento.....	64
Tabela 6: Atividade de urease das sojas analisadas.....	68
Tabela 7: Inibição da tripsina por extratos protéicos obtidos de farinhas de soja	69

CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTEICA DE GRÃOS DE FEIJÃO,  
MILHO E TRIGO ATACADOS POR INSETOS-PRAGA

Tabela 1: Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico (g/100g de mistura).....	83
Tabela 2: Valores médios do teor de água do feijão (%), com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento.	91
Tabela 3: Valores médios do teor de água do milho (%), com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento.	93
Tabela 4: Valores médios do teor de água do trigo (%), com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento.....	94
Tabela 5: Valores médios de massa específica aparente ( $\text{kg.m}^{-3}$ ) para feijão, com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento.....	95
Tabela 6: Valores médios massa específica aparente ( $\text{kg.m}^{-3}$ ) para grãos de milho, com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento.....	96
Tabela 7: Valores médios massa específica aparente ( $\text{kg.m}^{-3}$ ) para grãos de trigo, com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento.....	97
Tabela 8: Valores médios de tempo de cocção (min) para feijão, com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento.....	99
Tabela 9: Valores médios de capacidade de absorção de água (%) para feijão, com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento.....	100
Tabela 10: Teor de proteína (% BS) nas amostras de farinhas de feijão, milho e de trigo.....	101
Tabela 11: Teor de lipídeos (% BS) nas amostras de farinhas de feijão, milho e de trigo.....	103
Tabela 12: Teor de cinzas (% BS) nas amostras de farinhas de feijão, milho e de trigo.....	103

Tabela 13: Valores médios dos teores de umidade (%), proteínas (% BS), lipídeos (% BS), cinzas (% BS) e carboidratos (%BS).....	104
Tabela 14: Média de consumo de dieta e ganho de peso ao final de 14 dias.....	105
Tabela 15: Médias da digestibilidade proteica <i>in vivo</i> das amostras de proteína estudadas.....	106
Tabela 16: Médias dos valores de PER das amostras de proteína estudadas.....	108
Tabela 17: Médias dos valores de PER (%) e NPR (%) das amostras de proteína estudadas.....	108
Tabela 18: Composição aminoacídica das amostras estudadas.....	110
Tabela 19: Composição aminoacídica indispensável das amostras estudadas.....	111
Tabela 20: Escore químico de aminoácidos das proteínas estudadas.....	112
Tabela 21: Variação do Escore químico (EQ) de aminoácidos entre os grãos que sofreram o ataque por inseto se que não sofreram o ataque.....	113
Tabela 22: Escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS).....	113

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2: APRIMORAMENTO DE TÉCNICAS DE DIGESTIBILIDADE PROTEICA

#### *IN VITRO*

- Figura 1 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do Método queda de pH e da digestibilidade *in vivo* de todas as 18 proteínas estudadas. Cada ponto representa a média de seis repetições..... 35
- Figura 2 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do Método queda de pH e da digestibilidade *in vivo* de 17 proteínas estudadas (exceto a caseína). Cada ponto representa a média de seis repetições..... 35
- Figura 3 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do Método queda de pH e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem vegetal (arroz, aveia, feijão, proteína texturizada de soja, milho, quinoa, soja e trigo). Cada ponto representa a média de seis repetições..... 36
- Figura 4 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do Método queda de pH e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem animal (carne bovina, de frango, de peixe, suína, de rã sem osso, com osso, mecanicamente separada, leite em pó e proteína de soro de leite). Cada ponto representa a média de seis repetições... 36
- Figura 5 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do Método queda de pH e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem animal, sem a amostra de leite em pó. Cada ponto representa a média de seis repetições..... 38
- Figura 6 – 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 pH estático). Cada ponto representa a média de seis repetições..... 41
- Figura 7 – 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 pH estático). Cada ponto representa a média de seis repetições.....	41
Figura 8 – Curva de digestibilidade <i>in vitro</i> elaborada a partir do volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 e da digestibilidade <i>in vivo</i> das proteínas de origem vegetal (Método pH estático). Cada ponto representa a média de seis repetições.....	42
Figura 9 – Digestibilidade <i>in vivo</i> e volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 e da das proteínas de origem animal (Método pH estático). Cada ponto representa a média de seis repetições.....	42
Figura 10 – Digestibilidade <i>in vivo</i> e volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 e da das proteínas de origem animal, sem a amostra de leite em pó (Método pH estático). Cada ponto representa a média de seis repetições.....	43
Figura 11 – Digestibilidade <i>in vivo</i> e digestibilidade <i>in vitro</i> , utilizando as equações de melhor ajuste para determinar a digestibilidade <i>in vitro</i> , pelo método de queda de pH.....	47

#### CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTEICA DE GRÃOS DE FEIJÃO, MILHO E TRIGO ATACADOS POR INSETOS-PRAGA

Figura 1 - (A) Aparelho para determinação do tempo de cocção do feijão; (B) detalhe da haste.....	78
Figura 2 – Grau de infestação dos grãos de feijões infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.....	89
Figura 3 – Grau de infestação dos grãos de milho infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.....	89
Figura 4 – Grau de infestação dos grãos de trigo infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.....	90
Figura 5 – Teor de umidade dos grãos de feijões infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.....	91
Figura 6 – Teor de umidade dos grãos de milho infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.....	93

Figura 7 – Teor de umidade dos grãos de trigo infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.....	94
Figura 8 – Massa específica aparente dos grãos de feijões infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.....	96
Figura 9 – Massa específica aparente dos grãos de milho infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.....	97
Figura 10 – Massa específica aparente dos grãos de trigo infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.....	98
Figura 11 – Tempo de cocção dos grãos de feijões infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.....	100
Figura 12 – Capacidade de absorção de água dos grãos de feijões infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.....	101

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A: Conceito das IDRs.....	123
APÊNDICE B: Composição da Dieta AIN-93G para roedores em fase de Crescimento, gestação e lactação.....	125

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Absorção de água

AI – Ingestão adequada (Adequate intake)

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

AMDR – Distribuição do total de energia para adultos, oriunda dos macronutrientes  
(Acceptable macronutrients of distribution range)

BS – Base seca

BU – Base úmida

CONAB – Companhia Brasileira de Armazenamento

EAR – Necessidade média estimada (Estimated average requirement)

EQ – Escore químico

FAO/WHO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (Food  
and Agriculture Organization of the United Nations)

GI – Grau de infestação

I – Na presença do inseto praga

IDR – Ingestão dietética de referência

KTI – Inibidor de tripsina Kunitz

ME – Massa específica aparente

NPR – Razão proteica líquida (Net protein ratio)

PDCAAS – Escore químico corrigido pela digestibilidade (Protein digestibility  
corrected amino acid score)

PER – Coeficiente de eficiência proteica (Protein efficiency ratio)

RDA – Quota dietética recomendada (Recommended dietary allowances)

SI – Na ausência do inseto-praga

t – Tempo de armazenamento (dias)

TC – Tempo de cocção

TCA – Ácido tricloroacético

U – Umidade

UL – Nível de ingestão máxima tolerável (Tolerable upper intake)

## RESUMO

MENDES, Fabrícia Queiroz, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Qualidade proteica de alimentos, aprimoramento de métodos de digestibilidade *in vitro* e qualidade de grãos atacados por insetos-praga.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Orientadores: Neuza Maria Brunoro Costa, Raul Narciso Carvalho Guedes, Joel Antônio de Oliveira e Thiago Rennó dos Mares Guia.

O valor nutricional das proteínas depende de sua digestibilidade, da biodisponibilidade de seus aminoácidos essenciais e da ausência de toxicidade e fatores antinutricionais. Diversos fatores podem alterar a digestibilidade dos alimentos, como melhoramento genético, processamento e armazenamento. O grão atacado por insetos sofre alterações, dentre as quais perda de peso; deterioração decorrente do aquecimento promovido pelo metabolismo do inseto, perda do valor de mercado e perda do valor nutritivo do alimento, em decorrência do consumo dos compostos do grão pelo inseto. O presente trabalho teve como objetivos determinar a digestibilidade de diferentes fontes proteicas por métodos *in vivo* e *in vitro*; verificar qual método desenvolvido para a digestibilidade *in vitro* apresenta maior correlação com a digestibilidade *in vivo*; determinar o coeficiente de eficiência proteica (PER) e razão proteica líquida (NPR) de diversas fontes proteicas; e avaliar o grau de infestação, as alterações de umidade e massa específica aparente ao longo do período de armazenamento de grãos de duas variedades de feijão (jalo e radiante), milho e trigo na presença ou não do inseto-praga e avaliar as características bromatológicas e qualidade proteica das farinhas destes grãos infestados e não infestados. A avaliação da qualidade proteica foi conduzida por ensaios biológicos, durante 14 dias, utilizando-se ratos recém desmamados. Para o cálculo da digestibilidade *in vitro* foram utilizados os valores de pH obtidos em 10 min (método queda de pH) após a adição da solução de enzimas e o 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. As melhores equações relacionando a digestibilidade *in vivo* com as metodologias *in vitro* foram obtidas utilizando-se o método de queda de pH. Para ambos os métodos, a presença da caseína não influenciou no ajustes das curvas, para um ajuste exponencial e o melhor ajuste foi obtido somente para amostras de origem vegetal. As dietas de caseína, albumina, arroz, proteína de soro de leite e as carnes de porco, peixe e frango apresentaram maiores valores de digestibilidade, não diferindo entre si e apresentando valores entre 92,12 % a 95,54 %. Já as que continham soja foram as que apresentaram menor valor de digestibilidade (73,23 % a 78,04 %). Para valores de PER e NPR, leite em pó, caseína, albumina, proteína de soro e as carnes de porco, peixe e frango apresentaram os maiores valores. Observou-se um aumento do grau de infestação de forma quadrática com o período de armazenamento para os grãos de feijão e trigo e linear para os grãos de milho. A presença do inseto-praga causou aumento de umidade e diminuição da massa específica aparente. As farinhas dos grãos infestados apresentaram maior teor de nitrogênio e cinzas e redução no teor de carboidratos e lipídios. Observou-se que a presença do inseto-praga não alterou a digestibilidade dos grãos analisados, porém houve redução do PER e do NPR para os grãos de feijão, fato não foi observado para os grãos de milho e trigo. A qualidade nutricional de grãos é diminuída com o ataque de insetos, porém a família do inseto influencia esta alteração da qualidade.

## ABSTRACT

MENDES, Fabrícia Queiroz, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Protein quality of foods, improvement of methods of *in vitro* digestibility and quality of grains attacked by pest insects.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Neuza Maria Brunoro Costa, Raul Narciso Carvalho Guedes, Joel Antônio de Oliveira and Thiago Rennó dos Mares Guia.

The value nutritional of the proteins depends on its digestibility, on the bioavailability of its essential amino acids and on the absence of toxicity and anti nutritional factors. Several factors can alter the digestibility of the foods, such as genetic improvement, processing and storage. The grain attacked by insects suffers alterations, among which weight loss, deterioration due to heating promoted by the metabolism of the insect, loss of market value and loss of nutritional value of the food, due to the consumption of the grain by the insect. This study aimed to determine the digestibility of different protein sources by *in vivo* and *in vitro* methods, check which method developed for the *in vitro* digestibility shows a greater correlation with the *in vivo* digestibility; to determine the protein efficiency ratio (PER) and net protein ratio (NPR) of different protein sources, and assess the degree of infestation, the changes in moisture and apparent density during the grain storage of two varieties of beans (jalo and radiant), maize and wheat in the presence or not of the pest insect and evaluate the bromatological characteristics and protein quality of the flour of these infested and not infested grains. The evaluation of protein quality was led by biological rehearsals, for 14 days, using recently weaned mice. To calculate the *in vitro* digestibility, pH values obtained at 10 min (Method pH fall) after addition of the solution of enzymes and pH static were used, which measures the volume of added NaOH necessary to maintain in 8.0 the pH value of the protein solution after the addition of the enzyme solution. The best equations relating the *in vivo* digestibility with the *in vitro* methodologies were obtained being used the method of pH fall. For both methods, the presence of

casein did not influence in the adjustment of the curves, for an exponential adjustment and the best adjustment was only obtained for samples of vegetable origin. The casein, albumin, rice, milk serum protein and pork, fish and chicken meat diets presented larger digestibility values, not differing among each other and presenting values between 92,12% to 95,54%. The diets that contained soy were the ones that presented smaller digestibility value (73,23% to 78,04%). Para PER and NPR values, powdered milk, casein, albumin, serum protein and pork, fish and chicken meat presented the largest values. An increase of the degree of infestation in a quadratic way was observed with the storage period for the bean grains and wheat and lineal for the corn grains. The presence of the pest insect caused humidity increase and decrease of the apparent specific mass. The flours of the infested grains presented larger level of nitrogen and ashes and reduction in the carbohydrates and lipids levels. It was observed that the presence of the pest insect did not alter the digestibility of the analyzed grains, however there was reduction of PER and NPR for the bean grains, this fact was not observed for corn and wheat grains. The nutritional quality of grains is reduced with the attack of insects; however the family of the insect influences this quality alteration.

## INTRODUÇÃO

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes no interior das células, exibindo uma variedade de funções. Todos os organismos vivos necessitam de uma fonte de nitrogênio para a síntese de aminoácidos e conseqüente síntese proteica, nucleotídios e outros compostos. Os vegetais geralmente utilizam amônia ou nitratos solúveis como única fonte de nitrogênio. Os animais vertebrados, entretanto, precisam obtê-lo na forma de aminoácidos e de outros compostos orgânicos.

As necessidades mínimas de proteína requeridas para o crescimento e a manutenção do organismo são determinadas pela eficiência de sua utilização biológica, resultante da inter-relação entre a qualidade e a quantidade da proteína ingerida (OLIVEIRA & ANGELIS, 2001).

Métodos para determinar a qualidade de proteínas avaliam crescimento animal (PER), equilíbrio de nitrogênio, valor biológico, escore químico, digestibilidade e escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) (MILLWARD *et al.*, 2008)

A digestibilidade é a medida da percentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado (SGARBIERI, 1996). É determinada em função da fração do nitrogênio ingerido que o animal absorve. A digestibilidade verdadeira é obtida pela diferença entre o nitrogênio ingerido e aquele que aparece nas fezes corrigido pela quantidade de nitrogênio fecal excretado quando o indivíduo consome uma dieta livre de proteína (HERNÁNDEZ *et al.*, 1984).

As melhores fontes proteicas para a alimentação humana são as de origem animal, como ovos, queijos, carnes em geral e leite. Proteínas de origem vegetal possuem qualidade biológica inferior às de origem animal devido à sua deficiência em alguns aminoácidos essenciais e presença de fatores antinutricionais. No entanto, a ingestão de misturas de cereais e leguminosas, como arroz e feijão, arroz

e soja, milho e feijão, também fornece ao organismo as quantidades necessárias de aminoácidos para a síntese proteica.

As proteínas de origem vegetal constituem a principal fonte de proteína humana, especialmente em países em desenvolvimento, pois as de origem animal são, geralmente, de custo mais elevado (CRUZ *et al.*, 2004; WONG & CHEUNG, 2001).

De acordo com levantamentos realizados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), estima-se que a produção brasileira de grãos será de 137 milhões de toneladas na safra 2008/09 (CONAB, 2009). Calcula-se que no Brasil 10 a 15 % da produção de grãos é perdida anualmente por ataque de insetos. Dentre os prejuízos causados, destaca-se a perda de peso; o aquecimento e conseqüente deterioração, devido ao metabolismo do inseto, a perda do valor de mercado e a perda do valor nutritivo do alimento, em decorrência do consumo pelo inseto (ATHIÉ *et al.* 1998).

Análises químicas de grãos atacados por insetos revelam perdas de nutrientes como carboidratos, vitaminas e minerais. Tem sido descrito que o teor de proteína total, nitrogênio não protéico e ácido úrico é aumentado em grãos infestados por insetos (JOOD *et al.*, 1992). Entretanto, há relatos de diminuição do teor de proteínas com aumento da infestação (LAL & IGWEBUIKE, 2002). Análises químicas padrões, como determinação do teor de proteína pelo método de Kjeldhal, determinam o teor de nitrogênio total, não separando substâncias nitrogenadas tóxicas, excretas de insetos, fragmentos de corpos de insetos ou inibidores de proteases. Uma análise mais precisa e eficiente do valor biológico das proteínas presentes nestes grãos se torna importante, uma vez que estes podem ser importantes fontes proteicas para a população brasileira.

A presença de compostos inerentes ao próprio alimento (fatores antinutricionais, como inibidores de tripsina e de amilase, saponinas e compostos fenólicos) ou fatores externos, como processamento e armazenamento podem afetar qualidade nutricional (VARGAS *et al.*, 1984).

O processamento dos alimentos pode reduzir os fatores nutricionais presentes, promover diferentes alterações nos alimentos e afetar a digestibilidade proteica.

A redução de fatores antinutricionais presentes nas fontes proteicas de origem vegetal também podem ser conseguidas através do melhoramento genético destas fontes.

Durante o armazenamento pode ocorrer perda de qualidade proteica pelo consumo do grão por insetos.

A realização de ensaios *in vivo* para avaliar a digestibilidade de uma fonte proteica após a obtenção de uma nova variedade, após cada alteração do processamento em alimentos ou durante o armazenamento é custosa e demorada. Métodos *in vitro* podem prever variações de digestibilidade para novas variedades vegetais obtidas e em alterações de processamento de alimentos de forma mais rápida e barata, sendo possível prever se esta alteração trará ganhos ou perdas na digestibilidade.

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*; avaliar o grau de infestação, as alterações de umidade e massa específica aparente ao longo do período de armazenamento de grãos de duas variedades de feijão (jalo e radiante), milho e trigo na presença ou não do inseto-praga e avaliar as características bromatológicas e qualidade proteica das farinhas destes grãos infestados e não infestados.

## **Referências Bibliográficas**

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Acompanhamento da safra brasileira – Grãos, Safra 2008/09 – Quarto levantamento, disponível em <[http:// www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br) >, acessado em 02 de fevereiro de 2009.

CRUZ, G. A. D. R.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; PILON, A. M.; CRUZ, R. S.; BRUMANO, M. H. N.; MOREIRA, M. A. Evaluation of the protein digestibility,

protease inhibitor and dietary fibers of different bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v.7, n. 2, p. 103-109, 2004.

HERNÁNDEZ, M.; LA VEJA, A.; SOTELO, A. Determinacion de la digestibilidad proteinica *in vitro* e *in vivo* en cereais y leguminosas, crudos e cocidos. **Archivos Latinoamericanos Nutricion**, v. 34, n. 3, p. 513-522, 1984.

JOOD, S; KAPOOR, A. C; SINGH, R. Biological evaluation of protein quality of maize as affected by insect infestation. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v. 40, p. 2439-2442, 1992.

LALE, N. E. S. & IGWEBUIKE, J. U. Field infestation of *Faidherbia* (*Acacia*) *albida* (Del.) A. chew. pods by stored product Coleoptera in the Nigerian Savanna and effect of infestation on nutrient quality. **Journal of Arid Environments**, v. 51, p. 103-112, 2002.

MILLWARD, D. J., LAYMAN, D. J.; TOMÉ, D.; SCHAAFSSMA, G. Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87 (suppl), p. 1576S-1581S, 2008

OLIVEIRA, I. M. V.; ANGELIS, R. C. Requisitos protéicos mínimos de diferentes fontes vegetais para ratos de laboratório em fase de crescimento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.1, p. 23-28, 2001.

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

VARGAS, E.; BRASSANI, R.; NAVARRETE, D. Digestibilidad de la proteina y energia de dietas elaboradas a base de arroz y frijoles en humanos adultos. **Archivos Latinoamericanos Nutricion**, v. 34, n. 1, p. 109-129, 1984.

WONG, K. H.; CHEUNG, P. C. K. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds Part II. *In vitro* protein digestibility and amino acid profiles of protein concentrates. **Food Chemistry**, v.72, p. 11-17, 2001.

# CAPÍTULO 1

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Valor nutricional de Proteínas

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas (NELSON & COX, 2002), portanto são nutrientes essenciais aos organismos animal e humano e 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 indispensáveis e ausência de toxicidade e de fatores antinutricionais (SGARBIERE, 1996).

As proteínas também são chamadas de protídeos. O termo vem do grego e significa “a primeira” ou “a mais importante”. Assim, as proteínas foram os primeiros nutrientes a serem considerados essenciais para o organismo (NELSON & COX, 2002; 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 (PELUZIO & BATISTA, 2008). 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 proteicas para a alimentação humana são as de origem animal, como ovos, queijos, carnes em geral e leite. As proteínas de origem vegetal possuem qualidade biológica inferior que as de origem animal devido à sua deficiência em alguns aminoácidos essenciais. No entanto, a ingestão de misturas de cereais e leguminosas, como arroz e feijão, arroz e soja, milho e feijão, também fornece ao organismo as quantidades necessárias de aminoácidos para a síntese proteica (LAJOLO & TIRAPEGUI, 1998; BORSOI, 2001). As proteínas de origem vegetal constituem a principal fonte de proteína humana, especialmente em países em desenvolvimento, pois as de origem animal são de custo mais alto (CRUZ *et al.*, 2004; WONG & CHEUNG, 2001).

Alguns aminoácidos podem ser sintetizados no organismo a partir de precursores, sendo estes classificados como aminoácidos dispensáveis ou não-essenciais, são eles: alanina, aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, glicina, prolina, serina, tirosina e cisteína. No entanto, outros aminoácidos não conseguem ser sintetizados no organismo em quantidades suficientes, os quais são chamados de aminoácidos indispensáveis ou essenciais e devem ser fornecidos através da alimentação (ANGELIS, 1999). Os aminoácidos essenciais são: treonina, triptofano, histidina, lisina, leucina, isoleucina, metionina, valina e fenilalanina e, condicionalmente, arginina, importante para crianças em fase de crescimento. A falta desses aminoácidos no organismo ocasiona alterações nos processos bioquímicos e fisiológicos e na síntese proteica, 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, 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 proteica é a quantidade que deve ser ingerida em determinado período de tempo para contrabalançar os gastos orgânicos nesse período. A recomendação de ingestão de proteínas representa quantidades específicas para a manutenção da saúde em indivíduos saudáveis. Essa recomendação deve satisfazer as necessidades fisiológicas de todos os indivíduos de determinada faixa etária, gênero e estado metabólico (PELUZIO & BATISTA, 2008).

No Quadro 1 são apresentadas as recomendações de proteínas de acordo com o sexo e a faixa etária.

## **1.2. Métodos para avaliar a qualidade proteica**

### **1.2.1. Coeficiente de eficiência proteica (PER)**

O PER determina a capacidade de uma proteína promover o crescimento de ratos recém-desmamados. Representa a relação entre ganho de peso e a quantidade de proteína consumida. O valor encontrado é comparado ao de uma proteína de referência, normalmente a caseína. PER maior que 2,0 indica proteína de alta qualidade; entre 1,5-2,0, qualidade intermediária; e PER menor que 1,5, baixo valor nutricional (FRIEDMAN, 1996).

Este método tem duas limitações a serem destacadas. A primeira é não poder ser extrapolado para crianças em fase de crescimento, uma vez que o requisito de aminoácidos para crianças é menor do que aqueles para ratos. A segunda limitação reside no fato de que o 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.

Quadro 1: Ingestão Dietética de Referência (IDR) para proteínas

Estágio da vida	Idade	RDA/AI g/dia	EAR g/kg/dia	AMDR %
Infante	0-6 meses	9,1		ND
	7-12 meses	13,5	1,1	ND
Criança	1-3 anos	13	0,88	5-20
	4-8 anos	19	0,76	10-30
Homens	9-13 anos	34	0,76	10-30
	14-18 anos	52	0,73	10-30
	19-30 anos	56	0,66	10-35
	31-50 anos	56	0,66	10-35
	51-70 anos	56	0,66	10-35
	> 70 anos	56	0,66	10-35
	Mulheres	9-13 anos	34	0,76
14-18 anos		46	0,71	10-35
19-30 anos		46	0,66	10-35
31-50 anos		46	0,66	10-35
51-70 anos		46	0,66	10-35
> 70 anos		46	0,66	10-35
Gestantes		< 19 anos	71	0,88
	19-30 anos	71	0,88	10-35
	31-50 anos	71	0,88	10-35
Lactação	< 19 anos	71	1,05	10-35
	19-30 anos	71	1,05	10-35
	31-50 anos	71	1,05	10-35

Fonte: Peluzio & Batista (2008)

### **1.2.2. Razão proteica líquida (NPR)**

O NPR constitui uma modificação do PER e acrescenta ao ganho de peso do grupo com dieta proteica a perda de peso de um grupo com dieta aprotéica. O NPR é determinado no 14<sup>o</sup> 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 & 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.

### **1.2.3. Escore químico de aminoácido (EQ)**

EQ 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 entre dois e cinco 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 proteica de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades para a dieta de humanos (PIRES *et al.*, 2006a).

### **1.2.4. Escore químico corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS)**

Consiste em adicionar ao escore químico mais um componente, que é a digestibilidade proteica. O escore químico de aminoácido proteicacorrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS) é definida como a relação entre o conteúdo do primeiro aminoácido limitante na proteína (mg/g) e o conteúdo daquele aminoácido em uma proteína de referência (mg/g) multiplicado pela digestibilidade verdadeira da proteína teste. São recomendadas como padrão as necessidades de aminoácidos essenciais para crianças entre dois e cinco anos de idade, segundo FAO/WHO (1985). Valores de PDCAAS acima de 1,0 são considerados fonte proteica

de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades da dieta de humanos (PIRES *et al.*, 2006a)

### **1.2.5. Digestibilidade**

A digestibilidade da proteína corresponde à 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 se levar em conta o nitrogênio eliminado nas fezes como resultado da descamação do tubo digestivo, dos sucos e das secreções da microbiota 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 (PEREIRA, 1988).

A digestibilidade é a medida da percentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado pelo organismo (SGARBIERI, 1996).

Digestibilidade da proteína é um condicionante de qualidade proteica, pois dado aminoácido embora presente na proteína, pode não estar necessariamente disponível para o organismo. As proteínas presentes nos alimentos podem se associar com compostos presentes nos alimentos, como polifenóis, e, desta forma, não estarem disponíveis para a ação de proteases. As proteínas não podem ser utilizadas pelo organismo sem serem antes digeridas e absorvidas por este.

Vários fatores têm sido identificados capazes de interferir na digestibilidade de alimentos proteicos, 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 proteica muito baixa, da ordem de 50 a 70%. Acrescentaram ainda que a baixa digestibilidade proteica

constitui um dos principais fatores que limitam a utilização da proteína de dietas de origem vegetal, em particular as que incluem leguminosas.

### **1.2.6. Digestibilidade *in vitro***

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 (PIRES *et al.*, 2006b).

O método desenvolvido por Mauron *et al.* (1955) foi adaptado como método oficial pela Association of Official Analytical Chemists (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.

Akeson & 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. 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.

Outro método utilizado é aquele proposto por Saunders *et al.* (1973), em que a amostra proteica 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 termostaticado 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 tricloroacético (TCA) para 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 TCA da proteína digerida.

Hsu *et al.* (1977), baseando-se nos estudos de Maga *et al.* (1973), nos quais foi utilizada a enzima tripsina para a digestão das proteínas *in vitro* e media a velocidade inicial de proteólise como indicador da digestibilidade, desenvolveram um método rápido e sensível. Utilizaram uma solução multienzimática (tripsina, quimotripsina e peptidase) para determinar a digestibilidade de proteínas. A diminuição de pH após 10 min de digestão com a solução multienzimática foi comparada à digestibilidade *in vivo* aparente em ratos. A equação de regressão obtida permitiu prever a digestibilidade. O método é capaz de detectar o efeito de inibidores de tripsina e tratamento térmico sobre a digestibilidade.

Procurando 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.

### **1.3. Armazenamento de grãos**

O armazenamento adequado dos grãos possibilita manter a sua duração, as qualidades biológicas, químicas e físicas que os grãos possuem, imediatamente após a colheita. O armazenamento dos grãos mantém a disponibilidade do produto de forma regular e contínua, para abastecer os centros de consumo e possibilita a formação de estoques. O prolongamento da utilidade no tempo permite o

abastecimento mais estável aos mercados consumidores, assim como contribui para a maior estabilidade dos preços dos produtos (LAZZARINI & JAQUETI, 1984).

Durante a etapa do processo de armazenamento não se pode melhorar a qualidade dos grãos armazenados, apenas consegue-se, no máximo, mantê-las. Entretanto, não adianta obter produtos de alta qualidade se não houver um adequado armazenamento.

Um armazenamento adequado e seguro dos grãos evita perdas e preserva a qualidade. Os fatores de qualidade a serem observados dependem do uso final do grão (ALVES *et al.*, 2001).

A qualidade do feijão pode ser afetada com o armazenamento. O aumento no grau de dureza do feijão tem como consequência o aumento no tempo necessário para o cozimento, gasto de energia, mudanças no sabor, não formação de caldo espesso e viscoso e escurecimento do tegumento, levando a uma depreciação do produto pelo consumidor (RIBEIRO *et al.*, 2005; RIOS *et al.*, 2003).

#### **1.4. Grãos armazenados atacados por insetos**

Entre os insetos normalmente encontrados em grãos armazenados, os pertencentes às ordens Coleoptera e Lepdoptera compreendem as espécies de maior importância como pragas (PACHECO & PAULA, 1995). As fêmeas desses insetos geralmente colocam seus ovos sobre ou entre vagens ou em grãos expostos. As larvas recém-eclodidas penetram nos grãos e passam a consumir os cotilédones. Alimentam-se continuamente durante o período larval e, ao final do último instar, empupam. Em seguida, emergem para acasalar e recomeçar o ciclo reprodutivo (BALDIN, 2001).

O ataque direto dos insetos-praga provoca redução de peso dos grãos, perdas nutricionais e alterações físicas, além dos danos indiretos, por facilitarem a entrada de microrganismos e ácaros através das perfurações (FARONI & SILVA, 2000; ZIMMERMANN *et al.*, 1988). As perdas podem atingir até 30% em alguns casos, sendo 10% delas causadas diretamente pelo ataque de insetos-praga (SINHA, 1995; SCHOLLER *et al.*, 1997).

Os insetos-praga obtêm muitos de seus aminoácidos essenciais utilizando proteinases extracelulares (NATION, 2002).

Além de serem consumidos pelos insetos, os grãos tem uma redução na sua qualidade, por que os insetos danificam e alteram o ambiente da massa, favorecendo outros fatores de deterioração, como os fungos e a respiração dos grãos. Também contaminam os grãos com suas exúvias, excrementos e despojos, aumentam os níveis de ácidos graxos livres, contaminando-os com ácido úrico, causam odores, empobrecem o rendimento e a qualidade das farinhas (BROOKER *et al.*, 1992; PEDERSEN, 1992; FARONI, 1995; WHITE, 1995). A presença deste provoca contaminação dos grãos e seus subprodutos pela presença do inseto vivo ou morto, pela presença dos metabólitos produzidos pelos insetos ou outros aspectos do processo da vida. Larvas pupas e adultos no interior do grão não são observados na amostra, porém não podem ser removidos e são uma preocupação no processamento dos grãos, pois tornam-se contaminantes nos subprodutos (FARONI; SILVA, 2000).

Os grãos de feijão são severamente atacados por carunchos no mundo inteiro e as espécies mais freqüentes no Brasil são *Acanthoscelides obtecus* (Say) e *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (CARVALHO & ROSSETO, 1968).

A infestação por *A. obtecus* pode ocorrer no armazenamento ou no campo. A condição ideal para seu desenvolvimento é encontrada em ambiente com 30°C e 70 a 80% de umidade relativa. Os ovos são espalhados entre os grãos armazenados, ou colocados nas suas proximidades, ou inseridos em fendas de vagens em desenvolvimento, podendo ser colocadas isoladamente ou em grupos. As larvas, assim que eclodem, deslocam-se à procura do hospedeiro e penetram na semente, passando todo o seu desenvolvimento. Ao completarem o desenvolvimento larval, constroem um orifício de saída para o adulto antes de entrarem na fase de pupa (ATHIÉ *et al.*, 1998).

O *Sitophilus zeamais* é um inseto de grãos armazenados encontrado em todas as regiões quentes e tropicais do mundo. É praga primária de milho, trigo, arroz e sorgo e pode se desenvolver em produtos de cereais processados, como macarrão e mandioca desidratada (DOBIE *et al.*, 1984). A postura pode ocorrer em grãos com elevado teor de umidade, como, por exemplo, o milho em estado de

maturação. Com essa característica e por ser um voador ativo, pode atacar grãos no campo (PACHECO & PAULA, 1995). A fêmea de *S. zeamais* cava orifícios nos grãos com as mandíbulas, onde depositam os ovos. A cavidade é fechada com uma substância gelatinosa produzida por glândulas acessórias do aparelho reprodutor. A larva se alimenta do interior do grão. A fase de pupa também ocorre no interior do grão e o adulto, ao emergir, cava uma saída para o exterior (ATHIÉ *et al.*, 1998).

### **1.5. Referências Bibliográficas**

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

ALVES, W.M.; FARONI, L.R. D.; QUEIROZ, D. M.; CORRÊA, P.C.; GALVÃO, J.C.C. Qualidade dos grãos de milho em função da umidade de colheita e da temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, o.3, p.469-474, 2001.

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

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

ATHIÉ, I.; CASTRO, M.F.P.M.; GOMES, R.A.R.; VALENTINI, S.T. **Conservação de grãos**. Campinas: Fundação Cargil, 1998. 236 p.

BALDIN, E.L.L. **Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento de grãos de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. na infestação da resistência ao caruncho *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831) (Coleóptera: Bruchidae)**. Ribeirão Preto, SP :

USP, 2001. 110 p. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Entomologia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

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

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

BROOKER, D.B.; BAKKER-ARKEMA, F.W.; HALL, C.H. **Drying and storage of grains and oilseeds**. Westport, CT: AVI, 1992. 450p.

BUCHMANN, N. B. *In vitro* digestibility of protein from barley and others cereals. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, p. 538-589, 1979.

CARVALHO, R.P.L.; ROSSETO, C.J. Biologia de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleóptera: Brichidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. n. 13, p. 105-117, 1968.

CRUZ, G. A. D. R.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; PILON, A. M.; CRUZ, R. S.; BRUMANO, M. H. N.; MOREIRA, M. A. Evaluation of the protein digestibility, protease inhibitor and dietary fibers of different bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v.7, n. 2, p. 103-109, 2004.

DOBIE, P.; HAINES, C. P.; HODGES, R. J.; PREVETT, P. F. **Insects and arachnids of tropical stored products, their biology and identification: a training manual**. UK, Tropical Development and Research Institute, 1984. 273p.

FARONI, L.R.A. Pragas e métodos de controle. In: Silva, de J. e S. **Pré-Processamento de Produtos Agrícolas**. Juiz de Fora, MG:Instituto Maria, 1995. 350p.

FARONI, L.R.D.; SILVA, J.S. Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados. In: SILVA, J.S. **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 2000, 502p.

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

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

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

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

LAZZARINI, S. JAQUETI. Jr, J. **Estrutura de Armazenagem no País**. Relatório Técnico. CEAGESP, São Paulo, 1985, 11 p

LIU, K. Cellular 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.

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

NATION, J.L. **Insect physiology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2002, 485p.

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

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

OLIVEIRA, J. E.; SANTOS, A. C.; WILSON, E. D. **Nutrição básica**. São Paulo: 1982.

PACHECO, I.A.; PAULA, D.C. **Insetos de grãos armazenados: identificação e biologia**. Campinas: Fundação Cargil, 1995, 228p.

PEDERSEN, J.R. Insects: identification, damage and detection. In: Sauer, D.B. (ed.). **Storage of Cereal Grains and their Products**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1992. p.435-491.

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

PELUZIO, M. C. G. & BATISTA, E. C. Proteínas. In: COSTA, N. M. B. & PELUZIO, M. C. G. **Nutrição Básica e Metabolismo**, Viçosa: Editora UFV 2008, p. 120-154.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.179-187, 2006a.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; CRUZ, G. A. D. R.; MENDES, F. Q.; COSTA, N. M. B. Digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de proteínas de alimentos: estudo comparativo. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 13-23, 2006b.

RIBEIRO, H.J.S.S.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H.; MIYAGUI, D.T. Propriedades físicas e químicas de feijão comum preto, cultivar Iapar 44, após envelhecimento acelerado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.165-169, 2005.

RIOS, A. O., ABREU, C. M. P., CORRÊA, A. D. Efeito da estocagem e das condições de colheita sobre algumas propriedades físicas, químicas e nutricionais de três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p. 39-45 , 2003

SATERLEE, L. D.; MARSHALL, H. F.; TENNYSON, J. M. Measuring protein quality. **Journal American Oil Chemistry Society**, 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. **Journal of Nutrition.**, v. 103, p. 530-535, 1973.

SCHÖLLER, M.; PROSELL, S.; AL-KIRSHI, A.G.; REICHMUTH, C.H. Towards biological control as a major component of integrated pest management in stored product protection. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v.33, n.1, p.81-97, 1997.

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

SINHA, R.N. **The stored-grain ecosystem**. In: Jayas, D.S.; White, N.D.G.; Muir, W.E. *Stored-grain ecosystems*. New York: M. Dekker, 1995, p.1-33.

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

WHITE, N.D.G. Insects, mites and insecticides in stored-grain ecosystems. In: Jayas, D.; White, N.D.G.; Muir, W.E. (eds.). **Stored-grain ecosystems**. New York: M. Dekker, 1995. p.256-288.

WONG, K. H.; CHEUNG, P. C. K. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds Part II. *In vitro* protein digestibility and amino acid profiles of protein concentrates. **Food Chemistry**, v.72, p. 11-17, 2001.

ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA,M.; YAMADA, T. **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: A.B.P.P.F., 1988, 589p.

## CAPÍTULO 2

### CORRELAÇÃO DE MÉTODOS DE DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* E DIGESTIBILIDADE *IN VIVO*

#### 2.1. RESUMO

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*. Foram utilizadas as seguintes fontes de proteína: caseína, arroz, aveia, carne bovina, carne de frango, carne de peixe, carne suína, carne de rã sem osso, carne de rã mecanicamente separada, carne de rã com osso, feijão, leite em pó, milho (fubá), proteína de soro de leite, proteína texturizada de soja, quinoa, soja e trigo (farinha). Para o cálculo da digestibilidade *in vitro* foram utilizados os valores de pH obtidos em 10 min (método queda de pH) após a adição da solução de enzimas e o 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. As melhores equações obtidas relacionando a digestibilidade *in vivo* com as metodologias *in vitro* foi pelo método de queda de pH. Para ambos os métodos a presença da caseína não influenciou no ajustes das curvas, para um ajuste exponencial e o melhor ajuste somente foi obtido para amostras de origem vegetal. O uso de técnicas *in vitro* para a determinação da digestibilidade proteica benefícios como: requer menos tempo, são mais baratos e requisitam de menos mão-de-obra e espaço físico do que os métodos de determinação de digestibilidade *in vivo*.

PALAVRAS - CHAVE: Qualidade proteica; digestibilidade *in vitro*; digestibilidade *in vivo*.

## 2.2. INTRODUÇÃO

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas (NELSON & COX, 2002), sendo, portanto são nutrientes essenciais aos organismos animais devendo 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 (SGARBIERE, 1996). Métodos clássicos para determinar a qualidade proteica avaliam o crescimento animal (PER), o equilíbrio de nitrogênio, o valor biológico, o escore químico, a digestibilidade e o escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS), que foi introduzido pela FAO/WHO em 1985 e é a medida aceita desde então para avaliar a qualidade das proteínas. 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 entre 2 e 5 anos de idade, segundo FAO/WHO (1985) (MILLWARD *et al.*, 2008; SCHAAFSMA, 1994).

A digestibilidade da proteína é determinada em função da fração do nitrogênio ingerido que o animal absorve. A digestibilidade verdadeira é obtida pela diferença entre o nitrogênio ingerido e aquele que aparece nas fezes corrigido pela quantidade de nitrogênio fecal excretado quando o indivíduo consome uma dieta livre de proteína (HERNÁNDEZ *et al.*, 1984).

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, podem alterar a qualidade nutricional da proteína (VARGAS *et al.*, 1984).

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 sensoriais, inativar

microrganismos patógenos e fatores antinutricionais (SANTÉ-LHOUELLIER *et al.*, 2008; CHEFTEL, 1979)

O processamento térmico, especialmente o calor úmido, desnatura as proteínas aumentando acessibilidade ao ataque enzimático, aumentando o valor nutricional (POEL *et al.*, 1990). Entretanto, podem levar à formação da reação de Maillard, oxidação de aminoácidos básicos, formação de agregados proteicos diminuindo, assim, a qualidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais (SANTÉ-LHOUELLIER *et al.*, 2008; SCHWASS & FINLEY, 1984; CHEFTEL, 1979).

O processamento dos alimentos reduz de forma diferente os fatores nutricionais presentes. Nergiz & Gökgöz (2007) avaliando o teor de ácido fítico, fenóis totais, taninos e inibidor de tripsina em três variedades de feijões e dois tipos de processamento (remolho por 12 horas seguido de cozimento e cozimento na pressão, sem remolho) verificou que os teores de ácido fítico, fenóis totais, taninos e inibidor de tripsina diminuíram com os tratamentos aplicados, porém a redução foi maior para todos os fatores no tratamento de remolho seguido de cozimento. Redução em diferentes níveis dos fatores antinutricionais também foi encontrada por Shimelis & Rakshit (2007) em feijões. Eles avaliaram o teor de taninos, ácido fítico, lectina, inibidor de tripsina e saponinas em feijões não processados, remolho em água por 12 horas, remolho em bicarbonato de sódio, germinação por 24, 48, 72 e 96 horas seguidos ou não de autoclave, cozimento sem remolho, cozimento com remolho em água e em bicarbonato e autoclave sem remolho e com molho em água e bicarbonato. Houve redução dos fatores antinutricionais em todos os tratamentos, mas esta redução variou de 6 a 100 %.

Os programas de melhoramento genético visam obter variedades que apresentem alta produtividade, aliada a resistência às doenças, com produção de sementes possuindo forma, tamanho, cor e brilho aceitáveis no mercado. Também podem objetivar a redução de fatores antinutricionais para aumentar a qualidade nutricional dos grãos (MENDES *et al.*, 2007; MESQUITA *et al.*, 2007).

As reduções dos fatores antinutricionais em diferentes processamentos de alimentos ou por melhoramento genético podem alterar a digestibilidade. A realização de ensaios *in vivo* para avaliar a digestibilidade em cada alteração do processamento em alimentos ou a cada nova variedade obtida é custosa e

demorada. Métodos *in vitro* podem prever variações de digestibilidade em alterações de processamento de alimentos de forma mais rápida e barata.

A maior parte dos métodos de determinação de digestibilidade *in vitro* se baseia 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 (PIRES *et al.*, 2006).

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

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*.

## **2.3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.3.1. Local do experimento**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos Prof. Marcos Luiz dos Mares Guia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) e no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) – MG.

### 2.3.2. Preparo das Amostras

Foram utilizadas as seguintes fontes de proteína: caseína, arroz, aveia, carne bovina, carne de frango, carne de peixe, carne suína, carne de rã sem osso, carne de rã mecanicamente separada, carne de rã com osso, feijão, leite em pó, milho (fubá), proteína de soro de leite, proteína texturizada de soja, quinoa, soja e trigo (farinha).

Foi utilizada caseína comercial obtida da RHOSTER-Indústria e Comércio Ltda.

Os grãos de arroz branco polido, adquirido no comércio de Viçosa, MG, foi coccionado em água, em panela doméstica. Após o cozimento, os grãos foram secos em estufa com circulação de ar, a 60 °C, por 24 horas. Em seguida, foram moídos em multiprocessador doméstico, marca Arno e passado em peneira de 16 mesh (1 mm), obtendo-se uma farinha de arroz.

As carnes de frango (peito de frango sem pele), de peixe (filé de Merluza) e suína (pernil sem gordura aparente), adquirido no comércio de Viçosa, MG, foram cozidas com água em panelas domésticas, na proporção de 1:1 (p/v), até secar a água. Após o cozimento, as carnes foram congeladas à -80°C, desidratadas em liofilizador por 24 horas e moídas em multiprocessador doméstico, marca Arno e passadas em peneira de 16 mesh (1 mm).

A soja foi submetida a tratamento térmico em calor seco de 89°C por 5 minutos. Os grãos foram moídos em multiprocessador doméstico, marca Arno e passado em peneira de mesh (1 mm), obtendo-se uma farinha de soja.

As amostras de aveia, leite em pó, proteína de soro de leite e quinoa foram adquiridas no comércio de Viçosa, MG. A quinoa foi moída em multiprocessador marca Arno e passada em peneira de 16 mesh (1 mm).

Os dados de digestibilidade *in vivo* para carne bovina, carne de rã sem osso, carne de rã mecanicamente separada, carne de rã com osso, feijão, milho (fubá), proteína texturizada de soja e trigo (farinha), foram obtidos de Pires *et al.*, 2006.

### 2.3.3. Determinação do teor de nitrogênio

O teor de proteína de cada amostra foi determinado pelo método semimicro Kjeldhal, segundo AOAC (1984).

As amostras foram pesadas em papel manteiga e colocadas nos tubos de digestão devidamente identificadas. Acrescentou-se um tubo contendo apenas o papel manteiga (branco). Adicionou-se 10 mL da mistura digestora. A temperatura foi aumentada gradativamente até 320 °C. Depois de atingida a temperatura, deixou-se sob aquecimento por mais uma hora. Os tubos foram retirados do bloco digestor e deixados esfriar. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 30 % e as amostras foram retornadas para o bloco digestor por mais uma hora. Foram retiradas e deixadas esfriar. Adicionou-se 10 mL de água e procedeu-se à destilação de nitrogênio. O material digerido é neutralizado com NaOH 40 % (aproximadamente 25 mL). Em seguida, o nitrogênio presente, agora na forma de amônia é destilado por arraste de vapor e recolhido em solução de ácido bórico a 4% utilizando indicador de Tashiro. O borato de amônio formado é titulado com ácido clorídrico 0,05 N padronizado, determinando o teor de nitrogênio.

A mistura digestora consiste em dissolver  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (5 g) e  $\text{SeO}_2$  (5 g) em 500 mL de ácido sulfúrico concentrado.

No cálculo de conversão do nitrogênio em proteínas foi utilizado o fator 6,25.

#### **2.3.4. Ensaio Biológico**

Foram preparadas uma dieta aprotéica, uma dieta de caseína (padrão) e as dietas testes, contendo as amostras proteicas estudadas, conforme apresentado na Tabela 1.

A composição das dietas foi baseada na AIN-93G, segundo Reeves *et al.* (1993), com o teor de proteínas alterado para 9 % a 10 % para todas as dietas, exceto a dieta de arroz, que continha 7 % de proteínas.

As quantidades de outros ingredientes da dieta (amido, amido dextrinizado, sacarose, óleo e celulose) também foram alteradas, de acordo com a composição dos alimentos testados, de forma que as dietas fossem isocalóricas e isoproteicas (Tabela 1).

Tabela 2. Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico (g/100g de mistura)\*

Ingredientes	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	LN
Caseína	11,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arroz <sup>1</sup>	-	82,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aveia <sup>1</sup>	-	-	52,41	-	-	-	-	-	-	-	-
Carne de frango <sup>1</sup>	-	-	-	12,66	-	-	-	-	-	-	-
Carne de peixe <sup>1</sup>	-	-	-	-	13,42	-	-	-	-	-	-
Carne suína <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	13,15	-	-	-	-	-
Leite em pó <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	38,36	-	-	-	-
Proteína de soro de leite <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	13,37	-	-	-
Quinoa <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	73,48	-	-
Soja <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,3	-
Amido dextrinizado <sup>2</sup>	13,2	-	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	8,53	13,2	13,2
Sacarose <sup>3</sup>	10,0	-	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	5,93	10,0	10,0
Óleo de soja <sup>3</sup>	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	4,37	-	7,0	7,0	3,21	7,0
Fibra alimentar (Celulose) <sup>2</sup>	5,0	5,0	0,33	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-	-	5,0
Mistura Salínica (AIN-93G-MX) <sup>2</sup>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica (AIN-93G-VX) <sup>2</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
L-cistina <sup>2</sup>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina <sup>2</sup>	0,25	0,25	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) <sup>3</sup>	48,28	-	12,01	47,09	46,33	49,23	28,39	46,48	-	47,15	59,75

\* Segundo REEVES *et al.* (1993), modificado, de acordo com a adição de cada fonte proteica, de modo que as dietas fossem isocalóricas e isoproteicas.

<sup>1</sup> Farinha produzida a partir das amostras analisadas.

<sup>2</sup> Obtido da RHOSTER – Indústria e Comércio Ltda.

<sup>3</sup> Obtido no comércio de Viçosa, MG.

D1: Dieta com caseína; D2: Dieta com arroz; D3: Dieta com aveia; D4: Dieta com carne de frango; D5: Dieta com carne de peixe; D6: Dieta com carne suína; D7: Dieta com leite em pó; D8: Dieta com proteína de soro de leite; D9: Dieta com quinoa; D10: Dieta com soja; LN: Dieta aprroteica (Livre de nitrogênio)

q.s.p. = quantidade suficiente para completar 100g de dieta.

Após o preparo, determinou-se o teor de proteína de cada dieta. As dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente rotulados e armazenados em refrigerador. Foram utilizados 66 ratos machos, raça Wistar, recém desmamados, com média de 23 dias de idade, peso variando de 50 a 60 gramas, provenientes do biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os animais foram divididos em 11 grupos com seis animais cada, de modo que a média dos pesos entre os grupos não excedesse a 10 g. Os ratos foram alocados em gaiolas individuais, onde receberam água e suas dietas *ad libitum*, por 14 dias. Os animais foram mantidos em condições de temperatura de  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , com 12 horas de claro-escuro e foi feito o monitoramento do consumo alimentar semanalmente.

O experimento foi conduzido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal – COBEA – e as normas internacionais.

### **2.3.5. Digestibilidade Verdadeira**

Para a determinação da digestibilidade, as dietas foram marcadas com indigocarmin na proporção de 100 mg/100g e oferecidas aos animais no 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias. As fezes foram coletadas do 8<sup>o</sup> ao 11<sup>o</sup> dias em recipientes individuais para cada animal e mantidas sob refrigeração. No 8<sup>o</sup> dia foram coletadas apenas as fezes marcadas; no 9<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias foram coletadas todas as fezes; e no 11<sup>o</sup> dia foram coletadas apenas as fezes não marcadas pelo corante.

Ao término do experimento, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar a  $105^{\circ}\text{C}$  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 triplicata (AOAC, 1984).

A digestibilidade verdadeira foi calculada medindo a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, a excretada nas fezes e a perda metabólica nas fezes, que corresponde ao nitrogênio fecal do grupo com dieta aprroteica. O cálculo da digestibilidade verdadeira (DV) foi feito de acordo com a seguinte equação:

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

I = Nitrogênio ingerido pelo grupo teste.

F = Nitrogênio fecal do grupo teste.

FK = Nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica

### **2.3.6. Digestibilidade *in vitro***

Dois métodos foram analisados 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 verdadeira por meio de técnicas que não demandam o uso de animais e que permitam resultados com menor tempo e custo.

O presente trabalho utilizou para a hidrólise da solução de proteínas uma solução enzimática contendo as enzimas tripsina bovina (2,5 mg/mL) e pancreatina suína (1,6 mg/mL), obtidas da Sigma-Aldrich, em água deionizada para os dois métodos. A solução enzimática foi preparada imediatamente antes de cada série de testes e mantida em banho de gelo.

#### **Método descrito por Hsu *et al.* (1977), com modificações (Método queda de pH)**

O método de queda de pH baseia-se na correlação entre velocidade inicial de proteólise e digestibilidade, medida por meio 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. No presente trabalho utilizou-se para a hidrólise de proteínas uma solução enzimática contendo as enzimas tripsina e pancreatina.

Ajustou-se o pH de 50 mL da suspensão proteica em água destilada (contendo 6,25 mg de proteína/mL), para pH 8,0, com solução de NaOH, sob agitação, em banho-maria a 37 °C. Cinco mililitros da solução enzimática foram,

então, adicionados à suspensão proteica 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 digital da marca Tecnal. A digestão enzimática foi caracterizada pela queda do pH, após 10 min da adição da solução enzimática e ajuste da equação que descreve a queda do pH versus tempo. A queda do pH após 10 min e a equação dos parâmetros foram utilizados para descrever a correlação com a digestibilidade verdadeira *in vivo*.

#### **Método descrito por Cruz *et al.* (2005), com modificações (Método pH estático)**

Para a determinação da digestibilidade *in vitro* pelo método de pH estático, foram utilizadas para a solução enzimática as enzimas tripsina e pancreatina, portanto, uma modificação do método descrito por Cruz *et al.* (2005), que utiliza as enzimas tripsina, quimotripsina e pancreatina.

Ajustou-se o pH de 50 mL da suspensão proteica em água destilada (contendo 6,25 mg de proteína/mL), para pH 8,0, com solução de NaOH, sob agitação, em banho-maria a 37 °C. Cinco mililitros da solução enzimática foram, então, adicionados à suspensão proteica 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 pela 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 *et al.*, 2005). Posteriormente, mediu-se o volume de NaOH gasto durante o teste. A digestão enzimática foi caracterizada pelo volume de NaOH 0,1 N gasto durante o teste e por uma equação que descreve o volume de NaOH, requerido para manter o pH em 8,0. 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*.

Os valores de pH no método de queda de pH e o volume de NaOH para manter o pH em 8,0 no método de pH estático foram obtidos de Pires *et al.* (2006) para as amostras de carne bovina, carne de rã sem osso, carne de rã

mecanicamente separada, carne de rã com osso, feijão, milho (fubá), proteína texturizada de soja e trigo (farinha) e Sant'Ana (2008) para as amostras de aveia, carne de frango, carne de peixe, carne suína, leite em pó, quinoa e soja.

### **Equações de digestibilidade *in vitro***

Para os dois métodos, várias combinações das amostras foram analisadas, verificando, dessa forma, a interferência do tipo de fonte proteica na digestibilidade da proteína. Para cada método, a digestibilidade *in vitro* foi comparada: a) à digestibilidade verdadeira de todas as amostras; b) à digestibilidade verdadeira de todas as amostras, exceto a caseína; c) à digestibilidade verdadeira das amostras de proteínas vegetais e d) à digestibilidade verdadeira das amostras de proteínas de origem animal.

Para o método de queda de pH, a digestibilidade verdadeira foi descrita em função da queda de pH das amostras após 10 min da solução de enzimas. Para o método de pH estático, a digestibilidade verdadeira foi descrita 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.

### **2.3.7. Delineamento estatístico**

Para a obtenção das equações de digestibilidade *in vitro* foi utilizada regressão não-linear, utilizando o programa Sigma Plot.

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos para a digestibilidade *in vivo* das amostras estudadas variaram entre 78,05% (soja) e 94,87% (carne de peixe) (Tabela 2)

### Digestibilidade *in vitro*

#### Método de queda de pH

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, com base nos valores de  $r^2$  (quanto do comportamento dos dados é representado pela equação), significância dos parâmetros e correlação com o modelo biológico de digestão.

As equações elaboradas a partir de valores de pH medidos após 10 min da solução de enzimas estão mostradas nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

Na Figura 1 está a equação obtida usando os dados de digestibilidade *in vivo* e queda de pH de todas as fontes proteicas. A equação obtida é exponencial e possui um  $r^2$  de 76,76 %. Na Figura 2 foram utilizadas todas as fontes de proteína, com exceção da caseína, obtendo-se, assim, uma equação com  $r^2$  de 76,24 %. Já na Figura 3 estão somente as proteínas de origem vegetal, as quais permitiram a obtenção de uma equação exponencial de digestibilidade em função de pH com um valor de  $r^2$  de 88,48 %. A equação obtida na Figura 3 foi a que melhor explicou a digestibilidade em função da queda. Já a equação obtida pela Figura 4, na qual foram utilizados somente dados de proteínas de origem animal, foi a que permitiu pior ajuste, com um valor de  $r^2$  de 41,61 %, 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 *in vivo* das proteínas de origem animal serem muito próximos e os

valores encontrados para a pH final apresentarem uma maior variabilidade que a observada na digestibilidade *in vivo*.

Tabela 2: Médias da digestibilidade proteica *in vivo* das amostras das 18 proteínas estudadas

Fontes de Proteína	Digestibilidade Verdadeira (%)
Caseína comercial	94,27
Arroz	92,12
Aveia	87,39
Carne bovina*	92,38
Carne de frango	94,73
Carne de peixe	94,87
Carne suína	93,74
Carne de rã sem osso*	93,37
Carne de rã mecanicamente separada*	92,57
Carne de rã com osso*	91,01
Feijão Pérola*	78,70
Leite em pó	87,32
Proteína de soro de leite	93,69
Proteína texturizada de soja*	86,41
Milho (fubá)*	82,38
Quinoa	85,95
Soja	78,05
Trigo (farinha de trigo)*	89,44

\*Dados obtidos de Pires *et al.*, 2006.

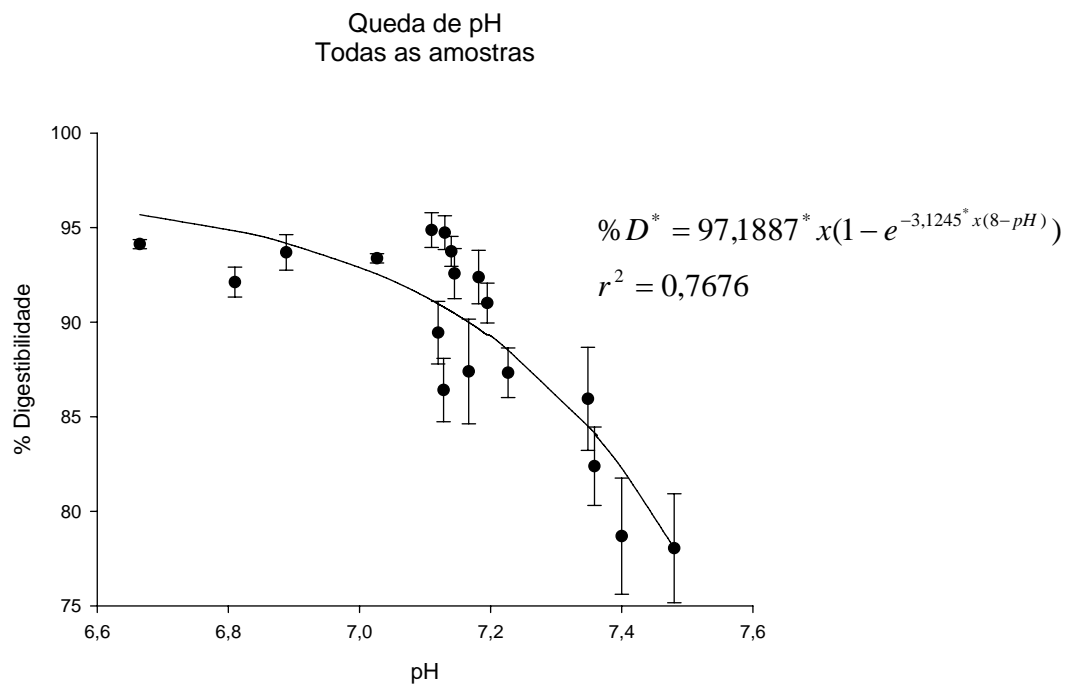


Figura 1 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do Método queda de pH e da digestibilidade *in vivo* de todas as 18 proteínas estudadas. Cada ponto representa a média de seis repetições.

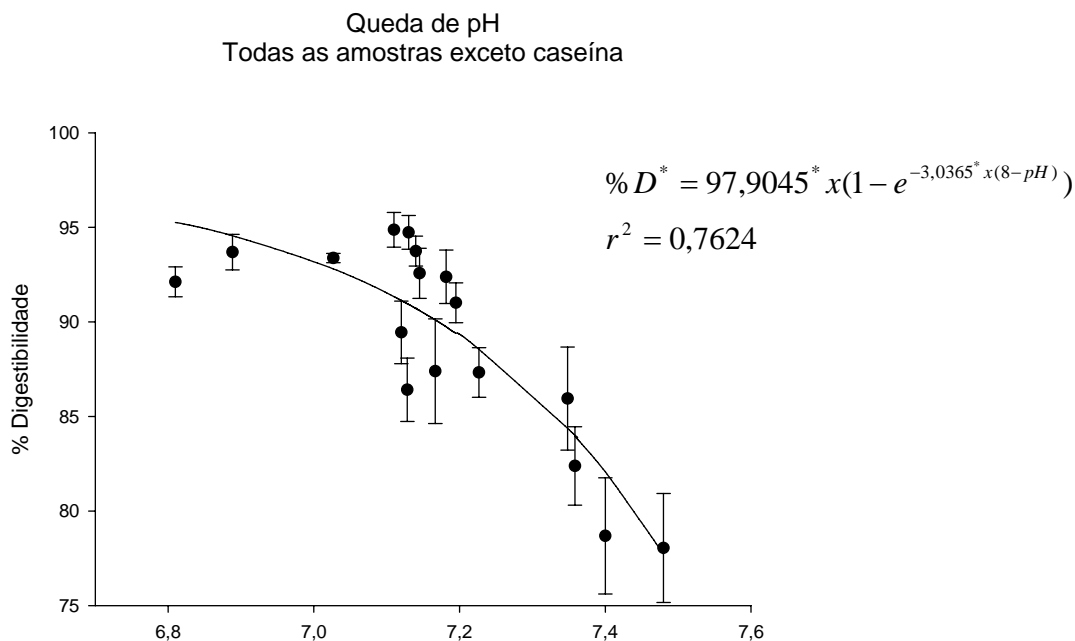


Figura 2 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do Método queda de pH e da digestibilidade *in vivo* de 17 proteínas estudadas (exceto a caseína). Cada ponto representa a média de seis repetições.

\*Significativo a 1%

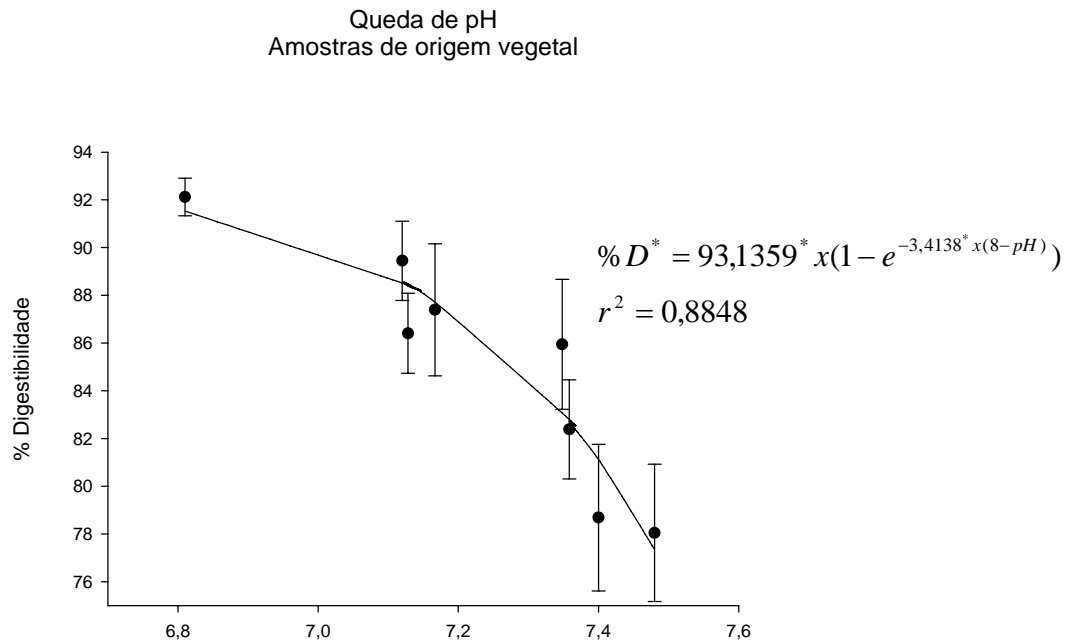


Figura 3 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do Método queda de pH e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem vegetal (arroz, aveia, feijão, proteína texturizada de soja, milho, quinoa, soja e trigo). Cada ponto representa a média de seis repetições.

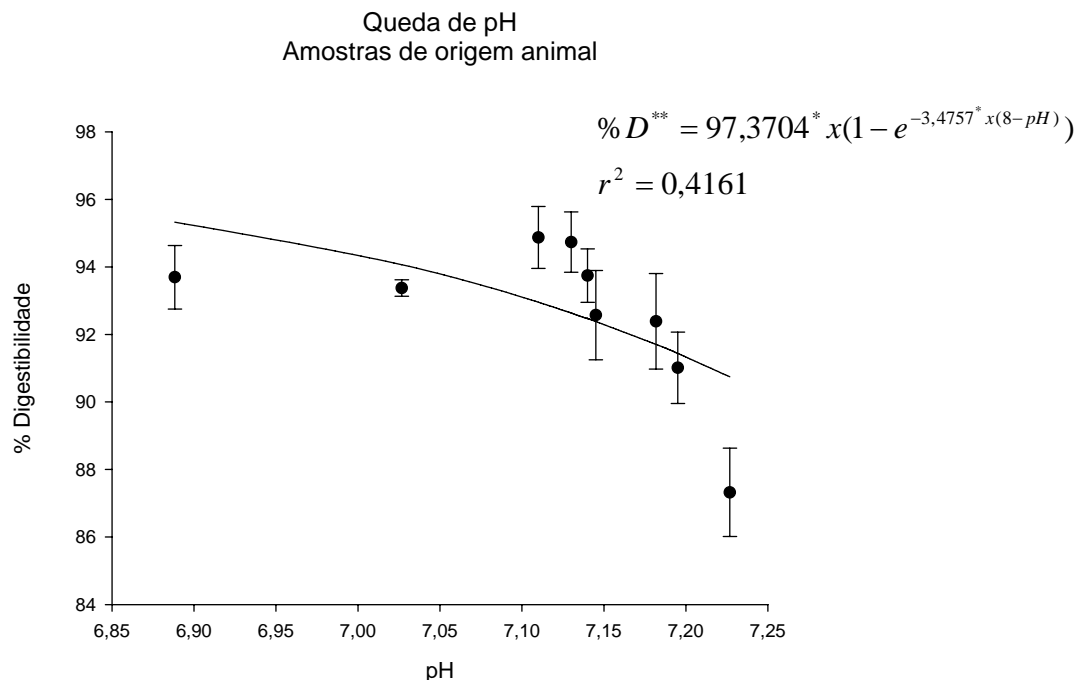


Figura 4 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do Método queda de pH e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem animal (carne bovina, de frango, de peixe, suína, de rã sem osso, com osso, mecanicamente separada, leite em pó e proteína de soro de leite).

\*Significativo a 1%

\*\*Significativo a 10 %

Cada ponto representa a média de seis repetições.

As equações obtidas nas Figuras 1 e 2 possuem um valor de  $r^2$  semelhante. Desta forma, pode-se concluir que, a presença da caseína não influencia no ajuste das curvas. Pires *et al.* (2006), ajustando um modelo polinomial quadrático para descrever a digestibilidade em função dos valores de queda de pH, observou que a presença da amostra de caseína diminuía o valor de  $r^2$ , pois o ponto referente à caseína ficou muito distante dos demais, o que comprometeu o comportamento da equação. Para o modelo exponencial este fato não é observado, pois um grande aumento na queda do pH gera pequenos aumentos na digestibilidade para valores de pH abaixo de 6,8. Foi escolhido um modelo exponencial por se adequar mais ao modelo biológico estudado, pois à medida que se aumenta a queda de pH, aumentam-se os valores de digestibilidade, por isto, o valor de queda de pH encontrado para a amostra de caseína não altera o ajuste das curvas. Pelos ajustes exponenciais encontrados, observa-se que para um valor de queda de pH infinito, obtem-se um valor de digestibilidade de 97,19 % pela equação obtida utilizando todas as amostras (Figura 1), 97,90 % utilizando todas as amostras exceto a caseína (Figura 2), 93,14 % utilizando somente as amostras de origem vegetal (Figura 3) e 97,37 % utilizando apenas as amostras de origem animal (Figura 4).

Os valores de digestibilidade *in vitro* encontrados a partir das equações obtidas nas Figuras 1, 2, 3 e 4, comparados com os respectivos valores de digestibilidade *in vivo*, estão apresentados na Tabela 3.

Pode-se observar que os valores de digestibilidade *in vitro* obtidos pelas equações acima estão próximos daqueles de digestibilidade *in vivo*. Para as amostras de origem vegetal, a digestibilidade *in vitro* obtida pela equação 3 são as que apresentam valores mais próximas da digestibilidade *in vivo*. Para as amostras de origem animal, com exceção do leite em pó, apesar de a equação 4 apresentar um baixo valor para  $r^2$  (41,61 %), foi a que apresentou valores mais próximos de digestibilidade *in vitro*, quando comparadas com a digestibilidade *in vivo*. Entretanto, ao se fazer uma regressão somente com amostras de carne, a curva exponencial apresenta um  $r^2$  de 36,64 %. A dieta contendo leite em pó foi o alimento de origem animal que apresentou menor valor de digestibilidade. A digestibilidade para a dieta contendo leite em pó foi inferior à de caseína, porém a

caseína é o maior constituinte protéico do leite, representando cerca de 80 % do total das proteínas (DUARTE *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2002). A presença de lactose no leite em pó provavelmente provoca leve diarreia nos animais experimentais, aumentando o trânsito intestinal e, conseqüentemente, a excreção de nitrogênio. Assim, a digestibilidade *in vivo* da dieta de leite em pó é diminuída. Retirando-se o leite em pó e fazendo novamente o gráfico para as amostras de origem animal (Figura 5), observa-se um comportamento linear para as amostras de origem animal, com digestibilidade *in vivo* média de 93,24 %, independente a origem da amostra animal e do valor obtido para a queda de pH, demonstrando que todas as proteínas de origem animal possuem alta digestibilidade.

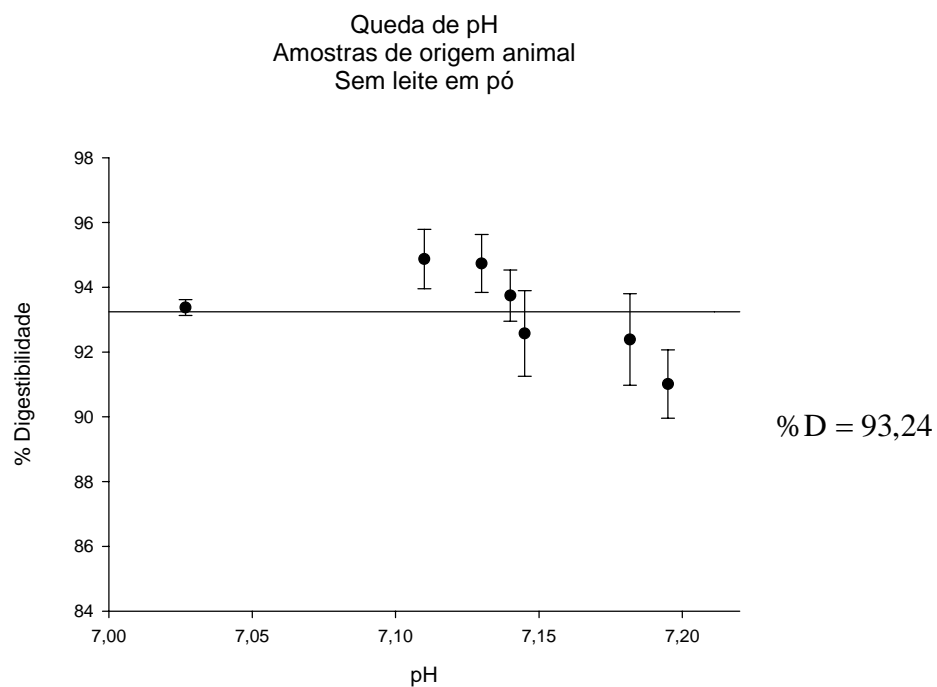


Figura 5 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do Método queda de pH e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem animal, sem a amostra de leite em pó. Cada ponto representa a média de seis repetições.

Tabela 3 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* calculados para cada uma das equações a 10 min (Método queda de pH)

Fonte de proteínas	Digestibilidade <i>in vivo</i>	Digestibilidade <i>in vitro</i>			
		Todas as amostras <sup>1</sup>	Exceto caseína <sup>2</sup>	Amostras Vegetais <sup>3</sup>	Amostras Animais <sup>4</sup>
Caseína comercial	94,27	95,69	-	-	-
Arroz	92,12	94,83	95,27	91,53	-
Aveia	87,39	90,00	90,11	87,72	-
Carne bovina	92,38	89,65	89,74	-	91,70
Carne de frango	94,73	90,78	90,93	-	92,64
Carne de peixe	94,87	91,16	91,34	-	92,95
Carne suína	93,74	90,57	90,71	-	92,47
Carne de rã sem osso	93,38	94,06	92,81	-	92,54
Carne de rã mecanicamente separada	92,57	90,47	90,61	-	92,57
Carne de rã com osso	91,01	89,33	89,41	-	91,44
Feijão Pérola	78,70	82,28	82,07	81,13	-
Leite em pó	87,32	88,51	88,55	-	90,75
Proteína de soro de leite	93,69	94,17	94,56	-	95,33
Proteína texturizada de soja	86,41	90,81	90,97	88,39	-
Milho (fubá)	82,38	84,10	84,37	82,72	-
Quinoa	85,95	84,50	84,37	83,07	-
Soja	78,05	78,05	77,72	77,35	-
Trigo (farinha de trigo)	89,44	90,97	91,14	88,51	-

$$^1 \% D^* = 97,1887^* x(1 - e^{-3,1245^* x(8-pH)}) \quad r^2 = 0,7676$$

$$^2 \% D^* = 97,9045^* x(1 - e^{-3,0365^* x(8-pH)}) \quad r^2 = 0,7624$$

$$^3 \% D^* = 93,1359^* x(1 - e^{-3,4138^* x(8-pH)}) \quad r^2 = 0,8848$$

$$^4 \% D^{**} = 97,3704^* x(1 - e^{-3,4757^* x(8-pH)}) \quad r^2 = 0,4161$$

\*Significativo a 1%

\*\*Significativo a 10 %

### **Método do pH estático**

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

As equações elaboradas a partir de valores em mL de NaOH gastos para manter o pH constante em 8,00 após a adição da solução de enzimas estão mostradas nas Figuras 5, 6, 7 e 8.

Na Figura 6 está a equação obtida usando os dados de digestibilidade *in vivo* e mL de NaOH gastos para manter o pH em 8,00 de todas as fontes proteicas. A equação obtida é exponencial e possui um  $r^2$  de 70,33 %. Na Figura 7 foram utilizadas todas as fontes de proteína, com exceção da caseína, obtendo-se, assim, uma equação com  $r^2$  de 70,71 %. A curva que apresentou maior valor de  $r^2$  para o método do pH estático foi a curva elaborada somente com os volumes de NaOH e digestibilidade obtidos para proteínas de origem vegetal ( $r^2 = 84,84$  %, Figura 8). Observa-se na Figura 9, na qual foram utilizadas apenas amostras de origem animal, que os valores obtidos de digestibilidade e volume de NaOH não permitem um ajuste exponencial como para as outras três curvas (Figuras 6, 7 e 8), porque os valores de digestibilidade *in vivo* estão muito próximos, com exceção da amostra de leite em pó. E fazendo-se um ajuste polinomial quadrático observa-se um valor de  $r^2$  muito baixo (8,45 %) e tanto os parâmetros quanto a regressão são não significativos ( $p > 0,10$ ). Portanto, para os dados obtidos somente para amostras de origem animal, não foi construída uma curva para relacionar a digestibilidade com o volume gasto de NaOH para manter o pH em 8,00. Para as amostras de origem animal deve-se utilizar as equações obtidas na Figura 6 ou na Figura 7. Como para o método de Queda de pH, ao se retirar a amostra de leite em pó, que apresentou digestibilidade baixa, provavelmente devido ao elevado teor de lactose, percebemos um comportamento linear para as amostras de origem animal, com digestibilidade média de 93,24 % (Figura 10).

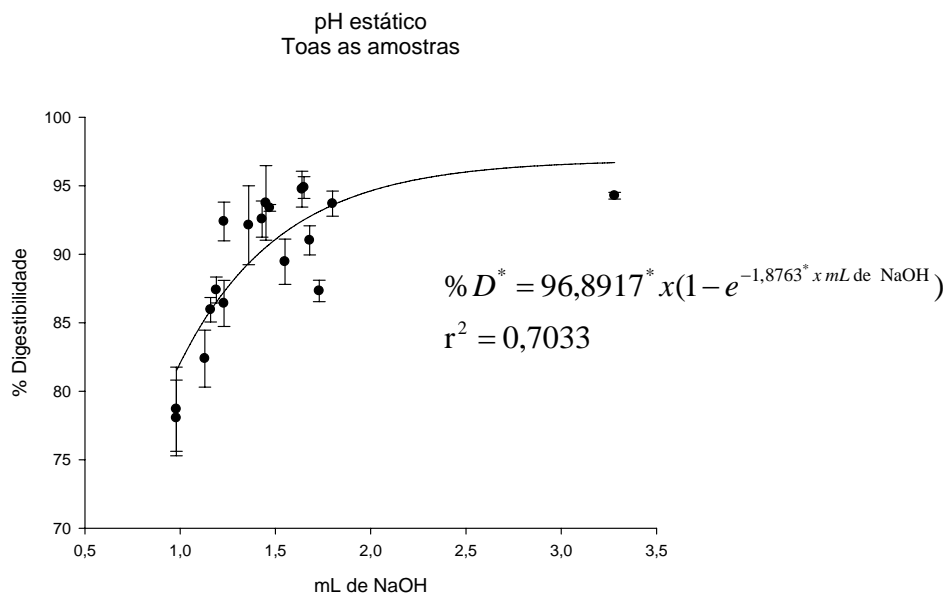


Figura 6 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 e da digestibilidade *in vivo* de todas as proteínas estudadas (Método pH estático). Cada ponto representa a média de seis repetições.

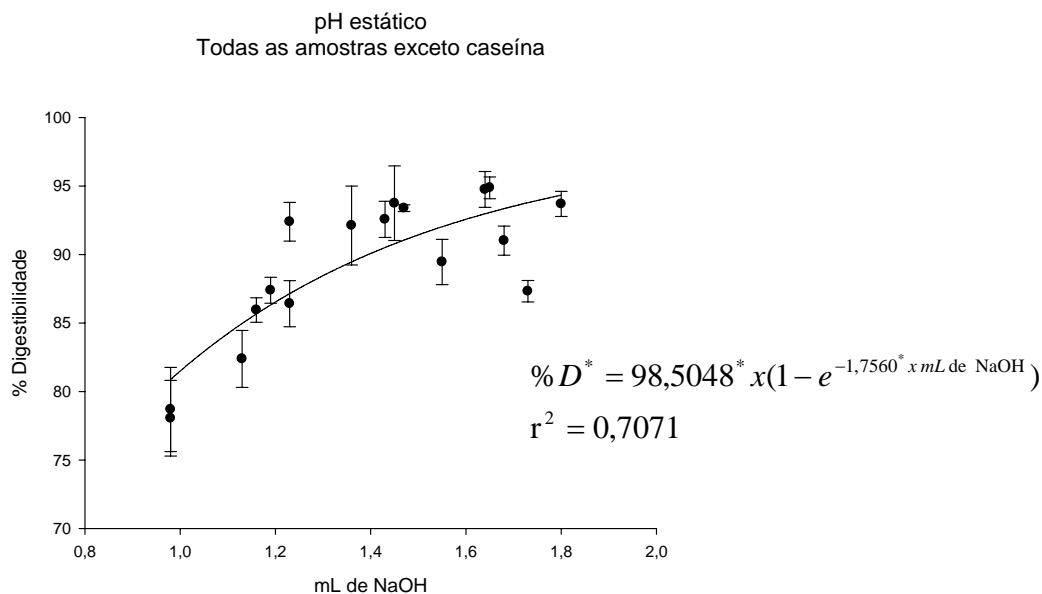


Figura 7 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 e da digestibilidade *in vivo* de todas as proteínas estudadas, exceto a caseína (Método pH estático). Cada ponto representa a média de seis repetições.

\*Significativo a 1%

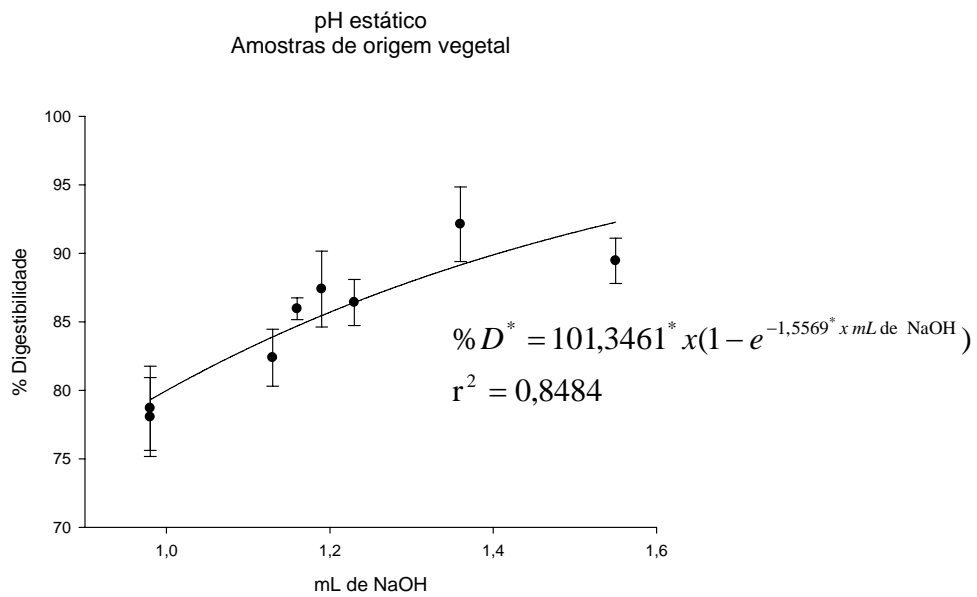


Figura 8 – Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 e da digestibilidade *in vivo* das proteínas de origem vegetal (Método pH estático). Cada ponto representa a média de seis repetições.

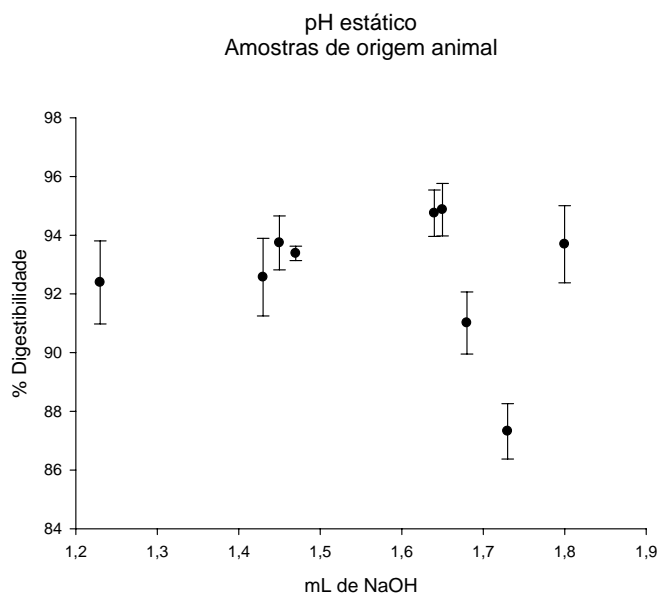


Figura 9 – Digestibilidade *in vivo* e volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 e da das proteínas de origem animal (Método pH estático). Cada ponto representa a média de seis repetições.

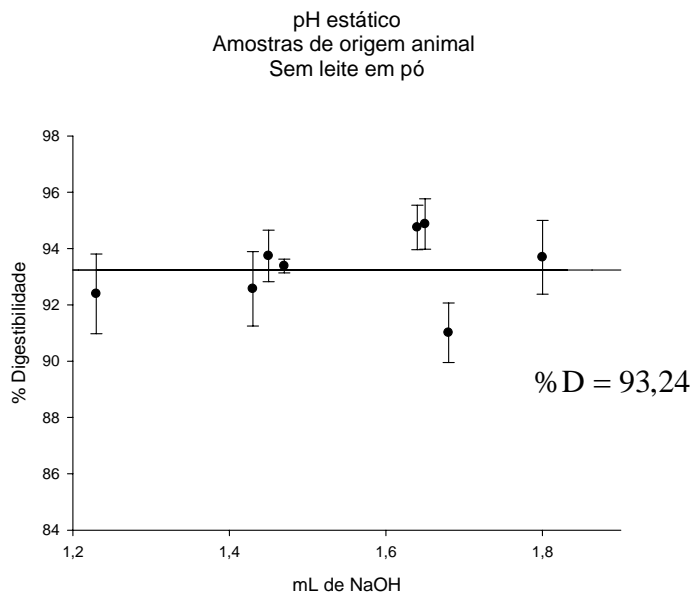


Figura 10 – Digestibilidade *in vivo* e volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 e da das proteínas de origem animal, sem a amostra de leite em pó (Método pH estático). Cada ponto representa a média de seis repetições.

Os resultados da digestibilidade *in vitro* calculados utilizando-se cada uma das equações obtidas pelo método do pH estático estão apresentados na Tabela 4. Todas as três equações obtidas permitiram a obtenção de valores de digestibilidade *in vitro* bem próximos aos da digestibilidade *in vivo*. A melhor correlação foi novamente encontrada utilizando apenas os valores obtidos para proteínas de origem vegetal, discordando dos dados obtidos por Pires *et al.*(2006), que para o método de pH estático, utilizando uma curva polinomial quadrática, encontraram um valor de  $r^2$  de 43,29 % ao trabalhar somente com proteínas de origem vegetal. Entretanto, Pires *et al.* (2006) encontraram uma maior correlação para todas as proteínas (84,98 %) e para todas as proteínas exceto caseína (83,78 %) em arranjos polinomiais quadráticos. Em nosso trabalho, foi escolhido o modelo exponencial por se adequar mais ao modelo biológico, por apresentar parâmetros e regressões significativas ( $p < 0,01$ ) e por apresentar um valor de  $r^2$  maior que os valores para um ajuste polinomial quadrático para algumas das equações obtidas.

Tabela 4 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* calculados para cada uma das equações (Método pH estático)

Fonte de proteínas	Digestibilidade <i>in vivo</i>	Digestibilidade <i>in vitro</i>		
		Todas as amostras <sup>5</sup>	Exceto caseína <sup>6</sup>	Amostras Vegetais <sup>7</sup>
Caseína comercial	94,27	96,69	-	-
Arroz	92,12	89,34	89,46	89,15
Aveia	87,39	86,50	86,32	85,45
Carne bovina	92,38	87,25	87,14	-
Carne de frango	94,73	92,43	92,97	-
Carne de peixe	94,87	92,51	93,07	-
Carne suína	93,74	90,51	90,78	-
Carne de rã sem osso	91,01	92,75	93,35	-
Carne de rã mecanicamente separada	92,57	90,27	90,51	-
Carne de rã com osso	93,38	90,75	91,05	-
Feijão Pérola	78,70	81,48	80,88	79,31
Leite em pó	87,32	93,12	93,78	-
Proteína de soro de leite	93,69	93,58	94,33	-
Proteína texturizada de soja	86,41	87,25	87,14	86,41
Milho (fubá)	82,38	85,26	84,96	83,90
Quinoa	85,95	85,90	85,66	84,69
Soja	78,05	81,48	80,88	79,31
Trigo (farinha de trigo)	89,44	91,60	92,03	92,27

$$^5 \% D^* = 96,8917 * x(1 - e^{-1,8763 * x \text{ mL de NaOH}}) \quad r^2 = 0,7033$$

$$^6 \% D^* = 98,5048 * x(1 - e^{-1,7560 * x \text{ mL de NaOH}}) \quad r^2 = 0,7071$$

$$^7 \% D^* = 101,3461 * x(1 - e^{-1,5569 * x \text{ mL de NaOH}}) \quad r^2 = 0,8484$$

\*Significativo a 1%

Pelo método do pH estático para digestibilidade *in vitro*, Cruz *et al.* (2005) obtiveram os maiores valores de  $r^2$  comparados com os ensaios de digestibilidade *in vivo* de diferentes variedades de feijões recém-colhidos e armazenados. O método permitiu obter valores de  $R^2$  que variaram de 75 a 83 %.

Para todas as curvas observadas, o método de queda de pH foi o que apresentou os maiores valores de  $r^2$ . Portanto, para se determinar a digestibilidade *in vitro* para proteínas de origem vegetal, recomenda-se a utilização do método de queda de pH, utilizando-se a equação 3, obtida com valores de digestibilidade de proteínas vegetais. Para determinar a digestibilidade *in vitro* para proteínas de origem animal, recomenda-se o método de queda de pH, utilizando a equação 1, obtida utilizando os valores de todas as amostras. Na Tabela 5 temos os valores de digestibilidade *in vitro* obtidos utilizando a equação 1 para amostras de origem animal e a equação 3 para amostras de origem vegetal.

Utilizando os valores obtidos para digestibilidade *in vivo* e digestibilidade *in vitro* calculadas utilizando as equações 1 e 3 (Tabela 5), obtemos uma relação linear com um  $R^2$  de 86,12 % (Figura 9). Desta forma, a partir da equação obtida na Figura 11, podemos prever a digestibilidade *in vivo*.

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.

A digestibilidade determinada utilizando a equação obtida na Figura 11 varia de 0,44 a 5,22 % com relação à digestibilidade verdadeira obtida *in vivo*. Portanto, método de queda de pH é um bom método para determinar a digestibilidade *in vitro* de alimentos, permitindo, assim, o uso desta metodologia para a predição da digestibilidade de proteínas. Técnicas *in vitro* são mais baratas e necessitam de menor mão de obra e espaço físico, além de gastar uma pequena quantidade da fonte proteica.

Tabela 5 – Valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* calculados para cada uma das amostras pelo Método de queda de pH.

Fonte de proteínas	Digestibilidade <i>in vivo</i> (%)	Digestibilidade <i>in vitro</i> (%)	Digestibilidade <i>in vivo</i> predita <sup>9</sup> (%)
Caseína comercial	94,27	95,69 <sup>1</sup>	93,85
Arroz	92,12	91,53 <sup>3</sup>	90,40
Aveia	87,39	87,72 <sup>3</sup>	87,24
Carne bovina	92,38	89,65 <sup>1</sup>	88,84
Carne de frango	94,73	90,78 <sup>1</sup>	89,78
Carne de peixe	94,87	91,16 <sup>1</sup>	90,10
Carne suína	93,74	90,57 <sup>1</sup>	89,61
Carne de rã sem osso	93,38	94,06 <sup>1</sup>	92,50
Carne de rã mecanicamente separada	92,57	90,47 <sup>1</sup>	89,52
Carne de rã com osso	91,01	89,33 <sup>1</sup>	88,58
Feijão Pérola	78,70	81,13 <sup>3</sup>	81,77
Leite em pó	87,32	88,51 <sup>1</sup>	87,90
Proteína de soro de leite	93,69	94,17 <sup>1</sup>	92,59
Proteína texturizada de soja	86,41	88,39 <sup>3</sup>	87,80
Milho (fubá)	82,38	82,72 <sup>3</sup>	83,09
Quinoa	85,95	83,07 <sup>3</sup>	83,38
Soja	78,05	77,35 <sup>3</sup>	78,64
Trigo (farinha de trigo)	89,44	88,51 <sup>3</sup>	87,90

$$^1 \% D^* = 97,1887^* x(1 - e^{-3,1245^* x(8-pH)}) \quad r^2 = 0,7676$$

$$^3 \% D^* = 93,1359^* x(1 - e^{-3,4138^* x(8-pH)}) \quad r^2 = 0,8848$$

$$^9 \% D^* \text{ in vivo predita} = 14,46 + 0,8297^* x(\% D \text{ in vitro}) \quad R^2 = 0,8612$$

\*Significativo a 1%

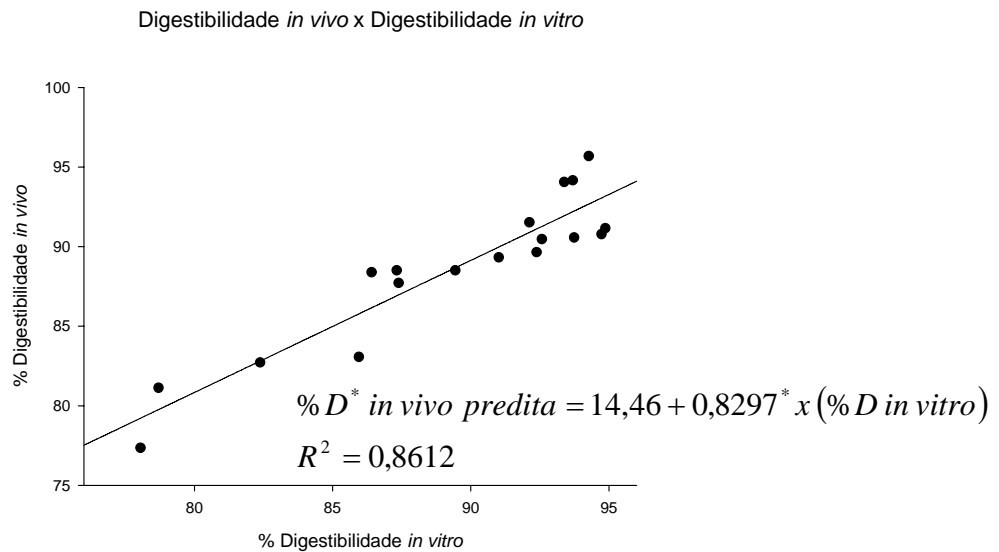


Figura 11 – Digestibilidade *in vivo* e digestibilidade *in vitro*, utilizando as equações de melhor ajuste para determinar a digestibilidade *in vitro*, pelo método de queda de pH.

A digestibilidade de uma fonte proteica pode variar dependendo da procedência, da variedade, de tratamentos térmicos ou outros tipos de processamentos. Assim, técnicas *in vitro* podem ser utilizadas para prever a digestibilidade de uma nova variedade ou de um processamento diferente do alimento, com um menor custo (PIRES *et al.*, 2006)

## 2.5. CONCLUSÃO

Os dois métodos analisados neste trabalho apresentaram boa correlação com a digestibilidade *in vivo*. As alterações utilizando apenas as enzimas tripsina e pancreatina tornam a metodologia mais barata e não interferem na correlação com a digestibilidade *in vivo*. As equações desenvolvidas pelo método de queda de pH permitiram a obtenção de valores de digestibilidade *in vitro* com maior grau de correlação com os resultados de digestibilidade *in vivo* do que as equações obtidas

pelo método do pH estático. Tal fato indica a possibilidade de utilização, pelas indústrias de alimentos, de ensaios da digestibilidade *in vitro* de produtos alimentícios para prever a digestibilidade proteica, desde que sejam devidamente respeitados todos os critérios adequados para o uso desse parâmetro bioquímico. Esta técnica também é muito útil para estudos de melhoramento genético, pois pode auxiliar na tomada de decisões de variedades que possuam melhor digestibilidade proteica de forma mais rápida e com uma menor quantidade de material.

## 2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14. ed. Arlington: 1984. 1141p.

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

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.

CRUZ, G. A. D. R.; OLIVEIRA, M. G. A.; COSTA, N. M. B.; PIRES, C. V.; CRUZ, R.; MOREIRA, M.A. Comparação entre a digestibilidade proteica *in vitro* e *in vivo* de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenados por 30 dias. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 265 - 271, 2005.

HERNÁNDEZ, M.; LA VEJA, A.; SOTELO, A. Determinación de la digestibilidad proteica *in vitro* e *in vivo* en cereais y leguminosas, crudos e cocidos. **Archivos Latinoamericanos Nutricion**, 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. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 5, p. 1269-1273, 1977.

MENDES, F. Q.; OLIVEIRA, M G. A.; CARDOSO, L. R.; COSTA, N. M. B.; SANT'ANA, R. C. O. Digestibilidade proteica e caracterização bromatológica de linhagens de soja com ausência ou presença do inibidor de tripsina kunitz e das isozimas lipoxigenases. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 1, p. 14-21, 2007.

MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade proteica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1114-1121, 2007.

MILLWARD, D. J., LAYMAN, D. J.; TOMÉ, D.; SCHAAFSMA, G. Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 87 (suppl), p. 1576S-1581S, 2008

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

NERGIZ C. & GÖKGÖZ, E. Effect of traditional cooking *in vitro* protein digestibility of dry bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in Turkey. **International Journal of Food Science and Technology**, vol. 42, p. 868-873, 2007.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; CRUZ, G. A. D. R.; MENDES, F. Q.; COSTA, N. M. B. Digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de proteínas de alimentos: estudo comparativo. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 13-23, 2006.

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. **Journal Science Food Agricultural**, v. 53, n. 2, p. 215-228,1990.

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.

SANT'ANA, R. C. O. **Influência da extração do lipídio e da casca de diferentes fontes proteicas na digestibilidade *in vitro***. 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

SANTÉ-LHOUELIER, V.; ASTRUC, T.; MARINOVA, P.; GREVE, E.; GATELLIER, P. Effect of meat cooking on physicochemical state and *in vitro* digestibility of myofibrillar proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol.56, p. 1488-1494, 2008.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol 32, p. 1377-1382, 1984.

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

SHIMELIS, E. A. & RAKSHIT, S. K. Effecte of processing on antinutrients and *in vitro* protein digestibility of Kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. **Food Chemistry**, vol. 103, p. 161-172, 2007.

VARGAS, E.; BRASSANI, R.; NAVARRETE, D. Digestibilidad de la proteina y energia de dietas elaboradas a base de arroz y frijoles en humanos adultos. **Archivos Latinoamericanos Nutrición**, v. 34, n. 1, p. 109-129, 1984.

## CAPÍTULO 3

### QUALIDADE PROTEICA DE DIVERSOS ALIMENTOS

#### 3.1. RESUMO

O valor nutricional das proteínas depende de sua digestibilidade, da biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, ausência de toxicidade e fatores antinutricionais. O objetivo desse trabalho foi avaliar a digestibilidade proteica, o Coeficiente de eficiência proteica (PER) e Razão proteica líquida (NPR) das seguintes fontes de proteína: caseína, albumina, arroz, aveia, carne de frango, carne de peixe, carne suína, leite em pó, proteína de soro de leite, quinoa e cinco variedades de soja e determinar a atividade de inibidor de tripsina nas cinco variedades de soja. A avaliação da qualidade proteica foi conduzida por ensaios biológicos, durante 14 dias, utilizando-se ratos recém desmamados. As dietas continham teores de 9 a 10% de proteína e 7 % para a dieta de arroz. Foi determinada a atividade de inibidor de tripsina nas amostras de soja. As dietas de caseína, albumina, arroz, proteína de soro de leite e as carnes de porco, peixe e frango apresentaram maiores valores de digestibilidade, variando de 92,12 % a 95,54 %, não diferindo entre si, Enquanto as dietas de soja apresentaram menores valores de digestibilidade (73,23 % a 78,04 %). Quanto ao PER e NPR, as proteínas de origem animal (leite em pó, caseína, albumina, proteína de soro e as carnes de porco, peixe e frango) apresentaram os maiores valores. Os valores encontrados para a inibição de tripsina variaram de 100,71 mg de tripsina inibida por g de proteína para a soja UFV TN 105 KL (expressão bloqueada para lipoxigenases e inibidor de tripsina Kunitz – KTI) e 157,72 mg de tripsina inibida por g de proteína para a soja UFV TN 105 (expressão bloqueada para lipoxigenases). A menor digestibilidade das variedades de soja prova que a presença de fatores antinutricionais reduz a biodisponibilidade das proteínas.

PALAVRAS-CHAVE: digestibilidade, inibidor de tripsina, urease

## 3.2. INTRODUÇÃO

As proteínas são compostos orgânicos complexos, essenciais aos organismos animal e humano, que têm sua estrutura básica formada por uma cadeia de aminoácidos que contém carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, tendo também enxofre, e algumas possuem elementos como fósforo, ferro e cobalto. Exercem importantes papéis no organismo humano, como carreadores de íons e moléculas no plasma sanguíneo, hormônios, células de defesa, fonte energética e estrutural. Fornecem ao organismo quantidades adequadas de aminoácidos para a síntese e manutenção dos tecidos corporais (PELUZIO & BATISTA, 2008).

A qualidade proteica é um aspecto importante de qualquer consideração de necessidade proteica humana. Portanto, torna-se importante não somente a quantidade, como o tipo ou qualidade da proteína ingerida (MILLWARD *et al.*, 2008).

Existem dois aspectos importantes na determinação da qualidade proteica: as características das proteínas e a matriz alimentar em que a proteína é consumida e o estado fisiológico do indivíduo que a recebe (MILLWARD *et al.*, 2008).

O aspecto qualitativo das proteínas, isto é, o seu valor nutricional, depende da composição, digestibilidade, biodisponibilidade de aminoácidos indispensáveis, fonte, efeitos do processamento e presença ou ausência de toxicidade e fatores antinutricionais (FRIEDMAN, 1996).

A medida da digestibilidade indica o quanto das proteínas são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo (BRESSANI & ELIAS, 1983), constituindo o primeiro fator que afeta a eficiência da utilização proteica 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 microorganismos do intestino grosso (SGARBIERI & WHITAKER, 1982).

Diversos fatores podem interferir na digestibilidade, incluídos dentre estes 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).

A presença de compostos inerentes ao próprio alimento, por exemplo, fatores antinutricionais, como inibidores de proteases (tripsina e quimotripsina), ácido fítico, taninos 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, podem levar à diminuição da qualidade nutricional (VARGAS *et al.*,1984). Muitos desses compostos, presentes em alimentos originários de leguminosas, podem causar efeitos bioquímicos e fisiológicos tanto no pâncreas quanto no crescimento de animais (GUEN & BIRK, 1993; YADAV & KHETARPAUL, 1994).

Existem diversos outros métodos para avaliar a qualidade proteica. Dentre eles o PER e o NPR:

O PER - Coeficiente de eficiência proteica - 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. 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 maior que 2,0 indica proteína de alta qualidade; entre 1,5-2,0, qualidade intermediária; e PER menor que 1,5, baixo valor nutricional (FRIEDMAN, 1996). Este método contém limitações: não pode ser extrapolado para crianças em fase de crescimento, uma vez que o requisito de aminoácidos para crianças é menor do que aqueles para ratos; 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.

O NPR - Razão proteica líquida - constitui uma modificação do PER e acrescenta ao ganho de peso do grupo com dieta proteica a perda de peso de um grupo com dieta apteica. O NPR é determinado no 14<sup>o</sup> dia do experimento, tomando-se o ganho de peso do grupo-teste mais a perda de peso do grupo de dieta apteica, 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.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a digestibilidade, o PER e o NPR das fontes proteicas: caseína, albumina, arroz, aveia, carne de frango, carne de peixe, carne suína, leite em pó, proteína de soro de leite, quinoa, soja IAC 17, soja IAC 24, soja IAC PL-1, soja UFV TN 105 e soja UFV TN 105 KL.

### **3.3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.3.1. Local do experimento**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), no Laboratório de de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos Prof. Marcos Luiz dos Mares Guia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) e no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) – MG.

Foram utilizadas as seguintes fontes de proteína: caseína, albumina, arroz, aveia, carne de frango, carne de peixe, carne suína, leite em pó, proteína de soro de leite, quinoa (cereal que é uma alternativa proteica de qualidade e é isenta de glúten) soja IAC 17 (resistente ao ataque do inseto *Anticarsia gemmatilis*), soja IAC 24 (resistente ao ataque do inseto *Anticarsia gemmatilis*, diferenciando da soja IAC 17 na produtividade), soja IAC PL-1 (convencional), soja UFV TN 105 (expressão bloqueada de lipoxigenases) e soja UFV TN 105 KL (expressão bloqueada de lipoxigenases e inibidor de tripsina kunitz).

As sojas IACPL-1, IAC 17 e IAC 24 foram fornecidas pelo Dr. André Luiz Lourenção do Instituto Agrônomo de Campinas.

### 3.3.2. Preparo das Amostras

Foi utilizada caseína comercial obtida da RHOSTER-Indústria e Comércio Ltda. Albumina e proteína de soro de leite foram obtidas da Arve alimentos. Foram utilizados aveia e leite em pó comercial.

Os grãos de arroz branco polido, adquirido no comércio de Viçosa, MG, foi coccionado em água, em panela doméstica. Após o cozimento, os grãos foram secos em estufa com circulação de ar, a 60 °C, por 24 horas. Em seguida, foram moídos em multiprocessador doméstico, marca Arno e passado em peneira de 16 mesh (1 mm), obtendo-se uma farinha de arroz.

As carnes de frango (peito de frango sem pele), de peixe (filé de Merluza) e suína (pernil sem gordura aparente), adquirido no comércio de Viçosa, MG, foram cozidas com água em panelas domésticas, na proporção de 1:1 (p/v), até secar a água. Após o cozimento, as carnes foram congeladas à -80°C, desidratadas em liofilizador por 24 horas e moídas em multiprocessador doméstico Arno e passadas em peneira de 16 mesh (1 mm).

As amostras de aveia, leite em pó e quinoa foram adquiridas no c de Viçosa, MG. A quinoa foi moída em multiprocessador e passada em peneira de 16 mesh (1 mm).

As sojas IAC 17 (resistente ao ataque do inseto *Anticarsia gemmatalis*), IAC 24 (resistente ao ataque do inseto *Anticarsia gemmatalis*), IAC PL-1 (convencional), UFV TN 105 (expressão bloqueada de lipoxigenases), UFV TN 105 KL (expressão bloqueada de lipoxigenases e inibidor de tripsina kunitz) foram submetidas a tratamento térmico em estufa com calor seco de 105°C por 6 horas, em seguida os grãos foram moídos em multiprocessador doméstico e passada em peneira de 16 mesh (1 mm), obtendo-se, então, uma farinha de soja.

### 3.3.3. Determinação da atividade de urease

A intensidade do tratamento térmico foi avaliada através da inativação da enzima urease. Para isso, pesou-se 0,2 g da amostra em um tubo de ensaio. Em seguida, o tubo foi tampado e colocado em banho-maria a 30°C. A cada 2 minutos

foi adicionado aos tubos 10 mL de uma solução tampão de uréia (15 g de uréia dissolvida em 500 mL de solução tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 e ajustou o pH para 7,0). O branco foi preparado com 0,2 g de amostra e 10 mL da solução tampão fosfato 0,05 M. Os tubos foram fechados e agitados a cada cinco minutos. Passados 30 minutos, o conteúdo dos tubos foi transferido para béqueres e o pH medido em potenciômetro devidamente equilibrado. A determinação do pH entre os tubos testes e o branco foi de no mínimo 2 minutos. Entre as determinações de pH o eletrodo foi lavado com solução de HCl 0,1 N para remover uma possível camada de proteína aderida á superfície do vidro. (CARDOSO et al, 2007)

### **3.3.4. Determinação do teor de nitrogênio**

O teor de proteína de cada amostra foi determinado pelo método semimicro Kjeldhal, segundo AOAC (1984). No cálculo de conversão do nitrogênio em proteínas foi utilizado o fator 6,25.

### **3.3.5. Ensaio Biológico**

Foram realizados dois ensaios biológicos. Para o primeiro ensaio foram preparadas uma dieta aprroteica, duas dietas de caseína (padrões com teores de proteínas de 9,5 % e 7 %) e as dietas testes (arroz, carne de frango, carne de peixe, carne suína, soja IAC PL 1, soja IAC 17 e soja IAC 24) conforme apresentado na Tabela 1. Para o segundo ensaio foram preparadas uma dieta aprroteica, uma dieta de caseína (padrão com teor de proteínas de 9,5 %) e as dietas testes (albumina, aveia, leite em pó, proteína de soro de leite, quinoa, soja UFV TN 105 e soja UFV TN 105 KL) conforme apresentado na Tabela 2.

Foram utilizadas duas dietas de caseína com a finalidade de comparar com a dieta de arroz, uma vez que o arroz possui cerca de 8 % de proteína, o que inviabiliza o preparo de uma dieta com 9,5 % de proteína. Portanto, a dieta de arroz também continha 7 % de proteína. Desta forma, a única variação é a fonte proteica, não variando a quantidade proteica.

A composição das dietas foi baseada na AIN-93G, segundo Reeves *et al.*(1993), com o teor de proteínas alterado para 7 % ou 9,5 %. As quantidades de outros ingredientes da dieta (amido, amido dextrinizado, sacarose, óleo e celulose) também foram alterados, de acordo com a composição dos alimentos testados, de forma que as dietas fossem isocalóricas e isoproteicas (Tabela 1).

Após o preparo, determinou-se o teor de proteína de cada dieta. As dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente rotulados e armazenados em refrigerador. Foram utilizados 60 ratos machos no primeiro ensaio e 54 ratos no segundo ensaio, raça Wistar, recém desmamados, com média de 23 dias de idade, peso variando de 50 a 60 gramas, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os animais foram divididos em dez grupos com seis animais cada para o primeiro ensaio e nove grupos para o segundo ensaio, de modo que a média dos pesos entre os grupos não excedesse a 10 g. Os ratos foram alocados em gaiolas individuais, onde receberam água e suas dietas ad libitum, por 14 dias. Os animais foram mantidos em condições de temperatura de  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  e foi feito o monitoramento do consumo alimentar e ganho de peso semanalmente.

O experimento foi conduzido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal – COBEA – e as normas internacionais.

Tabela 1: Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico (g/100g de mistura)

<b>Ingredientes</b>	<b>CAS 1</b>	<b>CAS 2</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D4</b>	<b>D5</b>	<b>D6</b>	<b>D7</b>	<b>LN</b>
Caseína <sup>1</sup>	11,80	8,32	-	-	-			-	-	-
Arroz	-	-	82,95	-	-			-	-	-
Carne de frango	-	-	-	12,66	-			-	-	-
Carne de peixe	-	-	-	-	13,42			-	-	-
Carne suína						13,15				
Soja IAC PL 1							21,01			
Soja IAC 17	-	-	-	-	-			21,39	-	-
Soja IAC 24	-	-	-	-	-			-	21,56	-
Amido dextrinizado <sup>1,*</sup>	13,2	13,2	-	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose <sup>2</sup>	10,0	10,0	-	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de soja <sup>2</sup>	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	4,37	3,22	3,21	3,12	7,0
Fibra alimentar (Celulose) <sup>1</sup>	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-	-	-	5,0
Mistura Salínica (AIN-93G-MX) <sup>1,*</sup>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica (AIN-93G-VX) <sup>1,*</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
L-cistina <sup>1,*</sup>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina <sup>1,*</sup>	0,25	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) <sup>2</sup>	47,95	51,43	-	47,09	46,33	49,24	47,52	47,15	47,07	59,75

<sup>1</sup> Obtido da RHOSTER – Indústria e Comércio Ltda.

\* Segundo Reeves *et al.* (1993)

<sup>2</sup> Obtido no comércio de Viçosa, MG

CAS 1: Dieta com caseína contendo 9,5 % de proteína; CAS 2: Dieta com caseína contendo 7 % de proteína D1: Dieta com arroz; D2: Dieta com carne de frango; D3: Dieta com carne de peixe; D4: Dieta com carne suína; D5: Dieta com soja IAC PL 1; D6: Dieta com soja IAC 17; D7: Dieta com soja IAC 24; LN: Dieta aprroteica.

Tabela 2: Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico (g/100g de mistura)

<b>Ingredientes</b>	<b>CAS</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D4</b>	<b>D5</b>	<b>D6</b>	<b>D7</b>	<b>LN</b>
Caseína <sup>1</sup>	11,80	-	-	-	-	-	-	-	-
Albumina	-	11,56	-	-	-	-	-	-	-
Aveia	-	-	52,41	-	-	-	-	-	-
Leite em pó	-	-	-	38,36	-	-	-	-	-
Proteína de soro de leite	-	-	-	-	13,27	-	-	-	-
Quinoa	-	-	-	-	-	73,48	-	-	-
Soja UFV TN 105	-	-	-	-	-	-	26,30	-	-
Soja UFV TN 105 KL	-	-	-	-	-	-	-	22,70	-
Amido dextrinizado <sup>1,*</sup>	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	8,53	13,2	13,2	13,2
Sacarose <sup>2</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	5,93	10,0	10,0	10,0
Óleo de soja <sup>2</sup>	7,0	7,0	7,0	-	7,0	7,0	2,27	3,12	7,0
Fibra alimentar (Celulose) <sup>1</sup>	5,0	5,0	0,33	5,0	5,0	-	-	-	5,0
Mistura Salínica (AIN-93G-MX) <sup>1,*</sup>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica (AIN-93G-VX) <sup>1,*</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
L-cistina <sup>1,*</sup>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina <sup>1,*</sup>	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) <sup>2</sup>	47,95	48,19	12,01	28,39	46,48	-	43,18	46,08	59,75

<sup>1</sup> Obtido da RHOSTER – Indústria e Comércio Ltda.

\* Segundo Reeves *et al.* (1993)

<sup>2</sup> Obtido no comércio de Viçosa, MG

CAS: Dieta com caseína; D1: Dieta com albumina; D2: Dieta com aveia; D3: Dieta com leite em pó; D4: Dieta com proteína de soro de leite;

D5: Dieta com quinoa; D6: Dieta com soja UFV TN 105; D7: Dieta com soja UFV TN 105 KL; LN: Dieta aprotéica.

### 3.3.6. Digestibilidade Verdadeira

Para a determinação da digestibilidade, as dietas foram marcadas com indigocarmin na proporção de 100 mg/100g e oferecidas aos animais no 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias. As fezes foram coletadas do 8<sup>o</sup> ao 11<sup>o</sup> dias em recipientes individuais para cada animal e mantidas sob refrigeração. No 8<sup>o</sup> dia foram coletadas apenas as fezes marcadas; no 9<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias foram coletadas todas as fezes; e no 11<sup>o</sup> dia foram coletadas apenas as fezes não marcadas pelo corante.

Ao término do experimento, as fezes foram secas 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 triplicata.

A digestibilidade verdadeira foi calculada medindo a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, a 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:

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

I = Nitrogênio ingerido pelo grupo teste.

F = Nitrogênio fecal do grupo teste.

FK = Nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

### 3.3.7. Coeficiente de eficiência proteica (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:

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

### 3.3.8. Razão proteica líquida (NPR)

O NPR será determinado, de acordo com Bender e Doell (1957), no 14<sup>o</sup> dia do experimento, levando-se em consideração o ganho de peso do grupo-teste, mais a perda de peso do grupo com dieta aprroteica, em relação ao consumo de proteína do grupo-teste. Foi calculado de acordo com a seguinte equação:

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

### 3.3.9. Determinação de atividade de inibidor de tripsina nas farinhas de soja

Cerca de 100 mg de amostra das farinhas de soja (triplicata) foram extraídas com 15 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2. Esta suspensão foi mantida sob agitação por 1 hora para extração dos inibidores. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 35.600 x g por 20 min. Alíquotas do sobrenadante obtidas foram utilizadas para a determinação da atividade de tripsina.

Os reagentes utilizados para essas determinações foram: Tripsina pancreática bovina e o substrato sintético N-benzoil- L-arginina-p-nitroanilida (L-BApNA), obtidos da Sigma Chemical Co. Solução estoque de tripsina foi preparada em HCl 0,001 M e armazenadas a -20°C. Durante a realização das atividades as enzimas foram mantidas em banho de gelo. Solução estoque de L-BApNA 60 mM foi preparada a partir de 130,47 mg de substrato em 5 mL de dimetilsulfóxido e armazenada a -20°C. A concentração da solução utilizada nos experimentos foi de 1,2 mM, sendo preparada a partir de 200 µL da solução estoque diluída em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM. A solução de trabalho foi preparada na hora do uso, mantendo-se estável por cerca de duas horas.

A determinação da atividade de tripsina na presença dos extratos protéicos das farinhas de soja foi feita pelo método descrito por Erlanger *et al.* (1961). Para o procedimento analítico, foram pipetados 400 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM, 50 µL da solução de tripsina (1,67 x 10<sup>-5</sup> M) e 150 µL do extrato (1,2 x 10<sup>-3</sup> M). Os controles da atividade da enzima foram preparados substituindo-se o extrato por tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Esta mistura foi agitada lentamente e deixada à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período, 500 µL dessa mistura foram retirados e transferidos para outro tubo já contendo 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, com CaCl<sub>2</sub> 20 mM e 500 µL da solução de D,L-BApNA. A absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro a 410 nm por cinco minutos

A atividade da tripsina foi determinada pela hidrólise do substrato D,L-BApNA, sob condições controladas. Durante a hidrólise, o produto p-nitroanilida liberado foi determinado espectrofotometricamente a 410 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar 8.800 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (ERLANGER *et al.*, 1961).

Durante a reação, a concentração de enzima foi de 1,39 x 10<sup>-6</sup> M e de substrato foi de 4,0 x 10<sup>-4</sup> M.

Os resultados foram convertidos em mg tripsina pura inibida por g de proteína por meio da equação (KAKADE *et al.*, 1974):

$$\text{mg de tripsina inibida / g de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 1000 \times P}$$

Na qual:

A = absorbância do controle enzimático (410 nm) menos absorbância da solução contendo extrato protéico (410 nm);

B = fator de correção da amostra;

C = fator de tripsina ou fator de quimotripsina. Este fator corresponde a absorbância em 410 nm do produto da atuação de 1 µg de tripsina ou quimotripsina sob o substrato D,L-BApNA para tripsina ou L-BTpNA para quimotripsina, nas condições de ensaio. C = 0,0188 (CARDOSO *et al.*, 2007)

P = concentração de proteína em g/g da amostra; determinado pelo método semimicro Kjeldahl.

### **3.3.10. 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, por intermédio do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG).

## **3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.4.1. Teor de proteínas**

O teor de proteínas nas amostras estudadas está representado na Tabela 3, em base úmida (BU) e em base seca (BS). Caseína e albumina apresentaram os maiores teores proteína, não diferindo entre si ( $p < 0,05$ ). O arroz apresentou o menor teor de proteínas, seguido pela quinoa e pela aveia (Tabela 3).

### **3.4.2. Avaliação biológica das proteínas**

Os valores de PER, PER relativo (RPER), NPR, NPR relativo (RNPR) e digestibilidade do primeiro experimento estão mostrados na Tabela 4 e do segundo experimento na Tabela 5. Os valores de PER relativo (RPER) e NPR relativo (RNPR) foram calculados considerando os valores de PER e NPR da dieta padrão de caseína como 100 %.

Observa-se na Tabela 4 que o teor de caseína na dieta não afetou a qualidade proteica. Os valores de digestibilidade, PER e NPR não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) para as dietas de caseína com 9,5 ou 7 %. Os animais ganham menos peso, porém a ingestão de proteína foi menor, não alterando os valores de PER e NPR. Portanto, pode-se comparar dietas contendo um teor de proteínas de 7 % a 9,5 % com a dieta de caseína padrão contendo 9,5 % de proteínas.

Tabela 3: Teores de proteínas das amostras analisadas

Fontes de Proteína	Proteínas (g/100 g)	
	BU	BS
Caseína	80,49a	89,42a
Albumina	82,16a	91,53a
Arroz	8,34j	8,87k
Aveia	18,13h	19,74i
Carne de frango	75,04b	86,03b
Carne de peixe	70,78c	80,96c
Carne suína	72,27bc	77,65d
Leite em pó	24,77g	26,66h
Proteína de soro de leite	71,59c	77,55d
Quinoa	12,93i	14,19j
Soja IAC PL 1	45,21d	48,00e
Soja IAC 17	44,40de	47,12e
Soja IAC 24	44,06de	46,36ef
Soja UFV TN 105	36,12f	38,02g
Soja UFV TN 105 KL	41,84e	44,00f

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

Os valores obtidos para a digestibilidade das amostras estudadas variaram entre 73,24 % (soja IAC 24) e 95,54 % (albumina) (Tabela 4 e 5). A digestibilidade verdadeira da albumina não diferiu ( $p>0,05$ ) dos valores encontrados para a digestibilidade da caseína (92,84 %) e proteína de soro de leite (93,69%), encontradas no segundo experimento (Tabela 5). No primeiro experimento, o maior valor de digestibilidade encontrado foi para a carne de peixe (94,87 %), mas não diferiu ( $p>0,05$ ) da dieta de caseína (94,27 %), carne de frango (94,73 %), e carne suína (93,74 %) . Pires *et al.*(2006) observaram valores de digestibilidade verdadeira de 93,33 % para caseína comercial e de 92,38 % para carne bovina, valores bem próximos aos encontrados no presente trabalho para a caseína e para as carnes de peixe, porco e frango. Usydus *et al.* (2009), estudando a digestibilidade de diversos

Tabela 4: PER, RPER (PER relativo), NPR, RNPR (NPR relativo) e digestibilidade para o primeiro experimento.

Dieta	PER	RPER (%)	NPR	RNPR (%)	Digestibilidade (%)
Caseína (9,5 %)	4,01a	100,00	4,53a	100,00	94,27 <sup>a</sup>
Caseína (7 %)	4,42a	110,22	5,21a	115,01	93,56 <sup>a</sup>
Arroz	2,57b	64,09	3,62b	79,91	92,12 <sup>a</sup>
Carne de frango	4,29a	106,98	4,76a	105,07	94,73 <sup>a</sup>
Carne de peixe	4,15a	103,49	4,70a	103,75	94,87 <sup>a</sup>
Carne suína	4,05a	100,99	4,52a	99,78	93,74 <sup>a</sup>
Soja IAC PL-1	1,78c	44,39	2,64c	58,28	78,05bc
Soja IAC 24	1,56c	38,90	2,42c	53,42	73,24c
Soja IAC 17	1,59c	39,65	2,41c	53,20	74,15c

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

Tabela 5: PER, RPER (PER relativo), NPR, RNPR (NPR relativo) e digestibilidade para o segundo experimento.

Dieta	PER	RPER (%)	NPR	RNPR (%)	Digestibilidade (%)
Caseína	3,65a	100,00	4,63a	100,00	92,84 <sup>a</sup>
Albumina	3,30a	90,41	4,36a	94,17	95,54 <sup>a</sup>
Aveia	2,09b	57,26	3,33b	71,92	87,84b
Leite em pó	3,76a	103,01	4,69a	101,30	87,32b
Proteína de soro de leite	3,62a	99,18	4,59a	99,14	93,69 <sup>a</sup>
Quinoa	2,13b	58,39	3,68b	79,48	85,95b
Soja UFV TN 105	0,74c	20,27	2,37c	51,18	76,38c
Soja UFV TN 105 KL	1,59bc	43,56	3,16b	68,63	77,70c

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

produtos de peixe, encontraram valores que variaram de 90,6 a 98,7 %, resultados que ressaltam a alta digestibilidade de proteínas de origem animal.

A digestibilidade da proteína do arroz foi de 93,56 %, não diferindo ( $p>0,05$ ) da caseína 7 % (Tabela 4). Boisen *et al.* (2001), estudando a digestibilidade de diferentes variedades de arroz, encontraram valores de digestibilidade variando de 92,5 % a 98,8 %.

As digestibilidades das proteínas de origem animal e do arroz se apresentaram elevadas, com relação às proteínas de origem vegetal, por não apresentarem fatores antinutricionais. Desta forma, as proteínas presentes no arroz são facilmente digeridas e absorvidas, porém não necessariamente bem utilizadas para crescimento e manutenção, uma vez que os valores de PER e NPR correspondem a 64,1 e 79,9 em relação à caseína, respectivamente.

De todas as proteínas analisadas aquelas que apresentaram menor digestibilidade verdadeira foram as variedades de soja. A soja convencional IAC PL 1 apresentou maior valor de digestibilidade entre elas (78,05 %), não diferindo das demais ( $p>0,05$ ). Isto mostra que a resistência ao ataque da lagarta *Anticarsia gemmatilis* não influenciou na qualidade nutricional da semente de soja. A soja UFV TN 105 KL apresentou valor de digestibilidade (77,70 %) semelhante ao da soja UFV TN 105 (76,78 %). A eliminação genética do inibidor de tripsina Kunitz na variedade de soja UFV TN 105 KL não levou a um aumento significativo na digestibilidade proteica (Tabela 5). Fato também observado por Pires *et al.* (2006), que encontraram digestibilidade de 74,26 % para a soja isenta de lipoxigenase e inibidor de tripsina Kunitz.

Os valores de digestibilidade para quinoa e aveia foram semelhantes ( $p>0,05$ ). A aveia apresentou digestibilidade de 87,84 % e a quinoa de 85,95 %. Ranhotra *et al.* (1993) encontraram digestibilidade aparente de 84,3 % para a quinoa, valor semelhante ao encontrado no presente estudo.

A digestibilidade verdadeira para o leite em pó foi inferior ( $p<0,05$ ) à da caseína, albumina e soro de leite, possivelmente pelo excesso de açúcares que existe no leite em pó, que pode ter provocado um início de diarreia nos animais, aumentando a excreção de nitrogênio, diminuindo a digestibilidade.

Pode-se observar (Tabelas 4 e 5) que as digestibilidades de produtos de origem vegetal, com exceção do arroz, foram menores que a digestibilidade animal. Proteínas de origem vegetal possuem mais fatores antinutricionais que contribuem

para a diminuição da digestibilidade, como fitatos, taninos, inibidores de proteases (VARGAS *et al.*, 1984). Entretanto, a digestibilidade para fontes de origem vegetal pode estar subestimada, pois a presença de fibras fermentáveis pode aumentar a atividade da flora intestinal, aumentando a quantidade de nitrogênio presente nas fezes de origem endógena. Pereira & Costa (2002), avaliando a digestibilidade de proteínas de feijão preto sem casca em animais convencionais e isentos de germe (germ-free), observaram que os valores de digestibilidade com camundongos isentos de germes foram superiores aos camundongos convencionais, comprovando que a fermentação pela microbiota intestinal pode contribuir para subestimar a digestibilidade de alimentos vegetais ricos em fibra solúvel.

Os valores encontrados para PER, PER relativo (RPER), NPR e NPR relativo (RNPR) estão apresentados nas Tabelas 4 e 5. Os maiores valores encontrados tanto para PER quanto para NPR foram para as proteínas de origem animal. A fonte proteica que apresentou maior valor de PER foi a carne de frango (4,29), porém não diferiu das demais fontes proteicas de origem animal ( $p > 0,05$ ). O mesmo foi observado para os valores de NPR. Os menores valores de PER e NPR foram das variedades de soja, sendo que a variedade que apresentou menor valor foi a soja UFV TN 105. Os valores de PER para as variedades de soja estudadas variaram de 0,74 a 1,78, variando de 20,27 a 44,39 % do valor do PER da caseína. Os valores de NPR para as variedades de soja variaram de 51,18 a 68,63 % dos valores da caseína (Tabelas 4 e 5).

Pires *et al.* (2006) encontraram valores de PER de 40,35 % em relação à caseína para variedade de soja convencional e 39,06 % para variedade de soja isenta de inibidor de tripsina Kunitz, valores próximos aos encontrados para as variedades de soja no presente estudo. O mesmo foi observado para os valores de NPR. Pires *et al.* (2006) encontraram valores de 56,59 % em relação à caseína para a soja convencional e 55,96 % para a soja sem o inibidor de tripsina Kunitz.

Observa-se na Tabela 4 que a digestibilidade da dieta de arroz foi semelhante à de caseína e das proteínas de origem vegetal. Entretanto, o valor de PER foi 64,09 % do valor obtido para a caseína. Estes resultados demonstram que a digestibilidade por si só não determina a qualidade de uma proteína. A composição aminoacídica é importante também, uma vez que os aminoácidos podem estar

sendo bem absorvidos, mas podem não participar da síntese proteica em virtude da deficiência de alguns aminoácidos indispensáveis (PEREIRA & COSTA, 2002).

### 3.4.3. Teste de Urease

A Tabela 6 apresenta os resultados do teste de urease feito nas amostras de soja pra verificar o efeito do tratamento térmico nos grãos.

Tabela 6: Atividade de urease das sojas analisadas.

Amostras	$\Delta$ pH
Soja IAC PL-1	1,98
Soja IAC 17	1,70
Soja IAC 24	1,78
Soja UFV TN 105	1,56
Soja UFV TN 105 KL	1,39

O índice de urease elevado ( $>0,20$ ) indica que o calor aplicado foi insuficiente e índice de urease baixo ( $<0,05$ ), indica que o calor foi excessivo. Sendo assim, podemos observar que o tratamento térmico aplicado nesse trabalho ( $105^{\circ}\text{C}$  por 6 horas em estufa sem circulação de ar, calor seco) foi insuficiente para inativar os fatores antinutricionais das sojas, o que justifica a baixa digestibilidade encontrada para as variedades estudadas.

### 3.4.4. Atividade de inibidores de tripsina

Os conteúdos estimados de inibição de tripsina expresso em mg de tripsina inibida por grama de proteína das sementes e das farinhas estão mostrados na Tabela 7.

Os valores encontrados para a inibição de tripsina variaram de 100,71 mg de tripsina inibida por g de proteína para a soja UFV TN 105 KL (sem inibidor de tripsina Kunitz – KTI) e 157,72 mg de tripsina inibida por g de proteína para a soja UFV TN

105. Estes valores são semelhantes aos encontrados por Monteiro *et al.* (2003), que encontraram valores variando de 115,25 mg de tripsina inibida por g de proteína para a soja sem lipoxigenase e KTI a 158,47 mg de tripsina inibida por g de proteína para a soja sem lipoxigenase e com KTI. Cardoso *et al.* (2007) encontraram valores de 92,87 mg de tripsina inibida por g de proteína para a soja sem lipoxigenase e KTI a 122,92 mg de tripsina inibida por g de proteína para a soja sem lipoxigenase e com KTI.

Tabela 7: Inibição da tripsina por extratos protéicos obtidos de farinhas de soja.

Amostras	mg de tripsina inibida por g de proteína
Soja IAC PL-1	123,67c
Soja IAC 17	142,14b
Soja IAC 24	135,49b
Soja UFV TN 105	157,72a
Soja UFV TN 105 KL	100,71d

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

Verifica-se na Tabela 7 que extratos protéicos obtidos das farinhas de soja UFV TN 105 KL (sem inibidor de tripsina KTI) apresentaram os menores valores de inibição de tripsina quando comparados aos valores encontrados nas outras farinhas. Ainda assim, o nível destes inibidores na soja UFV TN 105 KL foi elevado. Isto pode ser explicado pelo fato da soja isenta de KTI conter o inibidor BBI expressando alta atividade inibitória.

As variedades de soja que apresentam resistência ao ataque da lagarta *Anticarsia gemmatalis* (IAC 17 e IAC 24) apresentaram valor de inibição trípica menor ( $p < 0,05$ ) que a soja convencional (IAC PL 1). Entretanto, este aumento da inibição de tripsina não foi associado à diminuição significativa ( $P > 0,05$ ) na digestibilidade destas variedades de soja (Tabela 4).

### 3.5. CONCLUSÃO

Proteínas de origem animal possuem maior digestibilidade, por não apresentarem fatores antinutricionais. Além disto, possuem um melhor conteúdo de aminoácidos indispensáveis, representado no presente estudo pelos maiores valores de PER e NPR.

As variedades de soja estudadas apresentaram valores de digestibilidade semelhantes, mostrando que a característica de resistência a lagarta *Anticarsia gemmatalis* e a retirada das enzimas lipoxigenases e do inibidor de tripsina não alteraram a digestibilidade, PER ou NPR. O teste de urease mostrou que o tratamento térmico (aquecimento em estufa, a seco, sem circulação) não foi eficiente para inativar os fatores antinutricionais presentes nas sementes de soja.

O teor de caseína na dieta (9,5 % ou 7%) não alterou valores de digestibilidade, PER e NPR. Os animais ganham menos peso, porém a ingestão de proteína foi menor, não alterando os valores de PER e NPR. Portanto, pode-se comparar dietas contendo cerca de 7 % de proteínas com a dieta de caseína padrão contendo 9,5 % de proteínas. Assim, em experimentos contendo fontes proteicas com menor teor de proteínas, não é necessária a utilização de mais um grupo controle, diminuindo o número de animais experimentais.

### **3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14. ed. Arlington: 1984. 1141p.

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

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

BOISEN, S.; DULDULAO, J. B. A.; MENDOZA, E. M. T.; JULIANO, B. O. Comparative protein digestibility in growing rats of cooked rice and protein properties of indica and japonica milled rices. **Journal of Cereal Science**, v. 33, p. 183-191, 2001.

BRESSANI, R., ELIAS, L. G. All vegetable protein mixtures for human feeding. **Journal of Food Science**, 31:626-630, 1983.

CARDOSO, L. R.; OLIVEIRA, M. G. A.; MENDES, F. Q.; PIRES, C. V.; RIBEIRO, F. R.; SANT'ANA, R. C. O.; MOREIRA, M. A.. Atividade de inibidores de proteases em linhagens de soja geneticamente melhoradas. **Alimentos e Nutrição** (UNESP), v. 18, p. 19-26, 2007.

ERLANGER, B. F., KOKOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archivos Biochemistry Physiology**, v. 95, p. 271-278, 1961.

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

GUEN, M. P.; BIRK, Y. Protease 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.

KAKADE, M. L., RACKIS, J. J, MCGHEE, J. E., PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v.51, p. 376-382, 1974.

LIU, K. Cellular 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.

MILLWARD, D. J.; LAYMAN, D. K.; TOMÉ, D.; SCHAAFSSMA, G. Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87 (suppl), p. 1576S–1581S, 2008.

MONTEIRO, M. R. P.; MOREIRA, M. A.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V. Avaliação da digestibilidade proteica 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.

PELUZIO, M. C. G. & BATISTA, E. C. Proteínas. In: COSTA, N. M. B. & PELUZIO, M. C. G. **Nutrição Básica e Metabolismo**, Viçosa: Editora UFV 2008, p. 120-154.

PEREIRA, C. A. S.; COSTA, N. M. B., Proteínas do feijão preto sem casca: digestibilidade em animais convencionais e isentos de germes (germ-free). **Revista Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 5-14, 2002.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 26(1): 179-187, jan.-mar. 2006.

RANHOTRA, G.S.; GELROTH, J.A.; GLASER, B.K.; LORENZ, K.J.; JOHNSON, D.L. Composition and protein nutritional quality of quinoa. **Cereal Chemistry**, n. 70, v. 3, p. 303-305, 1993.

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.

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

USYDUS, Z.; SZLINDER-RICHERT, J.; ADAMCZYK, M. Protein quality and amino acids profiles of fish products available in Poland. **Food Chemistry**, v.112, p.139-145, 2009.

VARGAS, E.; BRASSANI, R.; NAVARRETE, D. Digestibilidad de la proteína y energía de dietas elaboradas a base de arroz y frijoles en humanos adultos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición.**, 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.

## CAPÍTULO 4

### **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTEICA DE GRÃOS DE FEIJÃO, MILHO E TRIGO ATACADOS POR INSETOS-PRAGA**

#### **4.1. RESUMO**

O ataque por insetos causam diversos prejuízos aos grãos, dentre eles a perda de peso do grão, o aquecimento e conseqüente deterioração, devido ao metabolismo do inseto, a perda do valor de mercado e a perda do valor nutritivo do alimento, em decorrência do consumo pelo inseto. O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de infestação, as alterações de umidade e massa específica aparente ao longo do período de armazenamento de grãos de duas variedades de feijão (jalo e radiante), milho e trigo na presença ou não do inseto-praga e avaliar as características bromatológicas, a digestibilidade, PER e NPR das farinhas destes grãos infestados e não infestados. Observou-se aumento do grau de infestação com o período de armazenamento para os grãos de feijão, miho e trigo. A presença do inseto-praga causou aumento de umidade, devido ao rompimento do tegumento e aumento do metabolismo e diminuição da massa específica aparente, pelo consumo dos grãos pelos insetos, nos grãos de feijão, milho e trigo. As farinhas dos grãos infestados apresentaram maior teor de nitrogênio e cinzas e redução no teor de carboidratos e lipídios. Observou-se que a presença do inseto-praga não alterou a digestibilidade dos grãos analisados, porém houve redução do PER e do NPR para os grãos de feijão, fato que não foi observado para os grãos de milho e trigo. A qualidade nutricional de grãos é diminuída com o ataque de insetos, porém a família do inseto e a composição do grão influenciam esta alteração da qualidade.

**PALAVRAS CHAVE:** inseto-praga, digestibilidade proteica, caracterização bromatológica

## 4.2. INTRODUÇÃO

Grãos de feijão, milho e trigo são importantes fontes de carboidratos, proteínas, minerais e vitaminas. Durante a estocagem, estes grãos podem ser atacados por diversos insetos-praga. Calcula-se que no Brasil 10 a 15 % da produção de grãos seja perdida anualmente por ataque de insetos. Dentre os prejuízos causados, destaca-se a perda de peso do grão, o aquecimento e conseqüente deterioração, devido ao metabolismo do inseto, a perda do valor de mercado e a perda do valor nutritivo do alimento, em decorrência do consumo pelo inseto (ATHIÉ *et al.* 1998).

Análises químicas de grãos atacados por insetos revelam perdas de nutrientes como carboidratos, vitaminas e minerais. Segundo Jood *et al.* (1992), o teor de proteína total, nitrogênio não protéico e ácido úrico encontram-se aumentados em grãos infestados por insetos. Entretanto, Lale & Igwebuike (2002) relataram diminuição do teor de proteínas com aumento da infestação (). Análises químicas determinam o teor de nitrogênio total, não quantificando substâncias nitrogenadas tóxicas, excretas de insetos, fragmentos de corpos de insetos ou inibidores de proteases. Uma análise do valor biológico se torna importante.

A composição aminoacídica da alimentação, a quantidade total de nitrogênio e a digestibilidade da mistura proteica são fatores que devem ser considerados ao se fazer a recomendação de uma mistura de proteínas (SARWAR, 1997). Uma boa fonte proteica é aquela que fornece quantidades adequadas de aminoácidos indispensáveis e nitrogênio total, além de boa digestibilidade.

Digestibilidade da proteína é um condicionante de qualidade proteica, pois dado aminoácido embora presente na proteína, pode não estar necessariamente disponível para o organismo. As proteínas presentes nos alimentos podem se associar com compostos presentes nos alimentos, como polifenóis, e, desta forma, não estarem disponíveis para a ação de proteases. As proteínas não podem ser utilizadas pelo organismo sem serem antes digeridas e absorvidas por este (SGARBIERI, 1996).

Digestibilidade da proteína é o principal índice de qualidade proteica, 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 podem interferir na digestibilidade, dentre estes 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).

Existem diversos métodos, além da digestibilidade, para avaliara a qualidade proteica. O PER - Coeficiente de eficiência proteica - 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. Esse valor encontrado é comparado ao de uma proteína de referência, normalmente a caseína. PER maior que 2,0 indica proteína de alta qualidade; entre 1,5-2,0, qualidade intermediária; e PER menor que 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 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.

O NPR - Razão proteica líquida - constitui uma modificação do PER e acrescenta ao ganho de peso do grupo com dieta proteica a perda de peso de um grupo com dieta aprotéica. O NPR é determinado no 14<sup>o</sup> 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). Este trabalho objetivou avaliar o grau de infestação, as alterações de umidade e massa específica aparente ao longo do período de armazenamento de grãos de duas variedades de feijão (jalo e radiante), milho e trigo, tempo de cocção e capacidade de absorção de água para as duas

variedades de feijão, na presença ou não do inseto-praga e avaliar a digestibilidade, PER e NPR das farinhas destes grãos infestados e não infestados.

### **4.3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.3.1. Local do experimento**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), no Laboratório de de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos Prof. Marcos Luiz dos Mares Guia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) e no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) – MG.

#### **4.3.2. Infestação dos grãos e avaliação tecnológica**

Os grãos de feijão foram acondicionados em frascos de vidro com capacidade para 1 kg. Para infestação dos grãos de feijão, foram colocados aproximadamente 500 gramas do grão e 50 insetos adultos de *Acanthoscelides obtectus* em cada frasco, que foi fechado com uma tampa telada para garantir a entrada de oxigênio e a sobrevivência dos insetos. Os frascos foram mantidos à temperatura e umidade ambientes.

Para avaliação tecnológica do feijão na presença do inseto-praga, após a infestação dos grãos foram realizadas análises de teor de água, tempo de cocção, sólidos solúveis no caldo de cocção, massa específica aparente, absorção de água e grau de infestação nos grãos armazenados atacados e não atacados por inseto-praga aos 0, 14, 28, 42, 56, 70, 77 e 84 dias de armazenamento.

O teor de água foi determinado por secagem em estufa a 105°C até peso constante (AOAC, 1984).

Para a determinação do tempo de cocção, foram utilizadas amostras previamente maceradas durante 12 horas. O teste foi realizado com aparelho de Mattson (Figura 1), de acordo com a metodologia descrita por Tomé *et al.* (2000). O aparelho cozedor possui 25 hastes com 21,6 cm de comprimento e massa de 82,0 gramas cada. Esta massa representa a força média que o consumidor utiliza entre os dedos para verificar a maciez e, conseqüentemente, o cozimento do grão de feijão. Na extremidade, a haste apresenta uma ponta afunilada com 0,2 cm de diâmetro e comprimento de 0,9 cm, que foi apoiada, perpendicularmente, sobre cada grão. O aparelho foi colocado no interior de um recipiente metálico com um litro de água em estado de ebulição, mantido em volume constante. Os grãos foram considerados cozidos quando a haste os atravessou, sendo o tempo de cocção da amostra registrado, quando a 13<sup>a</sup> haste penetrou o grão.

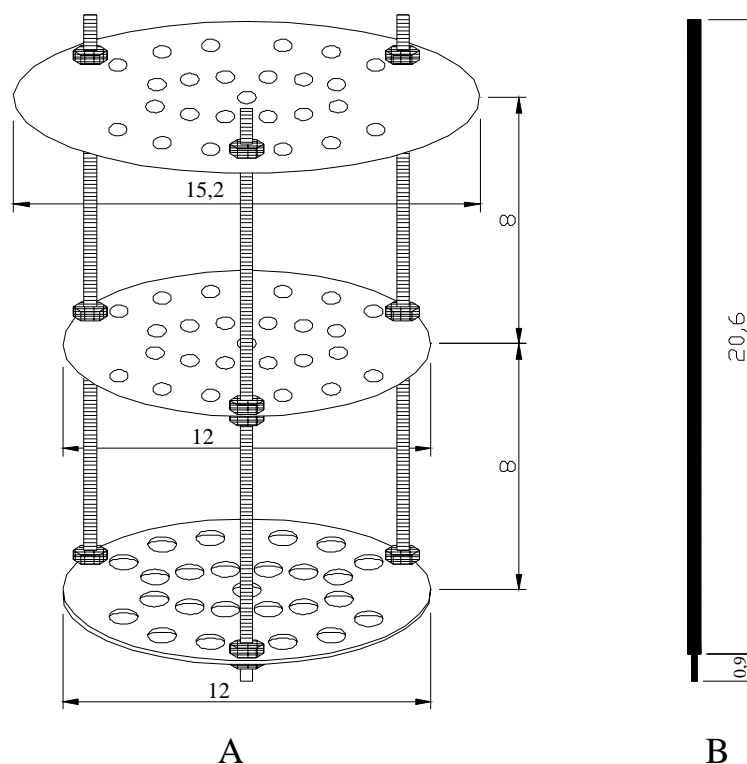


Figura 1 - (A) Aparelho para determinação do tempo de cocção do feijão; (B) detalhe da haste. Fonte: Resende (2006)

Os sólidos solúveis do caldo foram determinados após a cocção do grão: uma alíquota de 20 mL foi colocada em uma placa de Petri previamente pesada,

levada imediatamente à estufa com temperatura de 105 °C por 24 h, seguida de nova pesagem.

A massa específica aparente foi determinada, utilizando-se uma balança de peso hectolitro.

Para capacidade de absorção de água, 50 grãos foram pesados e embebidos em água, por 16 horas. Após este período, as amostras foram pesadas novamente, como descrito por Chiaradia e Gomes (1997).

Para avaliar o percentual de grãos atacados por insetos, amostras de 100 grãos de feijão foram imersas em água durante 24 horas, tempo suficiente para amolecer os grãos. Em seguida, os grãos foram cortados e examinados individualmente. Foram considerados infestados grãos que continham larva, pupa ou inseto adulto e aqueles que apresentaram orifícios de saída do inseto, conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

Os grãos de milho e trigo foram acondicionados em frascos de vidro com capacidade para 3 kg. Para infestação do milho e trigo foram colocados aproximadamente 2 kg dos grãos e 200 insetos adultos de *Sitophilus zeamais*. Os frascos foram mantidos à temperatura e umidade ambientes.

Para avaliação do milho e trigo na presença do inseto-praga, após a infestação dos grãos foram realizadas análises de teor de água, massa específica aparente e grau de infestação nos grãos armazenados atacados e não atacados por inseto-praga aos 0, 14, 28, 42, 49, 56, 63 e 72 dias de armazenamento.

Para obtenção da farinha de milho, após o período de armazenamento, as amostras de milho na presença e ausência de insetos-praga foram moídas em moinho de martelo e passadas em peneira de 16 mesh (1 mm).

Para obtenção da farinha de trigo, a umidade dos grãos foi determinada em estufa a 105°C até peso constante. As amostras foram condicionadas para as umidades de 15,5 % e, após 20 a 24 horas, foi realizada a moagem em moinho de trigo Quadrumat Senior Brabender nas passagens de quebra e redução.

### **4.3.3. Caracterização bromatológica das farinhas**

#### **Determinação do teor de umidade**

O teor de umidade foi determinado por secagem em estufa a 105°C até peso constante, segundo AOAC (1984). Um método gravimétrico que se baseia na perda de peso da amostra após a remoção da água por evaporação

As amostras foram pesadas em Placa de Petri e levar à estufa regulada a 100-105 °C por 5 horas. Foram retiradas, esfriadas em dessecador e pesadas novamente. Foram levadas à estufa por mais uma hora, retiradas, esfriadas em dessecador e pesadas. As operações de aquecimento e pesagem foram repetidas até que a diferença entre pesagens não fosse superior a 0,01 g

#### **Determinação do teor de nitrogênio**

O teor de proteína de cada amostra foi realizado pelo método semimicro Kjeldhal, segundo AOAC (1984). No cálculo de conversão do nitrogênio em proteínas foi utilizado o fator 6,25.

#### **Determinação do extrato etéreo**

O teor de lipídios foi determinado utilizando o método intermitente de Soxhlet, (AOAC, 1984), usando éter de petróleo como extrator.

As amostras foram pesadas no cartucho extrator confeccionado com papel de filtro. O cartucho com a amostra foi transferido para o aparelho Soxhlet, que foi conectado a um balão previamente seco em estufa a 105 °C, esfriado em dessecador e pesado. Foi adicionado éter de petróleo em quantidade suficiente para encher duas vezes o extrator. O aquecimento foi ligado e procedeu-se à extração contínua por 6 horas. Recuperou-se o quanto possível do éter de petróleo no próprio aparelho. O balão foi levado para estufa a 105°C por 1 hora. Foi esfriado em dessecador e pesado. O aquecimento e resfriamento do balão foram repetidos até peso constante.

Após a remoção do solvente, determinou-se gravimetricamente a quantidade de lipídios presente.

#### **Determinação do teor de cinzas (resíduo mineral fixo)**

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550 °C, segundo método da AOAC (1984).

As amostras desengorduradas foram colocadas em cadinhos de porcelana previamente pesados e levados a mufla. A temperatura foi aumentada gradativamente até atingir 550 °C. Depois de atingida a temperatura, as amostras foram mantidas a 550 °C por cinco horas. As amostras foram esfriadas, primeiramente na própria mufla e depois em dessecador, e pesadas.

#### **Determinação do teor de carboidratos**

A determinação de carboidratos (base seca) foi realizada por diferença, sendo subtraído de 100 a soma dos teores de lipídios, proteínas e cinzas.

#### **4.3.4. Avaliação da qualidade nutricional de grãos atacados por insetos-praga**

Foram avaliados a digestibilidade, PER, NPR, escore químico e escore químico corrigido pela digestibilidade.

#### **Preparo das Amostras**

Foi utilizada caseína comercial obtida da RHOSTER-Indústria e Comércio Ltda.

Os grãos de feijão Jalo e Radiante foram coccionados em água, na proporção de 1:2 (p/v), em panela de pressão doméstica, durante 40 minutos, após o período de armazenamento, na presença e ausência de insetos-praga,. Após o cozimento, foram secos em estufa com circulação de ar, a 60 °C, por 24 horas. Em seguida, foram moídos em multiprocessador e passado em peneira de 16 mesh (1 mm). Foram novamente passados em multiprocessador e peneira, até que todo feijão passasse pela peneira.

Foram utilizadas as farinhas de milho e de trigo, obtidas como descrito anteriormente.

## Ensaio Biológico

Foram preparadas uma dieta aprroteica, uma dieta de caseína (padrão) e as dietas testes, contendo as amostras proteicas estudadas, conforme apresentado na Tabela 1.

A composição das dietas foi baseada na AIN-93G, segundo Reeves *et al.*(1993), com o teor de proteínas alterado para 9,5 % para a dieta de caseína (padrão) e para as dietas de feijão e teor de proteínas alterado para 7 % para as dietas de milho e trigo.

As quantidades de outros ingredientes da dieta (amido, amido dextrinizado, sacarose, óleo e celulose) também foram alterados, de acordo com a composição dos alimentos testados, de forma que as dietas fossem isocalóricas e isoproteicas (Tabela 1).

Após o preparo, determinou-se o teor de proteína de cada dieta. As dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente rotulados e armazenados em refrigerador. Foram utilizados 60 ratos machos, raça Wistar, recém desmamados, com média de 23 dias de idade, peso variando de 50 a 60 gramas, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os animais foram divididos em dez grupos com seis animais cada, de modo que a média dos pesos entre os grupos não excedesse a 10 g. Os ratos foram alocados em gaiolas individuais, onde receberam água e suas dietas ad libitum, por 14 dias. Os animais foram mantidos em condições de temperatura de  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  e foi feito o monitoramento do consumo alimentar e peso corporal semanalmente.

O experimento foi conduzido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal – COBEA – e as normas internacionais.

Tabela 1: Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico (g/100g de mistura)

<b>Ingredientes</b>	<b>CAS</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D4</b>	<b>D5</b>	<b>D6</b>	<b>D7</b>	<b>D8</b>	<b>LN</b>
Caseína <sup>1</sup>	11,47	-	-	-	-			-	-	-
Feijão Jalo	-	42,58	-	-	-			-	-	-
Feijão Jalo com inseto	-	-	34,35	-	-			-	-	-
Feijão Radiante	-	-	-	47,67	-			-	-	-
Feijão Radiante com inseto	-	-	-	-	41,71			-	-	-
Milho						80,73				
Milho com inseto							62,51			
Trigo	-	-	-	-	-			65,16	-	-
Trigo com inseto	-	-	-	-	-			-	59,71	-
Amido dextrinizado <sup>1,*</sup>	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	1,2	11,64	10,0	13,2	13,2
Sacarose <sup>2</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	1,03	8,8	7,79	10,0	10,0
Óleo de soja <sup>2</sup>	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Fibra alimentar (Celulose) <sup>1</sup>	5,0	-	-	-	-	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura Salínica (AIN-93G-MX) <sup>1,*</sup>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica (AIN-93G-VX) <sup>1,*</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
L-cistina <sup>1,*</sup>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina <sup>1,*</sup>	0,25	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) <sup>2</sup>	48,28	22,17	29,4	17,08	22,84	-	-	-	0,04	59,75

<sup>1</sup> Obtido da RHOSTER – Indústria e Comércio Ltda.

\* Segundo Reeves *et al.* (1993)

<sup>2</sup> Obtido no comércio de Viçosa, MG

CAS: Dieta com caseína; D1: Dieta com feijão jalo; D2: Dieta com feijão jalo com inseto; D3: Dieta com feijão radiante; D4: Dieta com feijão radiante com inseto; D5: Dieta com milho; D6: Dieta com milho com inseto; D7: Dieta com trigo; D8: Dieta com trigo com inseto; LN: Dieta aprroteica.

### **Digestibilidade Verdadeira**

Para a determinação da digestibilidade, as dietas foram marcadas com indigocarmin na proporção de 100 mg/100g e oferecidas aos animais no 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias. As fezes foram coletadas do 8<sup>o</sup> ao 11<sup>o</sup> dias em recipientes individuais para cada animal e mantidas sob refrigeração. No 8<sup>o</sup> dia foram coletadas apenas as fezes marcadas; no 9<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias foram coletadas todas as fezes; e no 11<sup>o</sup> dia foram coletadas apenas as fezes não marcadas pelo corante.

Ao término do experimento, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar a 105°C por 24 h. Em seguida foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador doméstico, marca Arno, para determinação da concentração de nitrogênio, pelo método semimicro-Kjeldahl, com amostras em triplicata.

A digestibilidade verdadeira foi calculada medindo a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, a 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:

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

I = Nitrogênio ingerido pelo grupo teste.

F = Nitrogênio fecal do grupo teste.

FK = Nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

### **Coefficiente de eficiência proteica (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:

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

### **Razão proteica líquida (NPR)**

O NPR foi determinado, de acordo com Bender e Doell (1957), no 14<sup>o</sup> dia do experimento, levando-se em consideração o ganho de peso do grupo-teste, mais a perda de peso do grupo com dieta aprótica, em relação ao consumo de proteína do grupo-teste. Foi calculado de acordo com a seguinte equação:

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

### **4.3.5. 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.

## **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 °C ± 0,1 °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.

## **Derivação**

Cada amostra foi alcalinizada com 20 µL de uma mistura metanol:água: TEA (trietilamina) 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 °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.

## **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  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

#### **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%).

#### **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.

#### **4.3.6. Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade proteica (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).

#### **4.3.7 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 das variáveis qualitativas, por intermédio do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG). e regressão para as variáveis quantitativas, , utilizando o programa Sigma Plot.

### **4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.4.1. Infestação dos grãos**

Na determinação do grau de infestação (GI) dos grãos analisados, observou-se que os grãos que não receberam insetos no tempo zero continuaram durante todo o armazenamento (t) sem apresentarem infestação. A infestação dos grãos na presença de insetos-praga aumentou com o período de infestação (Figuras 2, 3 e 4).

Ao final de 84 dias de armazenamento, o feijão jalo apresentou 91,33 % de infestação e o feijão radiante 80 %. Tanto para o feijão jalo quanto para o feijão radiante observou-se que a infestação dos grãos de feijão por *A. obtectus* aumentou ao longo período de armazenamento, de forma quadrática, indicando elevada taxa de crescimento dos insetos (Figura 2).

Os grãos de milho na presença do inseto-praga, ao final de 72 dias de armazenamento, apresentaram grau de infestação de 90,67 %. Observou-se tendência linear no aumento do grau de infestação dos grãos de milho na presença de *S. zeamais* (Figura 3).

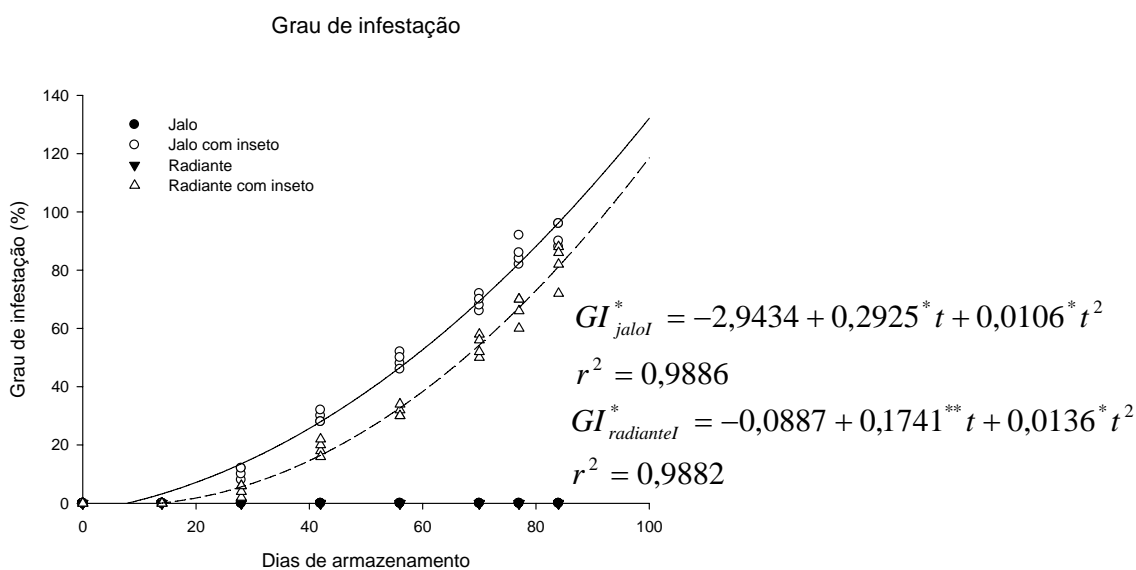


Figura 2 – Grau de infestação dos grãos de feijões infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.

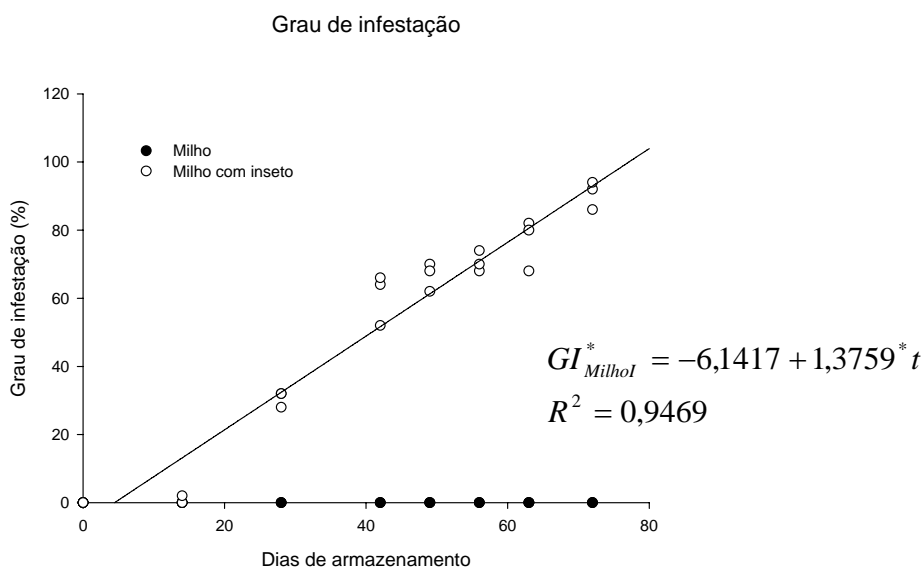


Figura 3 – Grau de infestação dos grãos de milho infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.

GI – Grau de infestação

I – na presença do inseto-praga

\* Significativo a 1 %

\*\* Significativo a 5 %

Para os grãos de trigo observou-se um grau de infestação de 65,33 % ao final de 72 dias de armazenamento para os grãos infestados por insetos-praga. Observou-se que a infestação dos grãos de trigo por *S. zeamais* aumentou numa tendência quadrática ao longo do período de armazenamento (Figura 4).

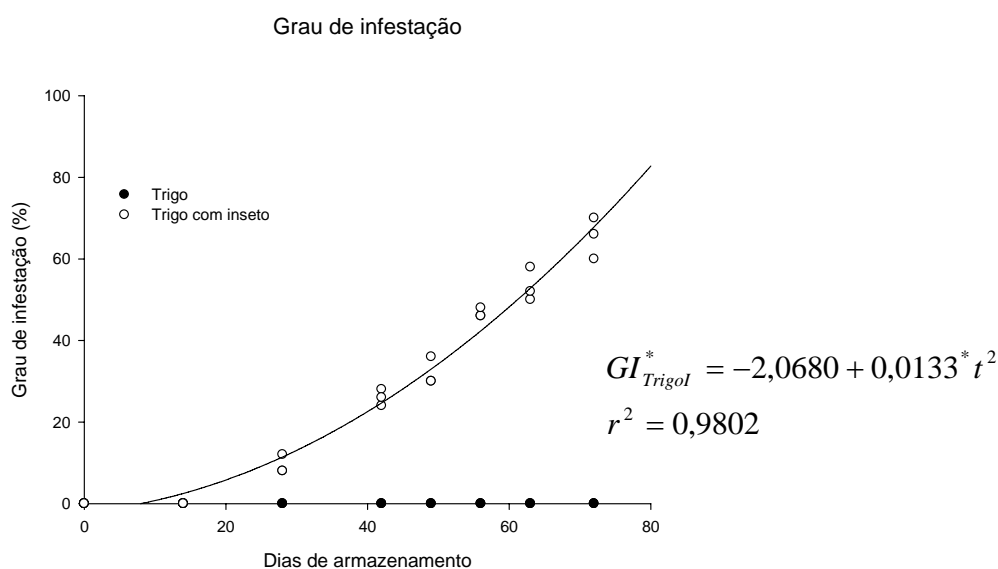


Figura 4 – Grau de infestação dos grãos de trigo infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.

O teor de água (U) nos grãos infestados aumentou com o aumento do período de estocagem (t) e conseqüentemente com o grau de infestação (Figuras 5, 6 e 7).

A partir de 42 dias de armazenamento, o teor de umidade do feijão jalo com o inseto apresentou diferença do feijão sem o inseto ( $p < 0,05$ ) e ao final de 84 dias, o feijão jalo não infestado apresentou 11,98 % de umidade e o feijão jalo infestado apresentou 19,11 %. Para o feijão radiante, o teor de umidade do feijão com inseto diferiu da testemunha a partir de 28 dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ). Ao final de 84 dias, o feijão radiante não infestado apresentou 12,06 % de umidade e o radiante infestado 15,79 % (Tabela 2). O feijão jalo na presença do inseto apresentou maior aumento de umidade quando comparado ao feijão radiante na presença do *A. obtectus*. A umidade no feijão jalo infestado aumentou quadraticamente ao longo do período de armazenamento, enquanto que a

Tabela 2: Valores médios do teor de água do feijão (%), com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento.

Tratamento	Dias de armazenamento							
	0	14	28	42	56	70	77	84
<b>Feijão Jalo</b>								
Sem inseto	11,51a	11,48a	11,57a	11,74b	11,56b	11,80b	11,94b	11,98b
Com inseto	11,54a	11,51a	12,07a	13,53a	15,53a	17,88a	19,08a	19,11a
<b>Feijão Radiante</b>								
Sem inseto	11,72a	11,68a	11,66b	11,80b	11,87b	11,99b	11,97b	12,06b
Com inseto	11,82a	12,09a	12,73a	13,71a	14,41a	14,09a	15,29a	15,79a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para cada uma das variedades de feijão.

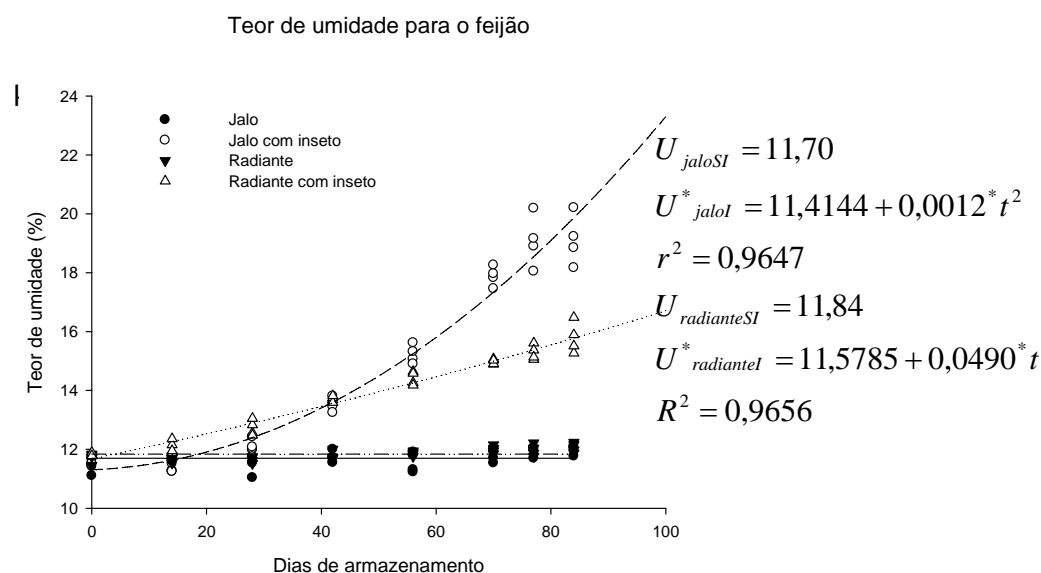


Figura 5 – Teor de umidade dos grãos de feijões infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.

U – Teor de umidade  
 SI – na ausência do inseto-praga  
 I – na presença do inseto-praga  
 \* Significativo a 1 %

umidade no feijão radiante aumentou linearmente. A umidade dos feijões jalo e radiante não infestados não se alterou ao longo do armazenamento (Figura 5).

O teor de umidade do milho na presença do inseto-praga diferiu do milho sem inseto a partir de 42 dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ). Ao final de 72 dias, os grãos de milho não infestados apresentaram teor de umidade de 9,26 %, sendo que este teor diminuiu linearmente durante o período de armazenamento. Na presença do inseto, a umidade do milho ao final dos 72 dias de armazenamento foi de 14,57 % e o aumento da umidade seguiu tendência quadrática ao longo do período de armazenamento (Tabela 3, Figura 6).

O teor de umidade do trigo com o inseto diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) da testemunha a partir de 49 dias de armazenamento. Ao final de 72, a umidade dos grãos de trigo foi de 9,88 % para os grãos sem inseto e 14,54 % na presença do inseto (Tabela 4). Ao longo do período de armazenamento houve diminuição linear da umidade dos grãos de trigo sem o inseto-praga, enquanto que para os grãos infestados a umidade aumentou de forma quadrática (Figura 7).

O aumento da umidade no decorrer do período de armazenamento está relacionado, principalmente, com a alteração no equilíbrio higroscópico devido ao rompimento da impermeabilidade do pericarpo (MATIOLI & ALMEIDA, 1979a) e à elevação da taxa respiratória dos insetos. Os orifícios perfurados pelos insetos expõem o endosperma, que é higroscópico, ao contato com a umidade do ar (MATIOLI & ALMEIDA, 1979a). O metabolismo dos insetos (respiração) libera para o ambiente  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . A água liberada pela respiração, juntamente com a água excretada pelos insetos, contribui para o aumento da umidade dos grãos.

Ao longo do período de armazenamento (t) observou-se que a massa específica aparente (ME) dos grãos infestados diminuiu gradativamente (Figuras 8, 9 e 10). As fêmeas de insetos adultos colocam os ovos soltos na massa de grãos. Depois da eclosão, as larvas perfuram o tegumento e penetram em seu interior, alimentando-se e promovendo, assim, redução da sua massa e, conseqüentemente, diminuição da massa específica.

Tabela 3: Valores médios do teor de água do milho (%), com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento.

Tratamento	Dias de armazenamento							
	0	14	28	42	49	56	63	72
Sem inseto	11,52a	11,75a	10,73a	9,91b	10,71b	9,68b	8,94b	9,26b
Com inseto	11,75a	11,67a	11,08a	13,03a	12,28a	12,44a	13,96a	14,57a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

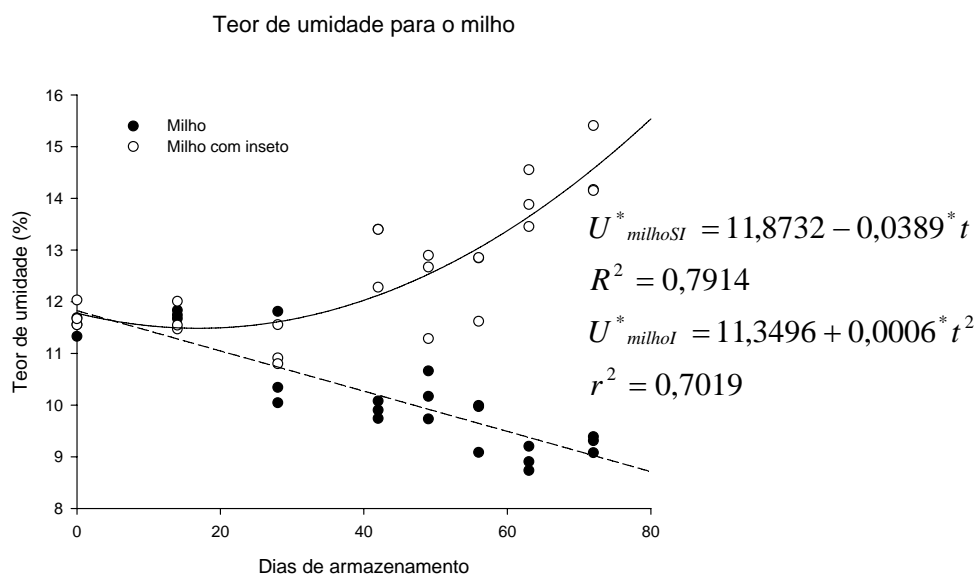


Figura 6 – Teor de umidade dos grãos de milho infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.

U – Teor de umidade  
 SI – na ausência do inseto-praga  
 I – na presença do inseto-praga  
 \*Significativo a 1 %

Tabela 4: Valores médios do teor de água do trigo (%), com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento

Tratamento	Dias de armazenamento							
	0	14	28	42	49	56	63	72
Sem inseto	11,06a	11,02a	10,42a	10,05a	9,15b	9,45b	10,16b	9,88b
Com inseto	11,04a	10,99a	10,43a	11,34a	10,45a	11,56a	11,91a	14,54a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

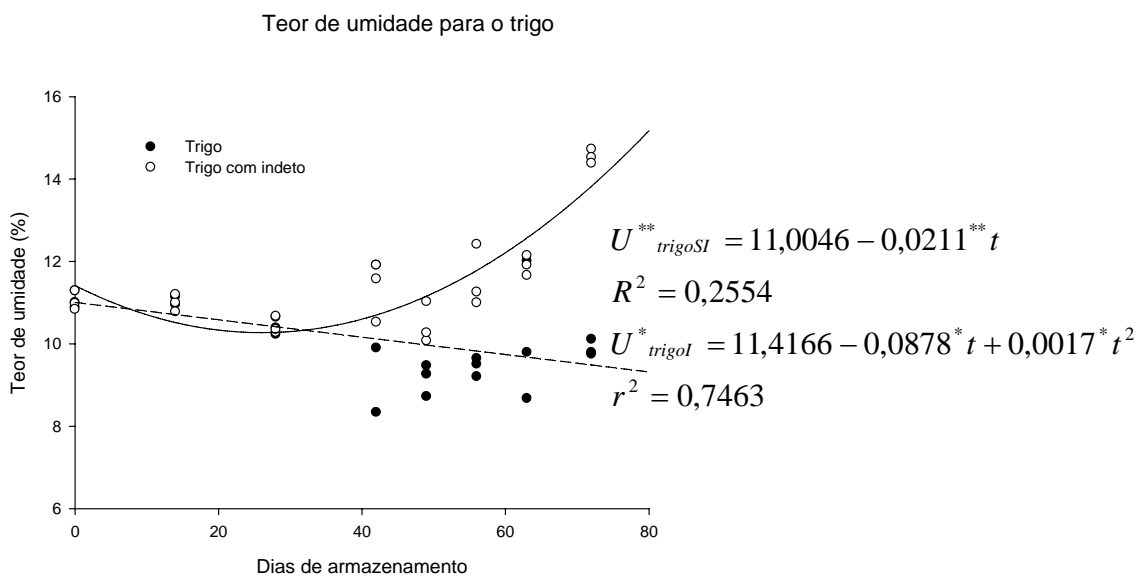


Figura 7 – Teor de umidade dos grãos de trigo infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.

U – Teor de umidade  
 SI – na ausência do inseto-praga  
 I – na presença do inseto-praga  
 \*Significativo a 1 %  
 \*\*Significativo a 5 %

Para o feijão, na ausência do inseto-praga, a massa específica aparente permaneceu, praticamente, constante ao longo do período de armazenamento, sendo que aos 84 dias o feijão jalo apresentava massa específica aparente de 741,5 kg.m<sup>-3</sup> e o feijão radiante 701,05 kg.m<sup>-3</sup>. Na presença do *A. obtectus*, os valores da massa específica aparente tanto do feijão jalo quanto do feijão radiante diminuíram ao longo do período de armazenamento, de forma quadrática. Ao final de 84 dias de armazenamento, o feijão jalo apresentou massa específica aparente de 617,05 kg.m<sup>-3</sup> e o feijão radiante 651,67 kg.m<sup>-3</sup>. Observou-se que a diminuição da massa específica aparente para o feijão jalo foi mais pronunciada do que a diminuição da massa específica para o feijão radiante (Figura 8).

Observa-se, na Tabela 5, que a massa específica aparente do feijão foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) no produto com a presença do inseto-praga a partir de 42 dias de armazenamento para o feijão jalo e 56 dias de armazenamento para o feijão radiante.

Tabela 5: Valores médios de massa específica aparente (kg.m<sup>-3</sup>) para feijão, com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento

Tratamento	Dias de armazenamento							
	0	14	28	42	56	70	77	84
Feijão Jalo								
Sem inseto	741,6a	740,9a	740,8a	741,1a	741,3a	741,2a	741,8a	741,5a
Com inseto	741,1a	739,8a	737,2a	728,3b	708,2b	684,5b	645,7b	617,6b
Feijão Radiante								
Sem inseto	700,9a	701,3a	700,6a	700,8a	701,2a	699,1a	701,9a	701,1a
Com inseto	699,9a	701,0a	699,1a	695,1a	685,7b	678,2b	670,5b	645,6b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para cada uma das variedades de feijão.

O mesmo comportamento observado para o feijão foi observado para o milho. A massa específica aparente para os grãos de milho não infestados permaneceu, praticamente, constante ao longo do armazenamento, apresentando massa específica aparente de 786,62 kg.m<sup>-3</sup> ao final de 72 dias de armazenamento. Na presença do inseto praga, a massa específica aparente diminuiu seguindo uma tendência quadrática, sendo esta de 682,87 kg.m<sup>-3</sup> ao final de 72 dias de armazenamento. A massa específica aparente do milho na presença de *S. zeamais* diferiu significativamente da testemunha a partir de 42 dias de armazenamento (Tabela 6, Figura 9).

Tabela 6: Valores médios massa específica aparente (kg.m<sup>-3</sup>) para grãos de milho, com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento

Tratamento	Dias de armazenamento							
	0	14	28	42	49	56	63	72
Sem inseto	787,5a	787,5a	781,3a	784,2a	785,8a	786,6a	789,1a	786,6a
Com inseto	786,7a	781,2a	768,7a	739,9b	730,5b	718,4b	711,8b	682,7b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

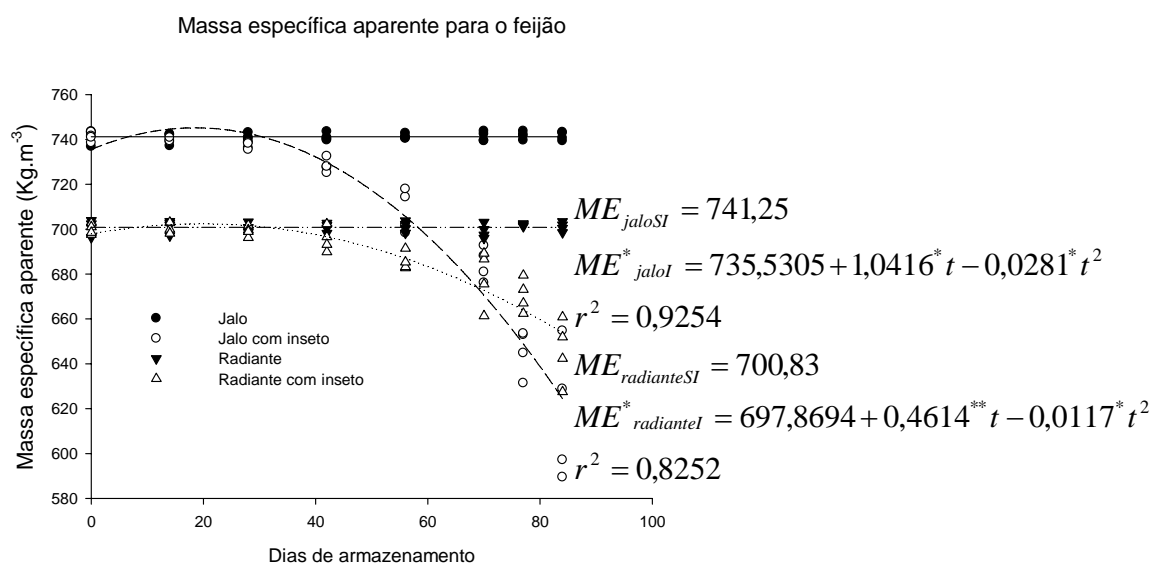


Figura 8 – Massa específica aparente dos grãos de feijões infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.

ME – Massa específica aparente

SI – na ausência do inseto-praga

I – na presença do inseto-praga

\* Significativo a 1 %

\*\* Significativo a 10 %

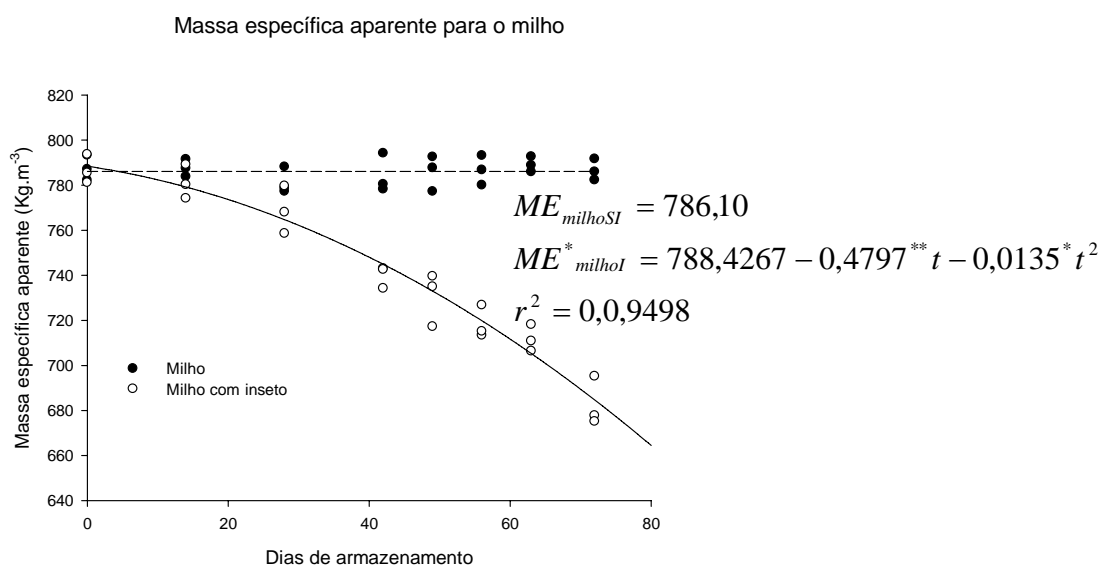


Figura 9 – Massa específica aparente dos grãos de milho infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.

A massa específica aparente permaneceu constante ao longo do período de armazenamento para os grãos de trigo sem insetos, apresentando massa específica aparente de 813, 43 kg.m<sup>-3</sup> ao final de 72 dias de armazenamento. Na presença do *S. zeamais*, a massa específica diminuiu de forma quadrática, sendo ao final de 72 dias de 718, 40 kg.m<sup>-3</sup>. A partir de 42 dias de armazenamento, a massa específica aparente dos grãos infestados diferiu da massa específica aparente dos grãos não infestados (p<0,05) (Tabela7, Figura 10).

Tabela 7: Valores médios massa específica aparente (kg.m<sup>-3</sup>) para grãos de trigo, com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento

Tratamento	Dias de armazenamento							
	0	14	28	42	49	56	63	72
Sem inseto	817,5a	815,7a	818,7a	816,4a	813,8a	813,5a	816,1a	813,4a
Com inseto	820,5a	816,7a	815,2a	793,5b	788,3b	786,7b	759,4b	718,4b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

ME – Massa específica aparente  
 SI – na ausência do inseto-praga  
 I – na presença do inseto-praga  
 \* Significativo a 1 %  
 \*\* Significativo a 10 %

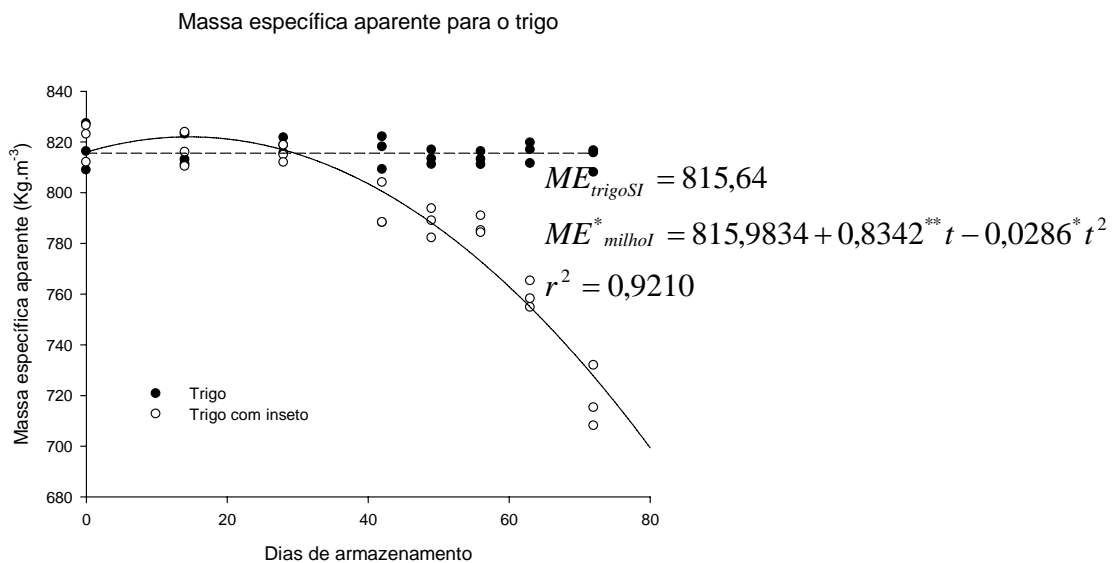


Figura 10 – Massa específica aparente dos grãos de trigo infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.

Para avaliação tecnológica do feijão na presença do inseto-praga, também foram realizadas análises de tempo de cocção e absorção de água nos grãos armazenados atacados e não atacados por inseto-praga durante o período de armazenamento.

Com relação ao tempo de cocção, constatou-se que tanto para o feijão jalo quanto para o feijão radiante, com ou sem inseto, os valores do tempo de cocção (TC) aumentaram ao longo do período de armazenamento (t), como observado por diversos pesquisadores (Resende *et al.*, 2007; Ramos Júnior *et al.*, 2005; Resende *et al.*, 2004; Shiga *et al.*, 2004). Para os grãos infestados por insetos, o tempo de cocção aumentou de uma forma menos acentuada do que para os grãos sem insetos. Os grãos infestados apresentam danificações no tegumento que diminuiu a resistência à força aplicada pelas hastes do Cozedor de Mattson, diminuindo, assim, o tempo de cozimento (Figura 11). Na Tabela 8, são apresentadas as médias para cada tratamento analisado ao longo do período de armazenamento. A partir dos 28 dias de armazenagem, o tempo de cocção do feijão infestado por insetos foi significativamente inferior à testemunha tanto para o feijão jalo quanto para o feijão radiante.

ME – Massa específica aparente  
 SI – na ausência do inseto-praga  
 I – na presença do inseto-praga  
 \*Significativo a 1 %  
 \*\*Significativo a 5 %

Foi observado que a partir de 56 dias armazenamento houve da absorção de água nos grãos de feijão jalo infestados ( $p < 0,05$ ). Esta diminuição foi observada a partir de 70 dias para o feijão radiante (Tabela 9). Ao final de 84 dias de infestação os feijão jalo apresentou uma diminuição em torno de 20 % na absorção de água e o feijão radiante cerca de 15 % (Figura 12).

Tabela 8: Valores médios de tempo de cocção (min) para feijão, com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento.

Tratamento	Dias de armazenamento							
	0	14	28	42	56	70	77	84
Feijão Jalo								
Sem inseto	28,45a	29,89a	32,27a	34,52a	36,63a	41,75a	44,63a	49,49a
Com inseto	27,93a	29,08a	29,81b	31,41b	33,82b	36,28b	39,55b	40,21b
Feijão Radiante								
Sem inseto	26,50a	28,03a	29,85a	31,71a	35,81a	39,10a	40,06a	41,95a
Com inseto	26,54a	27,03a	27,99b	28,67b	30,94b	32,74b	33,94b	34,98b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para cada uma das variedades de feijão.

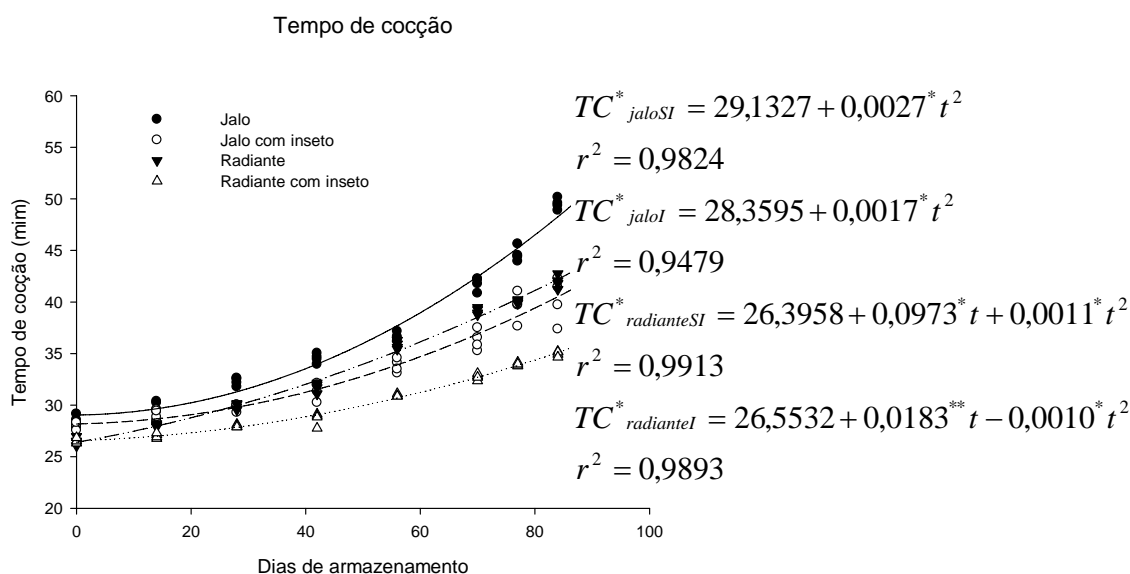


Figura 11 – Tempo de cocção dos grãos de feijões infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.

Tabela 9: Valores médios de capacidade de absorção de água (%) para feijão, com e sem a infestação do inseto-praga, ao longo do período de armazenamento

Tratamento	Dias de armazenamento							
	0	14	28	42	56	70	77	84
Feijão Jalo								
Sem inseto	137,7a	138,0a	138,4a	138,6a	139,0a	138,7a	138,2a	137,6a
Com inseto	138,3a	137,9a	137,9a	134,5a	131,6b	127,3b	116,1b	109,9b
Feijão Radiante								
Sem inseto	136,9a	136,7a	137,9a	136,9a	138,5a	138,6a	138,2a	138,2a
Com inseto	138,3a	138,0a	137,7a	136,8a	132,2a	126,3b	120,9b	114,7b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para cada uma das variedades de feijão.

TC – Tempo de cocção  
 SI – na ausência do inseto-praga  
 I – na presença do inseto-praga  
 \* Significativo a 1 %  
 \*\* Significativo a 5 %

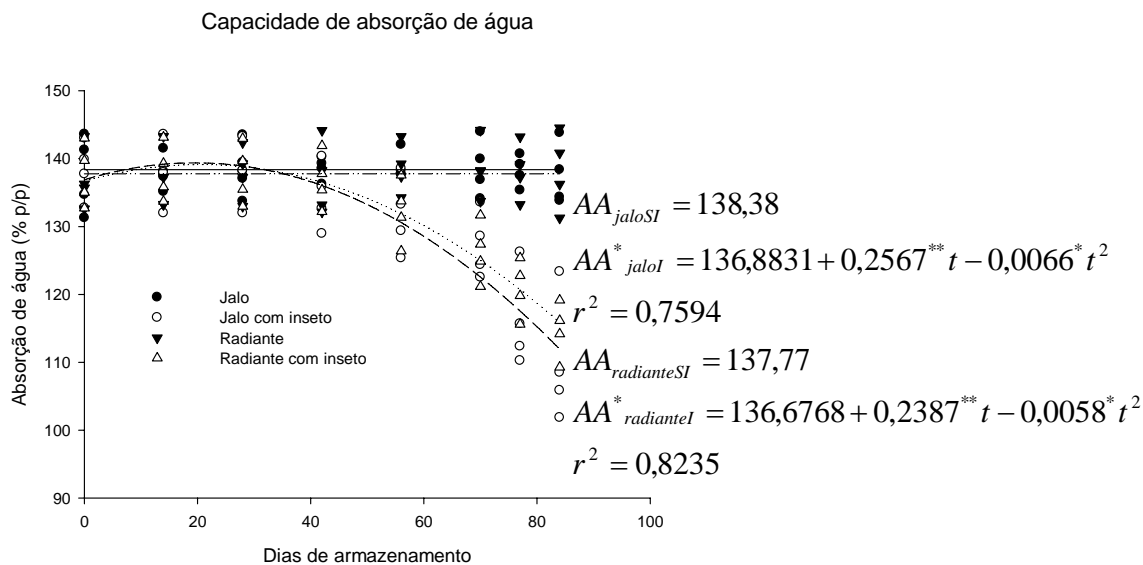


Figura 12 – Capacidade de absorção de água dos grãos de feijões infestados e não infestados com insetos durante o armazenamento.

#### 4.4.2. Caracterização bromatológica das farinhas.

##### Teor de proteínas

O teor de proteínas (em base seca) para as farinhas de feijão, milho e trigo está descrito na Tabela 10.

Tabela 10: Teor de proteína (% BS) nas amostras de farinhas de feijão, milho e de trigo.

	Sem inseto	Com inseto
Feijão jalo	23,89Ba	29,46Aa
Feijão radiante	21,77Bb	25,14Ab
Milho	10,12Bd	12,05Ac
Trigo	12,49Ac	12,60Ac

AB Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

ab Médias seguidas por uma mesma letra minúsculas na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

AA– Absorção de água

SI – na ausência do inseto-praga

I – na presença do inseto-praga

\* Significativo a 1 %

\*\* Significativo a 5 %

Os dados demonstram que o teor de proteína aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com a infestação dos insetos para o feijão e o milho. A respiração dos insetos libera carbono na forma de gás ( $\text{CO}_2$ ), juntamente com água. O nitrogênio presente nos grãos não é liberado durante a respiração, sendo utilizado pelos insetos para a produção de proteínas corporais, ou excretado. Como o nitrogênio excretado pelo inseto continua no alimento e carbono é eliminado na forma de gás, ocorre uma concentração de nitrogênio em relação ao peso total (que diminui), por isto observa-se um maior teor de nitrogênio, e conseqüentemente de proteínas, nas amostras onde houve a infestação por insetos pragas. Além disto, as larvas dos insetos alimentam-se diretamente dos grãos, assimilando e concentrando, principalmente, os compostos protéicos. Assim, a presença de insetos ainda no interior dos grãos, principalmente nos estágios de larva e pupa, contribuem para elevados teores de proteína nos grãos infestados.

Um aumento do teor de proteína total também foi observado por Barney *et al.* (1991) ao analisar a qualidade de milho armazenado, influenciado por *S. zeamais* e por Resende *et al.* (2007) ao avaliar a qualidade de feijão durante o armazenamento, na presença de *A. obtectus*. Entretanto, Lale & Igwebuike (2002) observaram redução no teor de proteína de vagens de acácia infestadas por coleoptera.

### **Teor de lipídeos**

Na Tabela 11 são apresentados os teores médios de lipídios encontrados para as farinhas analisadas, em base seca.

Observou-se uma redução do teor de lipídios nas farinhas de grãos que foram infestados por insetos-praga. Entretanto, esta redução não foi encontrada por Barney *et al.* (1991) ao analisar a qualidade de milho armazenado, na presença e ausência de *S. zeamais*.

Tabela 11: Teor de lipídeos (% BS) nas amostras de farinhas de feijão, milho e de trigo.

	Sem inseto	Com inseto
Feijão jalo	1,45Ad	1,39Bd
Feijão radiante	1,59Ac	1,50Bc
Milho	6,71Aa	6,01Ba
Trigo	2,69Ab	2,39Bb

AB Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

ab Médias seguidas por uma mesma letra minúsculas na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

### Teor de cinzas

A Tabela 12 mostra os valores de cinzas encontrados para as farinhas analisadas, em base seca.

O conteúdo de cinzas representa o conteúdo mineral inorgânico. Observa-se na Tabela 12 que o conteúdo de cinzas aumentou como ataque de inseto. É provável que o conteúdo de cinzas tenha sido concentrado, pelo consumo de carboidratos e lipídios pelo inseto.

Tabela 12: Teor de cinzas (% BS) nas amostras de farinhas de feijão, milho e de trigo.

	Sem inseto	Com inseto
Feijão jalo	3,22Ba	3,94Aa
Feijão radiante	2,95Bb	3,16Ab
Milho	1,46Bc	1,77Ac
Trigo	1,25Bd	1,65Ac

AB Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

ab Médias seguidas por uma mesma letra minúsculas na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

### Teor de umidade e de carboidratos

A Tabela 13 mostra a composição bromatológica das farinhas estudadas. O maior teor de umidade nas farinhas de milho e trigo que vieram de grãos atacados

por insetos é consequência do aumento da umidade dos grãos durante o período de armazenamento, uma vez que estas farinhas não sofreram nenhum tipo de processamento térmico. As farinhas de feijões apresentam menor umidade porque os grãos de feijão foram cozidos e secos em estufa antes da produção das farinhas.

Tabela 13: Valores médios dos teores de umidade (%), proteínas (% BS), lipídeos (% BS), cinzas (% BS) e carboidratos (%BS)

	Umidade	Proteínas (BS)	Lipídeos (BS)	Cinzas (BS)	Carboidratos (BS)
Feijão jalo	8,74	23,89	1,45	3,22	71,44
Feijão jalo com inseto	6,36	29,46	1,39	3,94	65,21
Feijão radiante	9,8	21,77	1,59	2,95	73,69
Feijão radiante com inseto	8,42	25,14	1,50	3,16	70,2
Milho	11,78	10,12	6,71	1,46	81,71
Milho com inseto	14,91	12,05	6,01	1,77	80,17
Trigo	12,13	12,49	2,69	1,25	83,57
Trigo com inseto	13,55	12,60	2,39	1,65	83,36

O teor de carboidratos foi determinado por diferença. Observa-se que os grãos atacados por inseto apresentaram menor conteúdo de carboidratos. Esta diminuição do conteúdo de carboidratos é reflexo do consumo do endosperma do grão pelo inseto.

#### 4.4.3. Avaliação da qualidade nutricional de grãos atacados por insetos-praga.

A Tabela 14 mostra o consumo de dieta e o ganho de peso ao final de 14 dias.

Tabela 14: Média de consumo de dieta e ganho de peso ao final de 14 dias.

Dietas	Consumo	Ganho de peso
Livre de nitrogênio	63,10d	-12,67
Caseína	166,89a	52,33a
Feijão Jalo	84,01c	16,67b
Feijão Jalo com inseto	88,41c	13,83bc
Feijão Radiante	85,27c	18,60b
Feijão Radiante com inseto	78,16c	12,50bc
Milho	111,07b	11,17bc
Milho com inseto	108,37b	8,00cd
Trigo	105,49b	3,40d
Trigo com inseto	110,24b	4,80d

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

A presença do inseto não influenciou no consumo das dietas pelos animais ( $p > 0,05$ ), nem no ganho de peso dos animais ( $p > 0,05$ ). Jood *et al.* (1993), analisando a qualidade proteica de sorgo infestado por *Trogoderma granarium* e *Rhizopertha dominica* e Modgil & Mehta (1997), avaliando a utilização biológica de grão de bico infestado por *Callosobruchus chinensis* L., observaram redução tanto no consumo alimentar, como no ganho de peso. Esta redução não foi observada em nosso estudo.

A digestibilidade é o primeiro fator que reflete a eficiência da utilização proteica da dieta, portanto pode ser considerada um condicionante de sua qualidade (CHIARADIA, 1997). Os valores obtidos para a digestibilidade das amostras estudadas variaram entre 71,66% (feijão radiante) e 94,13% (caseína) (Tabela 15). A presença do inseto-praga não alterou a digestibilidade ( $p > 0,05$ ).

Tabela 15: Médias da digestibilidade proteica *in vivo* das amostras de proteína estudadas.

Fontes de Proteína	Digestibilidade Verdadeira (%)
Caseína	94,13a
Feijão Jalo	73,57c
Feijão Jalo com inseto	74,19c
Feijão Radiante	71,66d
Feijão Radiante com inseto	71,83d
Milho	84,32c
Milho com inseto	84,34c
Trigo	92,80ab
Trigo com inseto	90,03b

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

Os valores de digestibilidade encontrados para caseína e trigo estão semelhantes aos encontrados por Pires *et al.* (2006), que foi de 93,33 % para a caseína, 89,44 % para o trigo. Para o feijão, estudando a variedade pérola, Pires *et al.* (2006) encontraram um valor um pouco superior (78,70 %). Esta diferença pode se por se tratar de variedades diferentes.

Observando a Tabela 15 verifica-se que a digestibilidade não foi afetada pela presença de insetos-praga. Esta fato também foi observado por Resende et al (2007), que determinou a digestibilidade *in vitro* de grãos de feijão infestados por *A. obtectus* durante 112 dias de armazenamento. Ao final do tempo de armazenamento os insetos adultos foram retirados, restando nos grãos os insetos em fase de larva, pupa e alguns insetos adultos que ainda estavam dentro dos grãos. Estudando o valor nutricional de diversas espécies de insetos, Ramos-Elorduy *et al.* (1997) observaram que a digestibilidade de proteína de inseto variou de 76,6 % a 98 %. Os valores para insetos com exoesqueleto são mais baixos devido à quitina. Se o exoesqueleto é removido, a digestibilidade aumenta e é comparada à da carne (VERKERK *et al.*, 2007). Como a maioria dos insetos adultos foi removida,

que são os que possuem exoesqueleto mais rígido, a presença do inseto-praga no grão não afetou a digestibilidade.

Braga et al (2003), analisando a digestibilidade de milho em diferentes níveis de carunchamento observou que a digestibilidade verdadeira diminui e depois voltou a aumentar (comportamento quadrático) com o aumento do nível de carunchamento. Entretanto, a diminuição da digestibilidade com o aumento da infestação foi observada por Jood *et al.* (1993), ao avaliarem a qualidade proteica de sorgo infestado por *T. granarium* e *R. dominica*; por Modgil & Mehta (1993), ao avaliarem a grão de bico infestado por *Callosobruchus chinensis*; por Jood *et al.* (1992), ao avaliarem milho infestado por *T. granarium* e *R. dominica*; e por Jood & Kapoor (1992), ao avaliarem a digestibilidade *in vitro* de milho, trigo e sorgo infestados.

O valor de PER determina a capacidade de uma proteína promover o crescimento de ratos recém-desmamados e o NPR constitui uma modificação do PER e acrescenta ao ganho de peso do grupo com dieta proteica a perda de peso de um grupo com dieta aprotéica. Tanto para valores de PER quanto para valores de NPR houve influência da presença de insetos para os grãos de feijão (Tabela 16).

A Tabela 17 mostra os valores de PER e NPR relativos, considerando a caseína como 100%.

Ao analisar a Tabela 17, observa-se que a presença de insetos nos grãos de feijão diminuiu em cerca de 20 % o PER e em cerca de 15 % o NPR.

Também pode-se observar (Tabela 17) que os grãos de feijão, na ausência de insetos, apresentam, em média, cerca de 70 % do valor do PER da caseína e cerca de 95 % do valor do NPR da caseína. Estes valores demonstram que os grãos de feijão são capazes de promover manutenção das proteínas do organismo (NPR próximo a 100 %), porém são deficientes em promover crescimento (PER em torno de 70 %). As farinhas de trigo apresentam deficiência tanto para crescimento quanto para manutenção.

Tabela 16: Médias dos valores de PER das amostras de proteína estudadas.

	PER		NPR	
	Sem inseto	Com inseto	Sem inseto	Com inseto
Feijão Jalo	2,10Aa*	1,58Ba*	3,74Aa	3,10Ba*
Feijão Radiante	2,34a*	1,66Ba*	3,93Aa	3,35Ba*
Milho	1,37Ab*	1,07Aa*	2,92Ab*	2,94Aa*
Trigo	0,45Ac*	0,58Ab*	2,17Ac*	2,12Ab*
Caseína	3,23*		4,01*	

AB Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

ab Médias seguidas por uma mesma letra minúsculas na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

\* Contraste versus o Tratamento com dieta de caseína significativo ( $P < 0,05$ ).

Tabela 17 : Médias dos valores de PER (%) e NPR (%) das amostras de proteína estudadas.

Fontes de Proteína	PER (%)	NPR(%)
Caseína	100	100
Feijão Jalo	65,02	93,27
Feijão Jalo com inseto	48,92	77,31
Feijão Radiante	72,45	98,00
Feijão Radiante com inseto	51,39	83,54
Milho	42,41	72,82
Milho com inseto	33,13	73,31
Trigo	13,93	54,11
Trigo com inseto	17,96	52,87

Observando a Tabela 15 verifica-se que a digestibilidade não foi afetada pela presença de insetos-praga. Entretanto, observa-se na Tabela 16 que o PER e NPR para os grãos de feijão foram diminuídos na presença de inseto-praga. Diferença que não foi observada nos grãos de milho e trigo. Braga *et al.* (2003), analisando milho com teor de carunchamento de 2 a 38 %, por *S. zeamais*, não encontrou diferença significativa nos valores de NPR. Entretanto Modgil & Mehta (1997) observaram redução do PER de grão de bico com aumento da infestação por *C.*

*chinensis*. Resultado semelhante foi observado por Jood *et al.* (1993), avaliando sorgo infestado por *T. granarium* e *R. Dominica*; por Modgil & Mehta (1993), avaliando grão de bico infestado por *C. chinensis*, por Jood *et al.* (1992) avaliando milho infestado por *T. granarium* e *R. dominica*, mas esta redução não foi observada no valor de NPR.

A composição de aminoácidos indispensáveis e dispensáveis expressa em g de aminoácido por 100 g de amostra encontra-se na Tabela 18.

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 19). 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 20).

A variação dos valores de escore químico para os grãos que foram infestados por insetos e os que não foram infestados por insetos estão descritos na Tabela 21

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.

Os resultados do escore químico corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS) das amostras estudadas encontram-se na Tabela 22. Para o cálculo do PDCAAS, tomou-se por base o valor do escore químico do aminoácido essencial mais limitante de cada fonte de proteína (Tabela 20). Esse valor foi multiplicado pela respectiva digestibilidade proteica verdadeira (Tabela 15). Observou-se que o aminoácido limitante para as variedades de feijão Jalo e Radiante foram os aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína) e para o milho e trigo o aminoácido limitante foi a lisina.

Tabela 18: Composição aminoacídica das amostras estudadas.

Aminoácidos	Feijão Jalo		Feijão Radiante		Milho		Trigo	
	Sem inseto	Com inseto	Sem inseto	Com inseto	Sem inseto	Com inseto	Sem inseto	Com inseto
	g aminoácidos/100 g de amostra							
<b>Indispensáveis</b>								
Phe+Tyr	1,82	1,71	1,81	1,67	0,56	0,64	0,61	0,66
His	0,42	0,57	0,49	0,45	0,19	0,21	0,15	0,17
Ile	0,68	0,62	0,64	0,49	0,18	0,19	0,22	0,26
Leu	1,47	1,39	1,39	1,27	0,89	0,95	0,57	0,58
Lys	1,28	1,23	1,24	1,17	0,20	0,24	0,17	0,18
Met+Cys	0,30	0,30	0,30	0,29	0,22	0,22	0,17	0,18
Thr	0,74	0,77	0,78	0,72	0,22	0,22	0,19	0,19
Trp	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Val	0,96	0,85	0,80	0,68	0,30	0,30	0,26	0,30
<b>Dispensáveis</b>								
Ala	0,94	0,97	0,88	0,87	0,62	0,68	0,2	0,29
Arg	0,98	0,93	0,95	0,85	0,33	0,37	0,26	0,34
Asp	1,89	1,87	1,97	1,91	0,39	0,45	0,27	0,26
Glu	2,93	2,78	2,69	2,52	1,44	1,57	3,08	3,02
Gly	0,88	0,98	0,84	0,83	0,35	0,41	0,38	0,45
Pro	1,38	1,30	1,28	1,22	0,99	1,00	1,39	1,40
Ser	1,12	1,18	1,12	1,09	0,37	0,44	0,41	0,40

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

Tabela 19: Composição aminoacídica indispensável das amostras estudadas.

Aminoácidos Indispensáveis	Feijão Jalo		Feijão Radiante		Milho		Trigo		Padrão FAO/WHO 2-5 Anos
	Sem inseto	Com inseto	Sem inseto	Com inseto	Sem inseto	Com inseto	Sem inseto	Com inseto	
mg aminoácidos/g de proteína na amostra									
Phe+Tyr	75,48	57,19	81,49	65,29	51,57	50,31	47,52	51,19	63
His	17,50	19,22	22,09	17,74	17,17	16,12	11,32	13,40	19
Ile	28,14	20,74	28,88	19,32	16,51	14,75	16,82	20,37	28
Leu	60,95	46,48	62,79	49,92	81,49	74,05	44,52	45,10	66
Lys	52,73	41,23	56,09	45,88	19,96	18,40	13,25	13,88	58
Met+Cys	12,38	10,04	13,56	11,36	20,22	17,19	14,81	14,72	25
Thr	30,44	25,92	35,38	28,37	20,30	18,49	14,68	14,93	34
Trp	Nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	11
Val	39,43	28,61	36,12	26,67	27,26	23,37	20,61	24,36	35

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

Tabela 20: Escore químico de aminoácidos das proteínas estudadas.

Aminoácidos	Feijão Jalo		Feijão Radiante		Milho		Trigo	
	Sem inseto	Com inseto	Sem inseto	Com inseto	Sem inseto	Com inseto	Sem inseto	Com inseto
Indispensáveis	Escore de Aminoácido (mg/g Proteína Amostra)/(mg/g Proteína-Padrão FAO/WHO)							
Phe+Tyr	1,20	0,91	1,29	1,04	0,82	0,80	0,75	0,81
His	0,92	1,01	1,16	0,93	0,90	0,85	0,60	0,71
Ile	1,01	0,74	1,03	0,69	0,59	0,53	0,60	0,73
Leu	0,92	0,70	0,95	0,76	1,23	1,12	0,67	0,68
Lys	0,91	0,71	0,97	0,79	0,34	0,32	0,23	0,24
Met+Cys	0,50	0,40	0,54	0,45	0,81	0,69	0,59	0,59
Thr	0,90	0,76	1,04	0,83	0,60	0,54	0,43	0,44
Trp	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Val	1,13	0,82	1,03	0,76	0,78	0,67	0,59	0,70

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

Tabela 21: Variação do Escore químico (EQ) de aminoácidos entre os grãos que sofreram o ataque por inseto se que não sofreram o ataque.

Aminoácidos	Δ EQ (EQ grão atacado – EQ grão não atacado por insetos)			
	Feijão Jalo	Feijão Radiante	Milho	Trigo
Indispensáveis				
Phe+Tyr	-0,29	-0,26	-0,02	0,06
His	0,09	-0,23	-0,06	0,11
Ile	-0,26	-0,34	-0,06	0,13
Leu	-0,22	-0,19	-0,11	0,01
Lys	-0,20	-0,18	-0,03	0,01
Met+Cys	-0,09	-0,09	-0,12	0,00
Thr	-0,13	-0,21	-0,05	0,01
Trp	nd	nd	nd	nd
Val	-0,31	-0,27	-0,11	0,11

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

Tabela 22: Escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS).

Fonte proteica (aminoácido limitante)	EQ	Digestibilidade	PDCAAS (%)
Feijão Jalo (Met + Cys)	0,50	73,57	36,79
Feijão Jalo com inseto (Met + Cys)	0,40	74,19	29,68
Feijão Radiante (Met + Cys)	0,54	71,66	38,70
Feijão Radiante com inseto (Met + Cys)	0,45	71,83	32,32
Milho (Lys)	0,34	84,37	28,69
Milho com inseto (Lys)	0,32	84,34	26,99
Trigo (Lys)	0,23	92,80	21,34
Trigo com inseto (Lys)	0,24	90,03	21,61

PDCAAS = 1<sup>o</sup> aminoácido limitante x digestibilidade verdadeira obtida por experimentação animal.

Observa-se na Tabela 18 uma redução nos teores de praticamente todos os aminoácidos, por 100 gramas de amostra, nos grãos atacados comparados com os grãos que não sofreram o ataque para as duas variedades de feijão estudadas. Esta diminuição não é observada para as amostras de milho e trigo.

A Tabela 21 mostra a variação do Escore químico de aminoácidos das amostras que sofreram o ataque por insetos-praga em relação às que não sofreram. Observa-se uma diminuição do Escore químico para as duas variedades de feijão e para o milho. Entretanto, a diminuição do Escore químico é mais pronunciada para as variedades de feijão, o que justifica uma redução nos valores de PER e NPR que foram observadas para as variedades de feijão e não foi observado para o milho e o trigo (Tabela 16).

Os grãos, de uma forma geral, possuem as proteínas distribuídas de forma diferenciada dentro do grão, sendo que as proteínas de melhor qualidade nutricional (com um teor de aminoácidos indispensáveis mais equilibrados) estão mais próximas ao germe. Existe um consumo preferencial de certas partes do grão pelos insetos (LALE & IGWEBUIKE, 2002). Existem insetos que se alimentam preferencialmente do germe, diminuindo, assim, a qualidade proteica do grão, pois se alimentam das proteínas de melhor qualidade nutricional. A infestação dos grãos também aumenta o teor de ácido úrico e nitrogênio não protéico, que contribuem para a diminuição da qualidade nutricional do grão (MODGIL & MEHTA, 1997). Entretanto, a diminuição da qualidade proteica de grãos atacados por insetos não foi observada em todos os estudos, sugerindo que as famílias dos insetos e a composição dos grãos determinam a redução da qualidade proteica do grão, numa co-evolução entre insetos e plantas. Desta forma, insetos que se adaptaram a grãos com maior teor de proteínas têm uma maior dependência a este nutriente, consumindo-o em maior quantidade e diminuindo a qualidade proteica do grão atacado. Matioli & Almeida (1979b) relatam que insetos do gênero *Sitophilus* consomem o endosperma dos grãos, se alimentando principalmente de carboidratos, existindo um baixo consumo de proteínas por estes insetos.

#### **4.5. CONCLUSÃO**

O ataque de insetos provocou perda de massa dos grãos e perdas nutricionais. O metabolismo do inseto e a abertura do grão provocaram aumento

da umidade e este aumento da umidade, o que pode ocasionar o crescimento de microrganismos e, por conseguinte, a produção de micotoxinas.

Com o armazenamento, o tempo de cocção para o feijão aumentou. A presença de orifícios produzidos pelos insetos diminuem a intensidade deste aumento do tempo de cocção.

Houve maior teor de nitrogênio nos grãos infestados, que também foi observado quando este valor é convertido para teor de proteínas. Entretanto, a quantidade de nitrogênio não é aumentada e sim concentrada. A oxidação de carboidratos e lipídios para obtenção de energia libera o carbono para o meio na forma de CO<sub>2</sub>, que, sendo um gás, deixa o sistema. O nitrogênio que é consumido pelo inseto e posteriormente excretado continua nos grãos, agora sob forma de excretas.

A digestibilidade dos grãos não foi afetada pelo ataque de insetos. Entretanto, os valores de PER e NPR diminuíram para os grãos de feijão, sugerindo o consumo de aminoácidos indispensáveis pelo inseto. Para milho e trigo esta diferença não foi observada. A qualidade nutricional de grãos é diminuída com o ataque de insetos, porém a família do inseto e a composição dos grãos influenciam esta alteração da qualidade, sugerindo uma co-evolução entre insetos e plantas. Desta forma, insetos que se adaptaram a grãos com maior teor de proteínas têm uma maior dependência a este nutriente, consumindo-o em maior quantidade e diminuindo a qualidade proteica do grão atacado.

A contaminação dos grãos por insetos causa perdas econômicas, nutricionais e podem facilitar o crescimento de microrganismos.

#### **4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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 – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14. ed. Arlington: 1984. 1141p.

ATHIÉ, I.; CASTRO, M. F. P. M.; GOMES, R. A. R.; VALENTINI, S.T. **Conservação de grãos**. Campinas: Fundação Cargil, 1998. 236 p.

BARNEY, R. J.; SEDLACEK, J. D.; SIDDIQUI, M.; PRICE, B. D. Quality of stored corn (maize) as influenced by *Sitophilus zeamais* Motsch and several management practices. **Journal of Stored Products Research**, v. 27, n. 4, p. 225-237, 1991.

BENDER, A. E.; DOELL, B. H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal of 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.

BRAGA, L. G. T.; LOPES D. C.; COSTA, N. M. B.; PEREIRA, J. S.; TEIXEIRA M. P. Uso de ratos de laboratório para determinar o valor nutritivo do milho em diversos níveis de carunchamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 2, p. 331-336, 2003.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1992. 365p.

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

CHIARADIA , A. C. N.; GOMES, J. C. Feijão: química nutrição e tecnologia. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1997, 180p.

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

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

JOOD, S & KAPOOR, A. C. Effect of storage and insect infestation on protein and starch digestibility of cereal grains. **Food Chemistry**, v. 44, p. 209-212, 1992.

JOOD, S; KAPOOR, A. C; SINGH, R. Biological evaluation of protein quality of maize as affected by insect infestation. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v. 40, p. 2439-2442, 1992.

JOOD, S; KAPOOR, A. C; SINGH, R. Biological evaluation of protein quality of sorghum as affected by insect infestation. **Plant Foods of Human Nutrition**, v. 43, p. 105-114, 1993.

LALE, N. E. S. & IGWEBUIKE, J. U. Field infestation of *Faidherbia (Acacia) albida* (Del.) A. chew. pods by stored product Coleoptera in the Nigerian Savanna and effect of infestation on nutrient quality. **Journal of Arid Environments**, v. 51, p. 103-112, 2002.

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.

MATIOLI, J. C.; ALMEIDA, A. A. Alterações nas características químicas de grãos de milho causadas pela infestação de *Sitophilus oryzae* (L., 1973). I- Umidade e composição mineral. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 4, n.1, p. 36-46, 1979a.

MATIOLI, J. C.; ALMEIDA, A. A. Alterações nas características químicas de grãos de milho causadas pela infestação de *Sitophilus oryzae* (L., 1973). III- Nitrogênio total e carboidratos. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 4, n.1, p. 57-68, 1979b.

MODGIL R. & MEHTA, U. Effect of infestation (*Callosobruchus chinensis* L.) of chick peas (Bengal gran) on biological utilization of proteins. **Nahrung**, v. 41, n. 4, p. 236-238, 1997.

MODGIL R. & MEHTA, U. Protein quality of chickpea (*Cicer arietenum*) with different grades of *Callosobruchus chinensis* L. infestation. . **Plant Foods of Human Nutrition**, v. 44, p. 157-162, 1993.

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

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.1, p. 179-187, 2006.

RAMOS-ELORDUY, J.; MORENO, J. M. P.; PRADO, E. E.; PEREZ, M. A.; OTERO, J. L.; GUEVARA, O. L. Nutritional value of edible insects from the State of Oaxaca, Mexico. **Journal Composition and Analysis**, v. 10, p.142-157, 1997

RAMOS JÚNIOR, E. U.; LEMOS, L. B.; SILVA, T. R. B. Características tecnológicas de cultivares de feijão antes e após o armazenamento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 30, n. 1, p.97-103, 2005.

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.

RESENDE, O.; BOREM, F. M.; GRIS, C. F.; PEREIRA, R. G. F. A. Avaliação da qualidade tecnológica de grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenados na presença de equipamento redutor de inóculo. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.29, n.2, p.143-151. Viçosa, 2004.

RESENDE, O.; CORREA, P. C.; OLIVEIRA, M. G. A.; SANT'ANA, R. C. O.; MENDES, F. Q.. Avaliação da qualidade tecnológica e proteica do feijão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 32, p. 01-13, 2007.

RESENDE, O. **Varição das propriedades físicas e mecânicas e da qualidade do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) durante a secagem e o armazenamento**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 180 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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.

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.

SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. M.; FILISETTI, T. M. C. C. Changes in the cell wall polysaccharides during storage and hardening of beans. **Food Chemistry**, v. 84, p. 53-64, 2004.

TOMÉ, P. H. F.; SANTOS, J. P.; CABRAL, L. C.; CHANDRA, P. K.; GONÇALVES, R. A. Uso da atmosfera controlada pelo CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> na preservação das qualidades tecnológicas do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa. v.25, n.2, p.16-22. 2000.

VERKERK, M. C.; TRAMPER J.; van TRIJP, J. C. M.; MARTENS, D. E. Insect cells for human food. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 198-202, 2007.

## CONCLUSÃO GERAL

A digestibilidade proteica de alimentos é um fator limitante da qualidade proteica, pois os alimentos precisam ser digeridos e absorvidos para poder ser utilizado pelo organismo para síntese proteica. Vários fatores podem interferir na digestibilidade proteica, como a presença de fatores antinutricionais. A determinação da digestibilidade proteica *in vitro* facilita a determinação da digestibilidade, pois se trata de uma metodologia mais rápida e barata, necessita de menor quantidade de amostras e não necessita de animais experimentais. Uma boa técnica de determinação de digestibilidade proteica *in vitro* pode ajudar programas de melhoramento genético e alterações de processamento, predizendo a digestibilidade proteica. Os dois métodos para determinação de digestibilidade proteica *in vitro* analisados neste trabalho apresentaram boa correlação com a digestibilidade *in vivo*. As alterações utilizando apenas as enzimas tripsina e pancreatina tornam a metodologia mais barata e não interferem na correlação com a digestibilidade *in vivo*. As equações desenvolvidas pelo método de queda de pH permitiram a obtenção de valores de digestibilidade *in vitro* com maior grau de correlação com os resultados de digestibilidade *in vivo* do que as equações obtidas pelo método do pH estático.

Observou-se neste trabalho que a presença do inseto-praga não alterou a digestibilidade dos grãos analisados, porém houve redução do PER e do NPR para os grãos de feijão, fato não foi observado para os grãos de milho e trigo. A qualidade nutricional de grãos é diminuída com o ataque de insetos, porém a família do inseto e a composição dos grãos influenciam esta alteração da qualidade, sugerindo uma co-evolução entre insetos e plantas. Desta forma, insetos que se adaptaram a grãos com maior teor de proteínas têm uma maior dependência a este nutriente, consumindo-o em maior quantidade e diminuindo a qualidade proteica do grão atacado.

A contaminação dos grãos por insetos causa perdas econômicas, nutricionais e podem facilitar o crescimento de microrganismos pelo aumento da umidade e perfuração do grão.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A

### Conceito das IDRs

#### RDA – Quota Dietética Recomendada ou Recommended Dietary Allowances

As RDAs são quantidades recomendadas considerando os níveis médios de ingestão dietética diários, suficientes para atingir a necessidade nutricional de quase todos os indivíduos saudáveis (97 a 98 %), considerando as faixas etárias, estados fisiológicos específicos e sexo.

#### EAR – Necessidade Média Estimada ou Estimated Average requirement

O EAR é a quantidade de um nutriente que é estimada para atingir a necessidade do nutriente pela metade dos indivíduos saudáveis de um grupo populacional. É o nível mais baixo de ingestão contínua de um nutriente que irá manter adequado o estado de nutrição de um indivíduo, em relação ao referido nutriente. EAR são usados para avaliar a adequação da ingestão de grupos populacionais e para estabelecer as RDAs.

#### AI – Ingestão Adequada ou Adequate Intake

As AIs são níveis de ingestão dietética diária recomendados com base em aproximações da ingestão de nutrientes de um grupo de indivíduos saudáveis, determinados por observações ou registros. O nível de ingestão dietética de nutrientes é estabelecido pela AI quando não se podem determinar as EARs por insuficiência de informação científica para estabelecer as RDAs.

#### UL – Nível de Ingestão Máxima Tolerável ou Tolerable Upper Level

São níveis mais altos de ingestão diária de um nutriente, prováveis de não causarem risco ou efeito adverso à saúde de quase todos os indivíduos de determinado grupo populacional. Nem todos os nutrientes tem UL estabelecidos.

## Referência Bibliográfica

RIBEIRO, S. M. R. & COSTA, N. M. B. Conceito e histórico da nutrição. In: COSTA, N. M. B. & PELUZIO, M. C. G. **Nutrição Básica e Metabolismo**, Viçosa: Editora UFV 2008, p. 9-18.

APÊNDICE B:

Composição da Dieta AIN-93G para roedores em fase de Crescimento, gestação e lactação

Ingredientes	g/100 g
Caseína	20,0
Amido dextrinizado (90-94 % tetrassacarídeos)	13,2
Sacarose	10,0
Óleo de soja	7,0
Fibra	5,0
Mistura de minerais	3,5
Mistura de vitaminas	1,0
L-Cistina	0,3
Bitartarato de colina	0,25
Amido de milho	39,75

Composição da Mistura de minerais (AIN-93G-MX)

Ingredientes	g/kg da mistura
<b>Elementos minerais essenciais</b>	
Carbonato de cálcio anidro (40,04 % Ca)	357,00
Fosfato de potássio monobásico (22,76 % P; 23,73 % K)	196,00
Citrato de potássio, tri-potássio, monohidratado (36,16 % K)	70,78
Cloreto de sódio (39,34 % Na; 60,66 % Cl)	74,00
Sulfato de potássio (44,87 % K; 18,39 % S)	46,60
Óxido de magnésio (60,32 % Mg)	24,00
Citrato de ferro (16,5 % Fe)	6,06
Carbonato de zinco (52,14 % Zn)	1,65
Carbonato de manganês (47,79 % Mn)	0,63
Carbonato de cobre (57,47 % Cu)	0,30
Iodato de potássio (59,3 % I)	0,01
Selenato de sódio anidro (41,79 % Se)	0,01025
Paramolibdato de amônio 4 hidratado (54,34 % Mo)	0,00795
<b>Elementos minerais potencialmente benéficos</b>	
Meta silicato de sódio 9 hidratado (9,88 % Si)	1,45
Sulfato de cromo e potássio 12 hidratado (10,42 % Cr)	0,275
Cloreto de lítio (16,38 % Li)	0,0174
Ácido bórico (17,5 % B)	0,0815
Fluoreto de sódio (45,24 % F)	0,0635
Carbonato de níquel (45 % Ni)	0,0318
Vanadato de amônio (43,55 % V)	0,0066
Sacarose	221,026

### Composição da Mistura de vitaminas (AIN-93G-VX)

Ingredientes	g/kg da mistura
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina-HCl	0,700
Tiamina-HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
D-Biotina	0,020
Vitamina B12 (cianocobalamina:0,1 % em manitol)	2,500
Vitamina E (all-rac-A-acetato de tocoferila: 500 UI/g)	15,00
Vitamina A (all-trans-palmitato de retinil (500.000 UI/g)	0,800
Vitamina D (colecalfiferol: 400.000 UI/g)	0,250
Vitamina K (filoquinona)	0,075
Sacrose	974,655

#### Referência Bibliográfica

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.