UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FCF/FEA/FSP

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM NUTRIÇÃO HUMANA APLICADA - PRONUT

MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DE PROPRIEDADES NUTRICIONAIS E SENSORIAIS DE MISTURAS PROTÉICAS ATRAVÉS DA METODOLOGIA ESTATÍSTICA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

INAR ALVES DE CASTRO

Tese para obtenção do grau de Doutor
Orientador: Prof. Júlio Orlando Tirapegui Toledo

SÃO PAULO
1999

Inar Alves de Castro

MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DE PROPRIEDADES NUTRICIONAIS E SENSORIAIS DE MISTURAS PROTÉICAS ATRAVÉS DA METODOLOGIA ESTATÍSTICA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Comissão Julgadora
Tese para obtenção do grau de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Júlio Orlando Tirapegui Toledo
Orientador/Presidente

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

São Paulo, 16 de dezembro de 1999

À minha família, em especial minhas filhas **Renata** e **Marcela**, razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-graduação.

Ao Professor Júlio Tirapegui, pela orientação deste trabalho, pela amizade e confiança demonstradas em todos os momentos.

Ao Professor Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva pela amizade e pela valiosa colaboração na metodologia estatística utilizada neste trabalho.

À Profª Úrsula Maria Lanfer Marques e à técnica Rosa Maria Cerdeiros pela colaboração na análise de aminoácidos.

À Dra. Maria Helena Bellini Marume (IPEN-CNEN/SP) que, gentilmente, cedeu o biotério para realização dos ensaios biológicos.

Aos Professores: Silvia M. Franciscato Cozzolino, Célia Coli, Fernando Salvador Moreno, Denise Cyrilo pela colaboração prestada durante o curso.

À Nestlé Ltda, Santista Alimentos e Leiner Davis Gelatin pelo fornecimento de amostras de leite em pó e cacau alcalino solúvel, isolado protéico de soja e glúten de trigo e gelatina, respectivamente.

À Sargel Ltda, em especial ao Engº Anselmo D. Bertéli pela colaboração e fornecimento de amostras de gelatina hidrolisada.

Ao Sr. Ricardo Siqueira Rodrigues, Chefe do Departamento de Desenvolvimento de Programas (DDP), Diretoria da FAE - Fundação de Assistência ao Estudante, Ministério da Educação e Cultura, pelas informações prestadas e relatórios enviados.

Ao Sr. Waldir Horobet , Chefe do laboratório da Mcassab, pela análise de triptofano. Ao Sr. Gilmar Tadeu Zezza e Siomara de Fátima Presutto, gerentes da BanCook Ltda, pela realização das análises sensorais.

Aos técnicos Sandra Mesquita, Luiz Claúdio Silva, Ivanir Nascimento e as estagiárias Luciana Mirotti e Márcia Scamilla Demestris pela ajuda, incentivo e amizade.

Ao bibliotecário Angelo Antônio Alves Correa da Cruz, da biblioteca do conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo, pela assessoria e revisão das Referências Bibliográficas.

Às secretárias Angela Maria Lima de Oliveira, Isabel Cristina Bossi Alves e Mônica Dealis Perussi, pela colaboração. À Silvania Neves e todos os funcionários do biotério.

À Maria Cristina S. Miranda, nutricionista da Secretaria de Educação e Cultura do Município de Mairiporã (SP), pelos testes de aceitabilidade conduzidos nas instituições de ensino da rede municipal.

A todos os colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos.

À FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto (Processo 96/12445-0)

.... A ciência vai muito além da sua mera prática. Por trás das fórmulas complicadas, das tabelas de dados experimentais e da linguagem técnica, encontra-se uma pessoa tentando transcender as barreiras imediatas da vida diária, guiada por um insaciável desejo de adquirir um nível mais profundo de conhecimento e de realização própria. Sob esse prisma, o processo criativo científico não é assim tão diferente do processo criativo nas artes, isto é, um veículo de autodescoberta que se manifesta ao tentarmos capturar a nossa essência e lugar no Universo.....

" A Dança do Universo" Marcelo Gleiser

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DA LITERATURA 2

2.1. Política nutricional: Importância e Limitações 2

2.2. Principais programas institucionais utilizados no Brasil 6

2.3. Modelos de Complementação da Qualidade Protéica e a Otimização de Recursos alternativos 11

2.4. Avaliação Sensorial no Desenvolvimento de Produtos 17

2.5. Metodologia Estatística de Superfície de Resposta em Experimentos com Misturas 19

2.6. Análise de Componente Principal (ACP) 21

3. OBJETIVO 24

4. METODOLOGIA 26

4.1.Desenvolvimento das Formulações 26

4.1.1. Produto Controle 26

4.1.2. Produto Base 26

4.2.Seleção dos Ingredientes Protéicos 27

4.3. Delineamento Experimental 28

4.4. Avaliação da Qualidade Protéica 29

4.4.1. Análise da Composição em Aminoácidos 29

4.4.2. Análise da Digestibilidade *in vivo* 31

4.4.3. Cálculo do PDCAAS 31

4.4.4. Análise da Eficiência Líquida da Proteína (NPR) 32

4.5. Avaliação Sensorial 32

4.5.1.Testes de Aceitabilidade Geral 32

4.5.2.Testes Analíticos Discriminativos 32

4.5.3. Testes de Aceitabilidade Geral aplicado ao Produto "SC" 33

4.6. Testes Estatísticos 34
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO 36
5.1. Desenvolvimento das Formulações (Produto Controle e Produto Base) 36
5.2. Avaliação Sensorial do Produto Base 37
5.3. Seleção dos Ingredientes Protéicos 37
5.4. Delineamento Experimental e Elaboração das Misturas 39
5.5. Avaliação Sensorial das Misturas Protéicas 39
5.6. Estimativa dos Parâmetros para Regressão Sensorial (y_1) e Análise de Variância 41
5.7. Avaliação Nutricional de Misturas Protéicas, Estimativa dos Parâmetros para as Regressões Nutricionais (y_2 e y_3) e Análise de Variância 42
5.8. Avaliação de Custo 52
5.9 Otimização Conjunta das Respostas 52
5.9.1. Validação 53
5.10. Análise da Componente Principal 53
5.11. Adequação da "Solução de Compromisso" à Formulação Alimentícia 56
6. CONCLUSÕES 58
Tabelas 60
Figuras 74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 89
8. APÊNDICES
I)Modelo da Ficha de Avaliação Sensorial para Testes de Aceitabilidade Geral 103
II)Modelo da Ficha de Avaliação Sensorial para Testes Analíticos Discriminativo 104
III) Matriz de Dados Originais para a ACP 105
IV) Fichas de Avaliação para o Teste de Aceitabilidade Geral conduzidos nas Instituições de Ensino da Rede Pública 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Composição centesimal dos principais ingredientes utilizados na formulação do Produto Controle..... 60

Tabela 02 - Ingredientes das formulações "Controle" e "Base"..... 60

Tabela 03 - Composição centesimal e custo aproximado das formulações "Controle" e "Base" e as especificações nutricionais segundo os boletins da FAE..... 61

Tabela 04 - Análise de variância dos resultados obtidos do teste sensorial para aceitabilidade geral entre os produtos "Controle" e "Base" com provadores não treinados. 61

Tabela 05 - Composição nutricional e custo protéico dos três ingredientes selecionados para a composição das misturas protéicas..... 62

Tabela 06 - Proporção de sólidos de cada substrato utilizados nas misturas protéicas e teor de nitrogênio final de cada ensaio. 62

Tabela 07 - Resultados da análise sensorial com teste de diferença escalar do controle para o delineamento experimental *simplex-centróide*..... 63

Tabela 08 - Análise de variância dos resultados obtidos do teste sensorial de "diferença escalar do controle". 63

Tabela 09 - Análise de variância do modelo quadrático ajustado aos dados experimentais. 64

Tabela 10 – Formulação das Dietas. 64

Tabela 11 – Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos..... 65

Tabela 12 – Digestibilidade Aparente e Real observada para as misturas protéicas.. 65

Tabela 13 – Digestibilidade Real observada e calculada para as misturas protéicas..... 66
Tabela 14 - Análise de variância entre os valores calculados e observados experimentalmente para digestibilidade real..... 66
Tabela 15 - Composição de aminoácidos (mg/gN) dos ingredientes protéicos utilizados nas formulações comparada às necessidades de aminoácidos essenciais 67
Tabela 16 – Cálculo do Escore de Aminoácidos Essenciais corrigido pela Digestibilidade Real (PDCAAS) para as misturas protéicas..... 68
Tabela 17 – Análise de variância do modelo cúbico especial simplificado ajustado aos dados experimentais para a resposta PDCCAS (y_2) e NPR (y_3) ... 68
Tabela 18 - Ganho de Peso, consumo de ração, ingestão de proteína e NPR dos ensaios experimentais. 69
Tabela 19 – Custos das misturas protéicas para o delineamento experimental *simplex-centróide*..... 69
Tabela 20 – Resultados obtidos de ensaios biológicos e respostas estimadas pelas regressões (Eq 4) e (Eq 5) para a mistura (x_1=0,25; x_2= 0,15; x_3 =.0,60) 70
Tabela 21 – Matriz de Correlações utilizada na ACP..... 71
Tabela 22 – Composição nutricional e estimativa de custo das formulações "Controle" e " SC" e as especificações nutricionais segundo os boletins da FAE..... 72
Tabela 23 - Composição de aminoácidos dos ingredientes protéicos utilizados na formulação do produto "Controle" e "SC". 73

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 : Tipos de respostas, avaliadas em termos de um índice biológico de avaliação da qualidade protéica, obtidas a partir da mistura de duas proteínas alimentares. Adapatado de Bressani *et al.* (1989)..... 74

Figura 02 : Delineamento experimental (*simplex-centróide*) 75

Figura 03 : Interações sensoriais binárias: A⇨ gelatina-glúten, B ⇨ gelatina-soja e C ⇨ glúten-soja. 76

Figura 04 : Curvas de nível para resposta sensorial 77

Figura 05 : Perfil de aminoácidos essenciais dos ingredientes protéicos comparados ao padrão FAO/WHO (1991)..... 78

Figura 06 : Curvas de nível para a resposta PDCAAS..... 79

Figura 07: Interações binárias para as respostas nutricionais avaliadas através dos métodos PDCAAS: (Fig. A⇨gelatina e glúten, Fig. B ⇨ gelatina e soja e Fig. C ⇨glúten e soja) e NPR : (Fig. D ⇨gelatina e glúten, Fig. E ⇨ gelatina e soja e Fig. F ⇨glúten e soja)..... 80

Figura 08 : Curvas de nível para a resposta NPR 81

Figura 09 : Curvas de nível para resposta Custo 82

Figura 10 : Histograma dos autovalores..... 82

Figura 11 : Representação das variáveis no primeiro plano fatorial..... 84

Figura 12: Representação da nuvem de pontos (formulações) no primeiro plano fatorial..... 85

Figura 13 : Histograma de classificação hierárquica 86

Figura 14 : Dendrograma 87

Figura 15 : Representação da nuvem de pontos (formulações) no primeiro plano fatorial divididas em quatro classes básicas..... 88

RESUMO

Gelatina Hidrolisada (GH), Glúten de Trigo (GT) e Isolado Protéico de Soja (IPS) foram misturados em diferentes proporções com o objetivo de substituir proteínas lácteas em uma formulação alimentícia utilizada em programas institucionais de alimentação escolar, buscando-se uma redução de custos sem alterações significativas das propriedades nutricionais e sensoriais do produto final. A qualidade nutricional das misturas foi avaliada de acordo com os métodos "Escore Químico corrigido pela Digestibilidade - PDCAAS" e " Razão de Eficiência Protéica - NPR". As misturas, aplicadas à formulação de uma bebida láctea, foram avaliadas sensorialmente através do método de "Diferença Escalar do Controle". Os resultados obtidos experimentalmente pelo delineamento *simplex-centróide* foram utilizados para modelar equações canônicas de Scheffé que pudessem descrever o efeito da proporção de cada componente na qualidade final. Todos os resultados foram correlacionados através de análise multivariada e representados na forma de Análise de Componente Principal (ACP). Uma "solução de compromisso" contendo 25% de GH, 15% GT e 60% de IPS foi selecionada na otimização conjunta das respostas nutricional, sensorial e econômica, resultando na redução média de 6% do custo do produto final sem alteração significativa de qualidade ($p < 0,01$). Estes resultados revelaram a eficiência da utilização de técnicas estatísticas multivariadas na otimização simultânea e na visualização das interações que ocorrem em processos complexos como sistemas biológicos.

ABSTRACT

Hidrolizated Gelatin (HG), Wheat Gluten (WG) and Soybean Protein Isolate (SPI) were mixed at different proportions in order to partially replace milk proteins in food formulation utilized in Food Programs to reduce its cost without significant decrease in its nutritional and sensorial properties. The nutritional quality of the mixtures was evaluated by the "Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)" and "Net Protein Ratio (NPR)" methods. The sensorial quality of the mixtures was evaluated by the "Scale Difference of Control". The results obtained experimentally by simplex design were used to elaborate Scheffé's canonical equations that would describe the effect of the proportion of each component on the final nutritional quality of the product. All the results were correlationed by Multivariate Analysis and represented by Principal Component Analysis (PCA). A "compromise solution" containing 25% HG, 15% WG and 60% SPI was selected as multiresponse optimization. This mixture was applicated in food formulation and submitted to the evaluations of nutrition and sensorial quality. The final product showed about 6% of cost reduction without any significant change in its quality ($p < 0,01$). These results demonstrated the statistics multivariate methods efficiency in simultaneous optimization and visualization of interactions which are present in complex process like biological systems.

Key Words: protein mixtures, gelatin, gluten, soybean, milk protein.

1. INTRODUÇÃO

A chegada do novo milênio caracteriza-se principalmente, pela crescente eficiência com a qual as informações são transmitidas, promovendo uma revolução global nos sistemas de comunicação. Dirigidas especificadamente ao setor alimentício, tais informações estão mudando o comportamento do consumidor, seja no mercado varejista ou institucional, tornando-o cada vez mais exigente em relação a qualidade e importância nutricional dos produtos que consome.

Portanto, profissionais da área de "Pesquisa e Desenvolvimento (P&D)" necessitarão, cada vez mais, de instrumentos que os permitam avaliar diversos parâmetros, de forma simultânea e otimizada, na elaboração ou reformulação de produtos, atendendo conjuntamente à exigências mercadológicas (sensoriais e funcionais), microbiológicas, econômicas e nutricionais.

Procurando atender a esta demanda tecnológica, propusemos um estudo no qual, um produto alimentício de amplo consumo institucional foi selecionado para exemplificar como vários parâmetros de uma reformulação poderiam ser avaliados simultâneamente, através de técnicas de modelagem e otimização estatísticas.

Desta forma, além dos resultados apresentados e discutidos especificamente neste estudo, espera-se que os processos de análise multivariada aqui empregados, sejam suficientemente capazes de sensibilizar os atuais sistemas, e observadas suas limitações, possam servir como uma sugestão de modelo orientativo para o desenvolvimento de novos produtos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Tratando-se de uma proposta para otimização multivariada de um produto alimentício utilizado em programas institucionais, esta revisão abordará inicialmente aspectos referentes à Política Nutricional no Brasil e a importância do parâmetro "custo-qualidade" dos produtos que compõem seus Programas específicos. A seguir, serão apresentados os índices de qualidade nutricional e sensorial adotados neste estudo, como características a serem maximizadas, buscando-se explorar suas respectivas vantagens metodológicas assim como suas limitações. Finalmente, esta revisão pretende disponibilizar algumas técnicas estatísticas para planejamento e otimização de experimentos, consideradas atualmente como metodologias de conhecimento indispensável ao desenvolvimento de processos de pesquisa envolvendo multivariáveis, e portanto, mais próximos da realidade na qual os eventos naturalmente ocorrem.

2.1. POLÍTICA NUTRICIONAL : IMPORTÂNCIA E LIMITAÇÕES

Política nutricional pode ser considerada como o conjunto de princípios, objetivos, prioridades e decisões adotados por um Governo e implementados como parte integral de seu plano de desenvolvimento, ou seja, como o conjunto de intenções multidisciplinares que busquem a adequação do bom estado de saúde e qualidade de vida de indivíduos pertencentes a uma determinada comunidade.

Cada nação utiliza programas de intervenção nutricional de acordo com suas necessidades, preocupações e prioridades, definidas através de uma ampla política econômica e social. Desta forma, o que difere na elaboração de um projeto nutricional são os objetivos e metas que se deseja alcançar através de cada programa proposto e dos recursos disponíveis.

As etapas de planejamento como: identificação do problema, diagnóstico da situação, orçamento, implementação, gerenciamento operacional e administrativo, avaliação e divulgação dos resultados, deveriam sempre ser executadas para que a sociedade pudesse discutir o impacto das medidas adotadas, de forma a ampliá-las ou modificá-las de acordo com suas conclusões.

O Brasil apresenta características epidemiológicas extremamente heterogêneas. Como nos demais países em desenvolvimento, são considerados problemas nutricionais de saúde pública: desnutrição protéico-calórica moderada, agravada normalmente por processos infecciosos, deficiências de ferro, iodo e vitamina A, resultante do consumo de dietas desbalanceadas, e a obesidade associada a incidência de doenças crônico degenerativas como a diabetes não insulino-dependente, alguns tipos de câncer, hipertensão arterial, distúrbios comportamentais e outras (Scrimshaw, 1990; Mondini & Monteiro, 1994).

Em relação ao consumo insuficiente de alimentos, estimou-se que, apenas em 1990, cerca de 184 milhões de crianças em idade pré-escolar apresentavam baixo peso nos países em desenvolvimento e que 700 milhões de pessoas consumiam dietas inadequadas (Kennedy, 1994). Apesar de, em algumas partes do mundo, principalmente na América Latina e no Leste Asiático, ter ocorrido um dramático impacto na redução da desnutrição infantil, em termos globais, o número absoluto de crianças desnutridas tem aumentado. Metade das crianças do sul da Ásia são desnutridas. Na África, uma em cada três crianças apresenta baixo peso e o estado nutricional destas têm piorado (UNICEF, 1998).

Atualmente tem-se observado uma grande prevalência de desnutrição protéico-calórica moderada, podendo atingir até 60% das crianças, sendo portanto um dos maiores problemas de saúde pública mundiais (Simeon & McGregor, 1990) e que, segundo Pelletier (1994), estaria diretamente associada aos índices de mortalidade infantil. Nos países em desenvolvimento, cerca de 55% das mortes infantis estão ligadas

à desnutrição, não existindo, na história recente da humanidade, qualquer situação mórbida com esta magnitude, apesar dos avanços na redução da prevalência do problema (Brasil, 1999[b]). Uma das consequências mais graves da ingestão protéico-calórica insuficiente é a ativação dos mecanismos fisiológicos adaptativos, como a redução da taxa de metabolismo basal, utilização mais eficiente de energia, redução do nível de atividade física ou redução do *turnover* protéico (Young & Marchini, 1990; Lindsay, 1993), a custos inaceitáveis em termos sócio-culturais e imunológicos. Muitas deficiências nutricionais, se suficientemente severas, podem reduzir a resistência à infecções, através de vários mecanismos como a menor formação de anticorpos e redução da concentração de imunoglobulinas, tornando sinérgica a relação entre os efeitos das infecções e o estado nutricional. Nesse contexto, não é surpresa que a deficiência protéica esteja consistentemente associada a menor resistência às infecções, uma vez que a maior parte do sistema imune é dependente de replicação celular ou da produção de compostos protéicos ativos (Scrimshaw & SanGiovanni, 1997). Por outro lado, a oferta de alimentos no mundo é mais que suficiente. Desde o início dos anos 60 a disponibilidade calórica (2.700 Kcal pc) atende à demanda de toda a população mundial (Abromovay,1996). Verifica-se que as maiores causas da desnutrição estão associadas à distribuição dos alimentos e a outros fatores como reformas econômicas, distribuição de renda, acesso aos serviços de saúde, práticas de higiêne, distribuição dos alimentos dentro da hierarquia familiar, aleitamento materno e outros (Molina *et al.*, 1989; Musgrove, 1990; Gross *et al.*, 1990; Igbedi, 1993; Kennedy, 1994; Messer, 1997; Monteiro *et al.*, 1997).

Desta forma, a fome como consequência do não acesso aos alimentos é apenas um item dentro do contexto geral de saúde e do estado nutricional (Kennedy, 1994). Em certa regiões do Brasil, a porcentagem de crianças com baixo peso caiu de 17% em 1973 para menos de 6% em 1996, embora os índices de pobreza tenham quase dobrado no mesmo período

(UNICEF, 1998). Verifica-se que, embora a desnutrição ainda atinja de forma relevante principalmente as crianças de famílias de baixa renda, de uma forma geral seu índice está em declínio entre adultos e crianças de todos os segmentos sócio-econômicos (Monteiro *et al.*, 1995). Sabe-se que o aumento de renda familiar influi na redução da pobreza e no aumento do consumo de alimentos. Porém, as evidências sugerem que apenas o aumento de renda não resolveria o problema da desnutrição, pelo menos a curto prazo. Vários estudos tem demonstrado que a desnutrição marginal, que pode estar desvinculada da renda, é altamente prevalente nos países em desenvolvimento, afetando as taxas de crescimento infantil e funções mentais, com efeitos adversos nas reações emotivas e comportamentais, qualidade de vida e habilidade para conviver em sociedade (Lindsay, 1993).

No Brasil, um estudo realizado na Grande São Paulo, abordando o aumento de poder aquisitivo proporcionado pela estabilidade da moeda (Plano Real) sugere que, de acordo com a Lei de Engels, houve uma queda na proporção da renda gasta com alimentos pelas famílias, que segundo dados do DIEESE, passaram de 39% em 1969/70 para 27% em 1994/95 (Cyrillo *et al.*, 1997). Trata-se, sem dúvida, de um resultado positivo, embora possa ainda ser considerado elevado quando comparado aos índices de países desenvolvidos que ficam em torno de 16% (Kessler ,1995).

Houve portanto uma evolução favorável da dieta em termos de adequação calórica e protéica; que se por um lado foi importante em relação à diminuição dos índices de desnutrição, por outro trouxe problemas relacionados à doenças crônico-degenerativas, até então características de países desenvolvidos, e associadas principalmente a substituição de carboidratos por gorduras no total calórico e de proteínas vegetais por proteínas animais (Mondini & Monteiro, 1994; Popkin, 1994; Drewnowski & Popkin, 1997). Em uma mesma população onde a desnutrição está presente, subpopulações sofrem com o excesso de alimentos e a obesidade, principalmente nas áreas urbanas de países com baixo nível de desenvolvimento econômico (Popkin, 1999). Segundo dados da Pesquisa

Nacional de Saúde e Nutrição (PNSN 1989-90) o Índice de Massa Corporal (IMC) dos brasileiros revelou cerca de 24,6% de indivíduos com sobrepeso e 8,3% de obesos (BRASIL, 1999[b]). A elevação das taxas de urbanização em países menos desenvolvidos, não mais vinculadas ao crescimento econômico, está acelerando a elevação do consumo de açúcares e gorduras (Popkin, 1999).

Entende-se que o objetivo fundamental de qualquer sociedade desenvolvida seja que toda a sua população tenha pleno acesso tanto aos alimentos como aos serviços básicos de saúde, moradia, educação, informação e outros. Mas enquanto este ideal não é atingido, medidas de intervenção públicas tornam-se necessárias ao resgate da cidadania daqueles que sofrem com a pobreza, assim como da melhora de qualidade de vida de toda a comunidade.

2.2. Principais programas institucionais utilizados no Brasil

O Brasil começou a identificar desnutrição como um problema de saúde pública a partir da década de 40, quando as primeiras iniciativas foram tomadas no sentido de orientar a produção agrícola e industrial de alimentos (Silva, 1994). Desde então vários serviços foram criados com o objetivo geral de melhorar o estado nutricional dos grupos mais vulneráveis da população.

Foram investidos recursos financeiros da ordem de US$ 8 bilhões nos últimos 20 anos em projetos nutricionais com diferentes objetivos. Estima-se que, com poucas exceções, os programas tenham sido ineficientes na transferência dos benefícios (Silva, 1994; Silva, 1996; Salay & Carvalho, 1996). Atualmente, os segmentos populacionais que recebem suplemento alimentar restringem-se às Forças Armadas (300 mil refeições diárias), beneficiários do Programa de Assistência ao Trabalhador (10 milhões) e os beneficiários dos Programas de Merenda Escolar (36

milhões), sendo que muitas dessas refeições são consideradas inadequadas do ponto de vista nutricional (BRASIL, 1999[b]).

Vários fatores podem ser apontados como responsáveis pelo fracasso da maioria das intervenções adotadas até hoje, como: a falta de integração das áreas sociais na elaboração de uma política nutricional, deficiência na identificação dos problemas que afetam a população-alvo, monitoramento insuficiente dos programas, interrupções frequentes nos serviços prestados, erros de planejamento e orçamento, uso político dos programas, grande número de programas com objetivos diversos, sem coordenação, dificultando a obtenção de informações e controle dos mesmos, falta de alcance às áreas rurais onde se encontra a maior parcela da população-alvo e pouca ou nenhuma participação ativa dos beneficiários diretos na adequação dos programas às suas necessidades. As exceções ficaram praticamente restritas ao Programa de Controle do Bócio Endêmico (PCBE), dentro do Incentivo de Combate às Carências Nutricionais Específicas, que regulamentou a adição de iodo ao sal de cozinha buscando a erradicação do bócio endêmico, e o Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (PNIAM), apoiado pela UNICEF, que buscou incentivar e prolongar o período de aleitamento materno, contribuindo também para fortalecer o vínculo mãe-filho, fundamental ao desenvolvimento da criança (Silva, 1994).

O Brasil também mantém em operação o Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE). Criado em 1954, o PNAE é responsável pelo atendimento à crianças matriculadas em escolas da rede pública e escolas filantrópicas especiais . Sua abrangência pode ser verificada atualmente na "capacidade nominal" de atendimento a mais de 30 milhões de escolares de 4 a 14 anos (Ministério da Educação/FAE, 1996). O PNAE estabeleceu como metas um aporte mínimo per-capita contendo 9,0 gramas de proteínas e 350 Kcal, que representariam cerca de 15 % das necessidades protéico-calóricas da faixa etária atendida, a um custo aproximado de R$ 0,13 (treze centavos)por criança/dia, de acordo com o número de crianças

regularmente matriculadas no ano anterior, visando a suplementação das refeições domésticas durante todos os dias letivos com base no calendário do Distrito Federal. Segmentos populacionais cadastrados no Programa Comunidade Solidária recebem ainda uma suplementação de verba da ordem de R$0,20 (vinte centavos) por criança/dia enquanto entidades filantrópicas e pré-escolas recebem, sem exceção, apenas R$0,06 (seis centavos) por criança/dia. Em termos anuais, o orçamento de 1999 destinou um total de R$ 903 milhões para os 200 dias letivos (Ministério da Educação e Cultura, 1995; Ministério da Educação e Cultura, 1996; Alvim, 1998; BRASIL, 1999[b]). Apesar destes valores parecerem bastante modestos, a realidade brasileira agravada por vários fatores econômicos e sociais, contribui para que muitas de nossas comunidades não recebam nem mesmo este mínimo. Porém, a falta de avaliação de custo-eficiência, não permite afirmar-se que qualquer uma de suas metas estejam sendo alcançadas.

Frente a esta situação, é preciso que a população seja conscientizada da necessidade de se estabelecer políticas nutricionais sérias e bem planejadas, para que se possa exigir dos governantes resultados passíveis de análise e discussão, determinando assim, no mínimo, o uso mais eficiente dos recursos públicos.

Programas de fortificação dirigidos ao combate de carências nutricionais específicas, como ferro, flúor, iodo e vitamina A, deveriam ter seu custo-benefício permanentemente avaliado. O monitoramento desses programas poderia evitar que os mesmos sofressem interrupções. A simples doação de alimentos deveria ficar restrita à situações emergênciais, devidamente comprovadas.

Seria interessante que se tentasse realizar uma avaliação com os dados disponíveis dos programas atualmente implementados no país, e que se tentasse elaborar um projeto nutricional, integrando áreas multidisciplinares, dirigidos principalmente aos grupos de risco como gestantes ,lactentes e pré-escolares , tendo a mulher como alvo, e

estruturado para atingir as áreas rurais de menor infraestrutura, onde o beneficiário pudesse ser avaliado, orientado e acompanhado.

Um avanço nesse sentido foi a recente aprovação da Política Nacional de Alimentação e Nutrição (BRASIL, 1999[b]), integrando o contexto de Segurança Alimentar como parte da Política Nacional de Saúde, com objetivos de :

- garantir a qualidade dos alimentos comercializados no país
- promover práticas alimentares saudáveis
- prevenir e controlar distúrbios nutricionais
- estimular ações intersetoriais que propiciem o acesso universal aos alimentos.

Para cumprir as diretrizes propostas nessa Política Nacional, será necessário uma ampla articulação intra e intersetorial, envolvendo vários órgãos (Ministérios da Agricultura, Educação, Trabalho, Relações Exteriores, Justiça, Desenvolvimento, Ciência e Tecnologia, representantes da sociedade civil, Comunidade Solidária e outros, cada qual com a sua responsabilidade, de forma que pelo menos as metas estabelecidas pelas Nações Unidas (FAO/OMS/UNICEF) para o ano 2.000 sejam alcançadas. Ressaltam-se nas diretrizes propostas por esta nova Política Nacional de Alimentação e Nutrição, o serviço de mapeamento das endêmias carenciais e a geração, coleta e análise dos dados, incluindo também aspectos macroeconômicos e sociais (BRASIL, 1999[b]).

Uma outra atitude política positiva parece ser da descentralização do Sistema Único de Saúde (SUS) possibilitando a implementação de programas como o "Atenção Básica", que se baseia num conjunto de ações, de caráter individual ou coletivo, situadas no primeiro nível de atenção dos sistemas de saúde, voltadas para a promoção da saúde, prevenção de agravos, tratamento e reabilitação, avançando num sistema de saúde dirigido à melhora da qualidade de vida das pessoas e de seu meio ambiente. O conjunto dessa ações envolve aspectos multidisciplinares (administrativos, médicos, odontológicos, nutricionais, psicológicos, sociais

e outros), com objetivos claros e bem equacionados, que devem ter seu impacto avaliado através de indicadores pré-definidos, estabelecendo uma troca entre recursos e resultados (BRASIL, 1999[a]).

Apesar da falta de informações necessárias a avaliação da eficiência dos Programas, profissionais de nutrição procuram elaborar cardápios compostos por vários tipos de alimentos, entre básicos e formulados, de acordo com os hábitos e disponibilidades regionais, buscando atingir a meta mínima proposta, em um contínuo esforço de superá-la da melhor forma possível.

Entre os alimentos formulados, o leite em pó flavorizado ou "mistura láctea" é um dos produtos mais utilizados em função principalmente de sua qualidade nutricional e excelente aceitabilidade, sendo os sabores chocolate, café com leite e morango os mais consumidos. Grande parte das Instituições Públicas de Ensino costuma oferecer, na entrada de cada turno, um copo com 200 ml de mistura láctea percapita/dia, geralmente acompanhados de pão com margarina ou biscoitos, como desjejum (Secretaria Municipal de Abastecimento. SEMAB/PMSP, 1996; Silva,1996). Outra razão que incentiva a introdução de "misturas lácteas" nos cardápios da Merenda Escolar é que trata-se de uma boa fonte de nutrientes como vitaminas, minerais, lipídios e principalmente proteínas de boa qualidade, isto é, elevado valor nutricional. O fornecimento dessa proteína é fundamental nessa fase de crescimento, uma vez que parte das crianças assistidas pelo Programa não tem acesso a outra fonte alimentar, principalmente adequada em relação a aminoácidos essenciais, cujo custo e disponibilidade são muitas vezes proibitivos à populações mais carentes (Ministério da Educação, 1996). Entretanto, a falta de parâmetros na avaliação da qualidade protéica tem limitado as formulações ao uso exclusivo do leite integral ou desnatado, impedindo desta maneira a utilização de outras proteínas alternativas que poderiam reduzir custos, mantendo as características nutricionais e sensoriais desses produtos.

2.3. Modelos de Complementação da Qualidade Protéica e a Otimização de Recursos Alternativos.

Proteínas são macronutrientes essenciais, presentes na composição de vários tipos de alimentos e que precisam ser ingeridos através da dieta para atender às funções básicas de manutenção e crescimento. Vários estudos tem sido desenvolvidos procurando substituir proteínas de origem animal por outras fontes protéicas de menor custo (Silva & Castro, 1992; Ellekjaer *et al.*, 1996). O interesse conjunto de pesquisadores, indústria e Governo na obtenção de alternativas alimentares é reforçado principalmente quando se trata do desenvolvimento de produtos que atendam à demandas institucionais.

Em relação ao aspecto nutricional, considera-se que a qualidade de uma proteína seja função de sua concentração fisiológicamente disponível de aminoácidos essenciais (Young & Pellet, 1991). Portanto, o valor nutritivo de uma proteína irá depender da sua capacidade em fornecer nitrogênio e aminoácidos essenciais nas quantidades adequadas às necessidades de cada organismo específico, com a finalidade de síntese protéica e manutenção da estrutura celular (Lajolo & Tirapegui, 1998).

Desde 1919, a "Razão de Eficiência Protéica (PER, relação entre o aumento de peso e a quantidade de proteína ingerida)", tem sido utilizado na avaliação da qualidade protéica. Porém, com o atual conhecimento sobre as necessidades humanas em relação à aminoácidos essenciais, as limitações do PER tornaram-se bastante evidentes. O método subestima o valor de proteínas vegetais (Henley & Kuster, 1994), principalmente àquelas deficientes em aminoácidos sulfurados, uma vez que os animais utilizados nos ensaios (ratos) tem necessidades relativamente maiores ($\approx$ 50%) para estes aminoácidos quando comparados com humanos (Sarwar *et al.*, 1985[a]; Young, 1995; McLarney *et al.*, 1996). O método PER apresenta alto custo e baixa reprodutibilidade, não havendo proporcionalidade entre os valores obtidos para diferentes fontes protéicas e sendo também incapaz de

obtidos para diferentes fontes protéicas e sendo também incapaz de computar adequadamente a proteína necessária à manutenção, além da inabilidade de ratos recém desmamados em metabolizar lactose (Food and Agriculture Organization - FAO/WHO, 1991; El & Kavas, 1996; Raiten *et al.*, 1998). Uma alternativa ao método PER, é o método "Net Protein Ratio - NPR" que credita a proteína utilizada tanto para crescimento como para manutenção, através da inclusão de um grupo experimental ingerindo dieta livre de proteína (Sarwar *et al.*, 1985).

Young & Pellet (1991), criticaram as propostas sugeridas pela "*Food and Drug Administration - FDA.*" que em 1990 recomendava a utilização do método "PER" com a caseína como padrão de referência para a rotulagem de alimentos . Além disso, a execução completa do método leva 28 dias e exige laboratórios estruturados com biotérios (Satterlee *et al.*, 1982), sendo portanto difícil de ser adotado como metodologia de rotina.

Em 1991 a FAO/WHO recomendou como metodologia para avaliação da qualidade protéica de alimentos o método do "Escore Químico corrigido pela Digestibilidade Real da Proteína", ou "Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score - PDCAAS", para o qual sugeriu-se como padrão de referência (exceto para alimentos substitutos do leite materno) as necessidades de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos. O método considera a capacidade da proteína em fornecer aminoácidos essenciais, nas quantidades necessárias ao organismo humano, para o crescimento e a manutenção (Wu *et al.*, 1995[a]; Sarwar, 1997; Raiten *et al.*, 1998).

Em 1993, a "FDA" finalmente reconheceu o "PDCAAS" como método mais apropriado para avaliar a qualidade protéica de alimentos, recomendando a inclusão deste valor na rotulagem dos mesmos (Henley & Kuster, 1994).

O perfil de aminoácidos essenciais de uma proteína pode ser determinado por técnicas de cromatografia de troca iônica, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta resolução, com especial atenção na

hidrólise das amostras (Marquez, 1996). Os resultados podem ser expressos em "mg de aminoácido/g de proteína ou nitrogênio", permitindo a utilização de fatores de conversão mais adequados e específicos à proteína avaliada (Wu *et al.*, 1995[b]).

O índice de digestibilidade utilizado para corrigir o "escore" pode ser obtido através de várias metodologias como ensaios biológicos (McDonough *et al.*, 1990[a]) e métodos "in vitro", como o "pH-stat" (Pedersen & Eggum, 1983; McDonough *et al.*, 1990[b]), que baseia-se no consumo de álcali provocado pela redução de pH, devido a liberação de prótons durante a ação de enzimas proteolíticas sobre as ligações peptídicas (El & Kavas, 1996; Linder *et al.*, 1997) ou o método conhecido por "Immobilized Digestibility Enzyme Assay- IDEA", que quantifica os grupamentos α-amino liberados pela proteólise enzimática, determinando diretamente o número de ligações peptídicas hidrolisadas (Porter *et al.*, 1984; Chang *et al.*, 1990).

Teóricamente, o "PDCAAS" parece ser o método mais adequado na avaliação da qualidade nutricional de proteínas, uma vez que avalia a capacidade da mesma de suprir as necessidades humanas em aminoácidos essenciais. Porém, apresenta algumas limitações como, a falta de padronização e reprodutibilidade na análise de aminoácidos sulfurados e triptofano (FAO/WHO, 1991), não detecção das formas D e L, e por considerar a digestibilidade total da protéina e não a disponibilidade individual de cada aminoácido (Wu *et al.*, 1996; Sarwar, 1997).

Portanto, recomenda-se que o método "PDCAAS" seja utilizado preferencialmente com proteínas adequadamente processadas, de elevada digestibilidade e que apresentem níveis mínimos de fatores antinutricionais (Sarwar, 1997).

Identificando-se o aminoácido limitante, o método PDCAAS proporciona informações sobre possíveis complementações com outras fontes protéicas (Young & Pellet, 1991).

De acordo com a qualidade nutricional, as proteínas podem ser classificadas como "*completas*", "*parcialmente incompletas*" e "*totalmente*

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

incompletas" dependendo da capacidade em fornecer aminoácidos essenciais ao organismo. Exemplos de proteínas "*completas* são àquelas derivadas preferencialmente de alimentos de origem animal como a carne, leite, ovos, peixes e aves, que apresentam todos os aminoácidos essenciais necessários ao homem em quantidades adequadas ao crescimento e manutenção. Proteínas *"parcialmente incompletas* são àquelas que fornecem aminoácidos essenciais em quantidade suficiente apenas à manutenção, como as proteínas de algumas leguminosas, oleaginosas e grãos. A gelatina e a zeína, são exemplos de proteínas *"totalmente incompletas",* que não fornecem aminoácidos essenciais em quantidade suficiente à manutenção e ao crescimento do organismo (Krause & Mahan,1991).

Estudos de vários autores demonstraram a possibilidade de sinergismo relacionada a qualidade nutricional de misturas protéicas, evidenciando principalmente a complementaridade de aminoácidos entre cereais e leguminosas (Sarwar & McDonough, 1990; Marchini *et al.*, 1994; Young & Pellet, 1994; Phillips, 1997; Faller *et al.*, 1999) ou entre proteínas vegetais e animais (Zarkadas *et al.*, 1993; Hernandez *et al.*, 1996). Misturas de soja com milho tem sido amplamente empregadas em programas de ajuda emergencial em vários países (Faller *et al.*, 1999). Técnicas de germinação e fermentação também tem sido desenvolvidas para melhorar a qualidade sensorial e nutricional de misturas entre cereais e leguminosas (Sanni *et al.*, 1999).

Embora as tabelas de recomendação para ingestão de nutrientes sejam expressas em valores diários, isto não implica que tais quantidades devam ser ingeridas a cada dia. Para um indivíduo adulto e sadio, basta que a quantidade média de aminoácidos essenciais seja consumida em um determinado intervalo de dias, de forma a manter um adequado estado nutricional protéico. Young & Pellet (1994) afirmam que em condições normais de saúde, não é necessário que proteínas complementares sejam ingeridas ao mesmo tempo, e que a separação das mesmas entre as

refeições num mesmo dia permite que os efeitos nutricionais da complementação sejam alcançados satisfatóriamente. Dados fisiológicos sustentam esta afirmação. A composição do "pool" de aminoácidos no espaço intracelular muda conforme a composição dos alimentos ingeridos durante um determinado período de tempo (horas), balanceando a oferta de aminoácidos essenciais para a síntese protéica. Desta forma, os autores concluem que não há necessidade de se balancear o perfil de aminoácidos a cada refeição, principalmente quando estes excedem quantitativamente as recomendações. Portanto, a complementação protéica pode ser alcançada entre as diferentes refeições diárias (Young & Pellet, 1994).

A maioria das pessoas ingere uma mistura de alimentos em uma refeição, geralmente combinando "*proteínas completas*", de elevada qualidade nutricional, com "*proteínas incompletas*", de menor qualidade nutricional, porém de ampla distribuição e economicamente mais acessíveis.

Em termos globais, as proteínas vegetais representam cerca de 65% da média total de proteínas consumidas. Estes valores elevam-se significativamente em países menos desenvolvidos (Young & Pellet, 1994).

A combinação de duas proteínas diferentes pode apresentar, segundo Bressani (1989) quatro tipos de resposta (Fig. 01).

Resposta Tipo I : resultado esperado para a mistura de duas proteínas deficientes no mesmo aminoácido essencial e na mesma proporção. Exemplo: mistura de farinha de milho com farinha de amendoim, sendo ambos deficientes em lisina além de outros aminoácidos.

Resposta Tipo II : resultado comum da mistura de duas proteínas com padrões de aminoácidos essenciais semelhantes, mas deficientes no mesmo aminoácido essencial mas em proporção diferente. Neste caso, há uma complementação do aminoácido limitante de uma para a outra até determinado nível, ou seja, ocorre uma "diluição" dos aminoácidos essenciais da proteína de melhor qualidade. Exemplo : mistura de farinha de milho com farinha de semente de algodão. Ambas são deficientes em lisina, porém a farinha de algodão é menos deficiente que a farinha de milho.

Resposta Tipo III : representa o efeito de sinergismo, quando a qualidade nutricional da mistura de duas diferentes proteínas é superior ao resultado de cada uma individualmente. Ocorre quando uma das proteínas apresenta concentrações elevadas do aminoácido limitante da outra de forma recíproca. Exemplos desse tipo de resposta são proporcionados, geralmente, pela mistura de cereais e leguminosas, como trigo e soja ou milho e soja.

Resposta Tipo IV : neste caso a qualidade nutricional das duas proteínas é significativamente diferente, sendo que uma das duas é deficiente em um aminoácido que a outra apresenta em elevada concentração. A linearidade da resposta pode ser devido tanto ao melhor balanço geral de aminoácidos como a mais alta disponibilidade destes. Uma mistura com proteínas derivadas de produtos cárneos e soja podem exemplificar este tipo de resposta.

Estas respostas foram determinadas através de bioensaios com ratos, mas alguns estudos com humanos utilizando soja e outra leguminosas tem confirmado a aplicabilidade destes conceitos na nutrição humana (Young & Pellet, 1994).

De uma forma geral, proteínas de menor qualidade nutricional estão mais disponíveis e apresentam custo inferior quando comparadas às proteínas de alta qualidade. Em função da possibilidade da ocorrência de efeitos sinergéticos na qualidade das misturas protéicas, muitos produtos alimentícios tem sido desenvolvidos buscando otimizar essa interação nutricional.

Friedman (1996) aponta três alternativas básicas para a melhora nutricional de proteínas: combinação de diversas fontes com adequado balanço aminoacídico, fortificação com aminoácidos limitantes e técnicas de biologia molecular para o melhoramento genético.

Bressani (1989) refere-se ao uso de técnicas de programação linear na otimização de misturas protéicas com base no perfil aminoacídico dos ingredientes utilizados, mas observa que a metodologia não considera a

respectiva disponibilidade, que poderia ser corrigida por um fator comum a todos os aminoácidos, como a digestibilidade total da proteína.

As principais limitações observadas nesses estudos estão relacionadas a fixação das proporções de cada componente no total da mistura, assim como o número de proteínas utilizadas (básicamente duas, ou pré-misturas fixas combinadas com outra fonte protéica alternativa). O tempo elevado necessário à execução de ensaios biológicos, assim como os recursos exigidos para a perfeita condução dos mesmos, parecem ter limitado a utilização de técnicas estatísticas que pudessem explorar todas as combinações possíveis e suas interações.

2.4. Avaliação Sensorial no Desenvolvimento de Produtos

Muito se tem discutido a respeito das propriedades sensoriais do alimentos e como avaliá-las adequadamente. Em 1981, o Institute of Food Technology (IFT) publicou diretrizes gerais para orientar os pesquisadores na seleção da metodologia para aplicação de testes sensoriais em função dos objetivos propostos.

Considera-se que hajam duas linhas básicas na condução de ensaios sensoriais: (1) Testes Afetivos para avaliação da aceitabilidade ou preferência; (2) Testes discriminativos para identificar diferenças entre atributos de vários produtos.

No primeiro caso, recomenda-se o uso de painéis formados por um número grande de provadores não treinados ($\geq$ 24), preferencialmente dentro do segmento que consome ou potencialmente consumidor do produto. Os questionários ou fichas de avaliação devem ser extremamente objetivos. Muita atenção deve ser dada ao tratamento estatístico dos resultados, uma vez que a variabilidade das respostas pode ser bastante elevada, exigindo o uso de modelos robustos para a análise de variância. No caso específico de aceitabilidade, o pesquisador também deve ter cuidado na expressão de valores médios que podem não corresponder ao

real grau de aceitabilidade do produto, lembrando-se sempre que trata-se da opinião pessoal de um segmento e portanto as extrapolações devem ser muito cuidadosas. Também neste caso, a utilização conjunta de técnicas multivariadas com indicadores sócio-demográficos, podem ser extremamente úteis na caracterização dos provadores, aumentando a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

No segundo caso, recomenda-se a utilização de painéis treinados compostos por 6 a 8 provadores (I.F.T,1981). A variabilidade destes painéis deve ser mínima, funcionando como instrumento na medida de caracteres sensoriais muito bem definidos. Portanto, o treinamento é parte fundamental para que o pesquisador obtenha resultados precisos, assim como, o estímulo que este painel deverá receber, de forma que o mesmo grupo realize todas as análises necessárias ao estudo.

Para reduzir a variabilidade em ensaios sensoriais vários fatores devem ser observados, como: seleção e desenvolvimento de um delineamento experimental adequado e viável, que evite a influência da ordem na apresentação das amostras (Stone & Sidel, 1993); limitação do número de amostras por sessão devido a fadiga sensorial; objetividade máxima que concentre a atenção do provador no objetivo real da avaliação; conforto, tranquilidade e individualidade no ambiente onde serão realizados os ensaios; padronização de volume e temperatura das amostras servidas e conscientização do provador com relação a importância da sua resposta para o teste.

Henika (1982) ressalta que ambos os testes (afetivos e discriminativos) sejam necessários na identificação da aceitabilidade de cada atributo avaliado, sugerindo que o painel treinado possa ser utilizado numa correlação de preferência, desde que se proceda a "diferenciação não significativa" das amostras com relação a um produto padrão préviamente testado e aprovado pelos consumidores.

Atualmente, tem-se empregado técnicas de análise multivariada que promovem a visualização gráfica da correlação entre as respostas obtidas

dos testes de aceitabilidade e discriminativos (Munõz & Chambers, 1993), facilitando a comunicação entre as áreas de "marketing" e "pesquisa e desenvolvimento " e, consequentemente, permitindo que decisões empíricas sejam substituídas por sistematização confiável, baseada no uso da tecnologia estatística para o planejamento e a análise das informações.

2.5. METODOLOGIA ESTATÍSTICA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EXPERIMENTOS COM MISTURAS

A Metodologia de Superfície de Resposta (ou RSM) é uma técnica baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida na década de 50, e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (Barros Neto *et al.*, 1995) . Seu direcionamento para experimentos com misturas remontam à mesma época, inclusive já com algumas aplicações em áreas biológicas (Cornell, 1990). Este método estatístico utiliza a modelagem empregando a técnica dos mínimos quadrados para a construção de modelos empíricos, geralmente lineares ou quadráticos, que descrevam o comportamento do processo em estudo com base em ensaios experimentais.

Os modelos definem relações quantitativas entre variáveis e respostas, cobrindo toda a faixa experimental testada, incluindo as interações quando presentes (Henika, 1982).

Um exemplo de aplicação dessa técnica esta no caso específico de experimentos com misturas onde supõe-se que um número $\boldsymbol{q}$ de ingredientes ($\mathbf{x}_i$) que as compõe sejam variáveis independentes, de tal modo que $\sum x_i = 1$. Portanto, neste caso, as respostas da mistura são determinadas pelas **proporções** mantidas entre as variáveis e não pela quantidade total de cada uma delas (Cornell,1990).

O sistema de coordenadas usado para os valores de x_i (i = 1,2,3,..., q) é chamado de sistema de coordenadas "simplex", e a descrição geométrica de representação espacial irá depender do número q de componentes,

podendo assumir a forma de uma reta para q = 2, triângulo equilátero para q = 3 ou tetraedro para q = 4 (Cornell, 1990).

As principais considerações relacionadas à exploração de superfícies de resposta sobre uma região *simplex* são : (1) escolha do modelo que aproxime a superfície sobre a região de interesse; (2) avaliação da adequação do modelo na representação da superfície de resposta e (3) seleção de um delineamento satisfatório para a coleta das informações, ajustando e testando a capacidade preditiva do modelo.

Finalmente, considera-se que exista uma relação funcional que teóricamente, descreva a superfície avaliada : $\eta = \varnothing (x_1, x_2, x_3,.....x_q)$. Esta função $\varnothing$ costuma ser aproximada por polinomiais de baixa ordem, que são mais fácilmente manuseados e contém um número menor de coeficientes a serem estimados (Cornell, 1990).

A forma geral da função de regressão de um polinômio de "n-ésimo" ordem, que pode ser ajustado aos dados experimentais nos pontos do *simplex* { q,m} é dado por :

$$\eta = \beta o + \sum \beta i\ xi + \sum\sum \beta ij\ xi.xj + \sum\sum\sum \beta ijk\ xi.xj.xk + ...,$$

no qual todos os termos de "n-ésimo" grau estão inclusos. Porém, como no caso das misturas tem-se $\sum x_i = 1$, pode-se multiplicar a identidade e agrupar os termos em x_i, adotando a forma polinomial canônica, que após as operações de simplificação pode ser expressa por:

$$\eta = \sum \beta i^*\ xi + \sum\sum \beta ij^*\ xij + \sum\sum\sum \beta ijk^*\ xijk + ..., \text{ onde } \beta i^* = \beta o + \beta i + \beta ii$$

e $\beta ij^* = \beta ij - \beta ii - \beta jj$

Portanto, um modelo com três componentes poderia ser descrito como:

$$\hat{y} = \beta^*1x1 + \beta^*2x2 + \beta^*3x3 + \beta^*12\ x1x2 + \beta^*13\ x1x3 + \beta^*23x2x3 + \beta^*123x1x2x3,$$

onde $\hat{y}$ = função resposta genérica, x_1, x_2 e x_3 são as variáveis independentes e β^*'s são os coeficientes que serão estimados a partir dos dados experimentais.

Essa equação simplificada possui sete coeficientes e, portanto, exige um número mínimo de sete ensaios experimentais para definir o modelo cúbico especial. Neste caso, o planejamento experimental normalmente empregado para determinar os valores dos coeficientes é conhecido como *simplex-centróide*, resultado do acréscimo de um ponto representando a mistura ternária ao planejamento simplex em rede (Barros Neto *et al.*, 1995). A otimização da resposta poderá então ser obtida por análise gráfica das curvas de nível ou por derivação da equação polinomial.

Vários autores tem utilizado a MSR e suas derivações como a modelagem de misturas em estudos de propriedades sensoriais, nutricionais e funcionais de alimentos (Silva & Castro, 1992; Toufeili *et al.*, 1994; Philipsen *et al.* ,1995 ; Troung *et al.*, 1995; Ellekjar *et al.*, 1996; Pastor *et al.*, 1996 ;Shirose & Mori, 1996; Guinard *et al.*, 1997; Iop *et al.*, 1999). Porém, quando aplicada na avaliação nutricional, ressalta-se a dificuldade de se propor modelos matemáticos com bioensaios (Buassi *et al.*, 1983; Buassi, 1987) apesar do seu potencial como método em estudos da qualidade nutricional de produtos alimentícios.

2.6. ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (ACP)

A Análise de Componente Principal (ACP) é um dos mais simples métodos de análise multivariada, tendo sido descrito inicialmente por Karl Pearson em 1901 (Mainly, 1990). Os objetivos básicos da utilização da ACP são:

- avaliar a semelhança entre observações (indivíduos, experimentos, etc) através de atributos pré-definidos, estabelecendo tipologia entre as unidades de observação;

- avaliar a relação existente entre as características consideradas, evidenciando uma tipologia de variáveis (Crivisqui, 1997), com o propósito de simplificação, classificação, correlação, predição e teste de hipóteses (Johnson & Wichern , 1982).

A ACP é utilizada para analisar as informações contidas numa Tabela de Dados do tipo "unidades de observação" e variáveis quantitativas, na qual dois indivíduos **i** e **j** são considerados mais semelhantes quanto maior for o número de valores similares apresentados no conjunto das variáveis. A comparação dos indivíduos **i** e **j** é avaliada com a distância euclideana clássica :

$d^2 (i, j) = \Sigma\, m_k (x_{ik} - x_{jk})^2$, onde as variáveis consideradas com a mesma importância têm $m_k = 1$.

Na ACP , a relação entre as variáveis **k** e **p** é avaliada através do coeficiente de correlação, e tendo os indivíduos a mesma importância (mesmo peso) , tem-se :

$$r (_{k,p}) = 1/n\, \Sigma ((x_{ik} - x_k)/Sx_k) * ((x_{ip} - x_p)/Sx_p)$$

que representa a covariância entre duas variáveis independentemente da unidade de medida, isto é, padroniza o valor de associação linear entre as variáveis, permitindo que a matriz de dados (originais) possa ser centrada e reduzida e que a semelhança entre duas observações seja independente das escalas de medida das variáveis.

A matriz de dados, centrada e reduzida, pode ser representada gráficamente em um espaço p-dimensional onde cada coordenada corresponde a uma variável (Scarminio, 1989). Porém, se o número de variáveis é maior que três, o estudo direto da distribuição das observações no espaço $p>3$ é impossível. Portanto, buscam-se imagens planas que representem "o melhor possível" a disposição dos pontos no espaço R_k. Essas direções privilegiadas são tais que :

- cada direção principal da série seja ortogonal às direções definidas anteriormente,

- cada direção principal maximize a inércia com respeito a origem da projeção da nuvem de pontos ,
- o plano definido maximize a inércia com respeito à origem da projeção da nuvem de pontos sobre esse plano.

Sendo assim, as direções principais são eixos que representam o melhor possível a variabilidade (diversidade) das observações e são as direções de máxima inércia.

Em relação ao espaço das variáveis, a ACP produz um resumo das variáveis originais, permitindo a representação plana aproximada destas e de seus respectivos ângulos. As coordenadas das variáveis centradas e reduzidas sobre o primeiro plano fatorial são as correlações das variáveis com as componentes principais, representadas gráficamente por vetores cujas extremidades se colocam sobre uma hiperesfera de raio unitário. Portanto, os indivíduos (observações) são representados por pontos. A proximidade entre dois pontos significa a semelhança dos valores das variáveis para esses indivíduos. As variáveis são representadas por vetores, e a qualidade de representação de uma variável é dada pela proximidade do extremo da mesma em relação ao círculo de raio unitário. A correlação entre duas variáveis é representada pelo ângulo que formam os vetores correspondentes (Crivisqui, 1997).

3. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi formular uma mistura protéica com três diferentes ingredientes, que pudesse substituir parcialmente a proteína do leite integral em formulações alimentícias de amplo consumo institucional, de forma a proporcionar uma redução de custos, otimizando suas propriedades sensoriais e nutricionais. Na elaboração da fórmula final foi utilizada a metodologia estatística de "Superfície de Resposta" com delineamento especial para misturas.

JUSTIFICATIVAS

As limitações apontadas no desenvolvimento de produtos, onde a análise de múltiplas variáveis deve ser simultânea, têm impulsionado muitas pesquisas no sentido de viabilizar metodologias que economizem tempo e recursos, mas que por outro lado, mantenham elevada correlação com as metodologias clássicas.

Com as propostas sugeridas neste estudo, espera-se ter condições de:

1°) Avaliar o resultado da interação de três diferentes ingredientes protéicos em relação a qualidade nutricional, abrangendo toda a faixa experimental de possibilidades de misturas, com apenas sete ensaios experimentais. Atualmente, a maioria dos ensaios apresenta-se restrita a combinações de duas proteínas em intervalos aleatóriamente limitados entre 0 e 100%.

2°) Avaliar o nível de correlação linear entre as variáveis "custo", "propriedades nutricionais e sensoriais", classificando as formulações propostas no delineamento experimental de acordo com o critério custo/qualidade.

3º) Modelar e otimizar simultâneamente vários parâmetros de uma formulação, em relação a redução de custos, qualidade nutricional e sensorial, de modo a encontrar uma "solução de compromisso", que satisfaça conjuntamente restrições impostas a todas variáveis estudadas.

4°) Viabilizar a adoção do PDCAAS como índice na avaliação da qualidade protéica em alimentos processados, como método alternativo àqueles baseados no crescimento em modelos experimentais.

4. METODOLOGIA

4.1. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

4.1.1. PRODUTO CONTROLE

Inicialmente, selecionamos um produto de fácil e rápido preparo, que pudesse exemplificar de forma adequada a proposta deste estudo. O produto selecionado foi uma mistura em pó para o preparo de bebida láctea. Em função da simplicidade da formulação, amplo consumo popular e grande aceitabilidade, optamos pelo sabor chocolate.

O desenvolvimento desta primeira formulação que denominaremos de *Produto Controle*, foi então baseado nas exigências nutricionais especificadas em editais públicos para aquisição do produto e distribuição nos programas institucionais. Adotando-se como padrão as exigências requeridas nos boletins técnicos (Fundação de Assistência ao Escolar, 1993), o *Produto Controle* deveria ser formulado apenas com leite em pó integral, cacau em pó solúvel, sal e açúcar; e apresentar em sua composição um valor mínimo de 13% para proteínas, 390 Kcal e um valor máximo de 14g de lipídios.

Portanto, o *Produto Controle* foi desenvolvido a partir da composição centesimal dos ingredientes. Desta forma, bastou misturar 48g de leite em pó integral, 46,7g de açúcar, 0,3g de sal e 5g de cacau em pó solúvel, para diluição em 400 ml de água.

O *Produto Controle* desenvolvido teve seu custo calculado em função dos preços e proporções usadas para cada ingrediente, respectivamente.

4.1.2. PRODUTO BASE

Como o objetivo deste estudo foi de reduzir o custo, avaliamos reformulações sobre o *Produto Controle* buscando substituir o ingrediente de maior participação na formação do custo (leite integral) por um

ingrediente veículo, como por exemplo, a malto-dextrina. Avaliamos a adição de substâncias espessantes e aromatizantes que poderiam contribuir para reduzir o impacto sensorial da redução proporcional do leite utilizado na mistura. Os lipídios foram restituídos ao produto através da adição de óleo vegetal.

Vários testes foram conduzidos até a obtenção de um produto com as seguintes características em relação ao *Produto Controle*: isocalórico, de menor custo, com menor teor protéico e de sabor agradável. Este produto denominamos de *Produto Base*.

O *Produto Base* foi inicialmente submetido a um teste de aceitabilidade com crianças, para certificar-se da sua qualidade sensorial comparada ao *Produto Controle*.

A importância de realizar este teste sensorial na primeira etapa é que tendo o *Produto Base* apresentado um bom nível de aceitação, pode-se adotá-lo como padrão de referência em relação ao sabor. Ao compará-lo com o *Produto Controle* garantiu-se maior rigor na adoção deste padrão. Uma vez definido um padrão, pode-se utilizar equipes sensoriais formados por provadores treinados para avaliar diferenças, e portanto, um número muito menor de provadores e amostras são necessários à avaliação dos ensaios previstos no delineamento experimental.

4.2. Seleção dos Ingredientes Protéicos

A partir da definição do *Produto Base* a proposta foi avaliar adequadamente, aspectos nutricionais, sensoriais e econômicos de matérias-primas alternativas à substituição parcial da proteína do leite integral. Desta forma, vários critérios foram utilizados para a seleção desses componentes, como a disponibilidade no mercado, garantia de qualidade físico-química, microscópica e microbiológica, independência de sazonalidade, forma física em pó refinado de fácil homogeneização, não predominância de sabores estranhos ou residuais, ausência de

propriedades funcionais incompatíveis com as características do produto, estabilidade e "custo econômico protéico" inferior ao "custo econômico protéico " do leite integral (aproximadamente R$ 13,10/Kg de proteína).

Vários insumos mostraram-se potencialmente interessantes como fontes protéicas alternativas, tais como : produtos derivados de soja como concentrados e isolados protéicos, farinhas de cereais, glúten de trigo, albuminas, farinhas e concentrados de peixes e aves, produtos derivados de colágeno e outros. Normalmente, são produtos processados térmicamente para inativação de fatores antinutricionais e sabores residuais e ainda para redução da flora microbiana. Apresentam-se, em geral, na forma física desidratada e alguns sofrem moagem criogênica para obtenção do pó.

4.3. Delineamento Experimental

A equação polinomial que descreve o modelo mais simples (linear) para três componentes pode ser representada por : $\mathbf{y_i = \beta o + \beta 1x1 + \beta 2x2 + \beta 3x3 + \varepsilon}$, onde $\mathbf{y_i}$ é o valor da propriedade de interesse, β**o** e β**i's** são os coeficientes do modelo a serem estimados pelo método dos mínimos quadrados, $\mathbf{x_i}$ representa as variáveis codificadas e ε é o erro aleatório.

As três variáveis (x_i) avaliadas neste estudo, (x_1) (x_2) e (x_3) mantém uma relação de dependência, onde $\sum x_i = 1$. Multiplicando-se β**o** pela identidade ($x_1+x_2+x_3$) e isolando-se as variáveis, tem-se a chamada equação polinomial canônica de Sheffé ou polinomial {q,m} onde q = número de componentes e m = grau da equação. Neste caso { 3,1} teremos: $\mathbf{y_i = b^*_1 x_1 + b^*_2 x_2 + b^*_3 x_3}$, onde $b^*_i = b_o + b_i$ (Barros Neto *et al.*, 1995).

Portanto, para a estimativa do valor dos coeficientes b^*_i são necessários pelo menos de três ensaios experimentais. Da mesma forma, para modelos mais complexos como o quadrático ou o cúbico especial, necessita-se de seis e sete ensaios, respectivamente. De uma forma geral, o emprego de técnicas de Superfície de Resposta, tanto para variáveis de misturas e não-misturas, permite que o pesquisador inicie com um modelo

complexo e siga simplificando, sem perda importante de informações, isto é, da qualidade de seu ajustamento (Cornell, 1990).

Estudos têm evidenciado a possibilidade de ocorrência de efeitos sinergéticos na qualidade nutricional de misturas protéicas (Bressani, 1989; Young & Pellet, 1994). Portanto, parece claro que uma relação linear seria por consequência descartada. Como a diferença nos termos do delineamento entre um modelo quadrático e um modelo cúbico especial é de apenas um ensaio experimental (Cornell, 1990), optou-se pela utilização de um planejamento experimental do tipo *simplex-centróide* (Fig.2), buscando-se posteriormente sua simplificação através de testes de significância para seus coeficientes.

Os componentes (x_1, x_2 e x_3) referem-se à proporção de proteínas provenientes das três diferentes fontes selecionadas, no total de proteína da mistura, variando-se cada uma de 0 a 100%.

4.4. Avaliação da Qualidade Protéica

4.4.1. Análise da Composição em Aminoácidos.

Para análise de aminoácidos , as amostras foram submetidas a uma hidrólise ácida com HCl 6N (5mg de nitrogênio/ml de HCl) por 22 horas a 110ºC em ampolas seladas à vácuo, de acordo com o procedimento originalmente descrito por Moore (1963). O HCl foi removido em dessecador à vácuo contendo pastilhas de NaOH e o resíduo seco ressuspendido em tampão citrato Na-S (Beckman) e filtrado em membrana com poros de 0,22μ.

Cistina e metionina, que são destruídas durante a hidrólise ácida, foram convertidas em derivados ácido-estáveis (ácido cistéico e metionina sulfona) através de oxidação com ácido perfórmico. As amostras oxidadas foram então hidrolisadas com HCl 6N como descrito acima.

Para a determinação do triptofano, hidrólise alcalina foi conduzida de acordo com Lucas and Sotelo (1980), utilizando-se NaOH 4,3N por 24 horas a 110°C.

As amostras foram analisadas por cromatografia de troca iônica pós-coluna com norleucina como padrão interno, utilizando-se sistema auto analisador Beckman modelo 6.300 (Beckman Instruments, Palo Alto). O teor de aminoácidos das misturas foi estimado a partir da composição de cada componente, supondo-se misturas homogêneas.

PREPARO DAS DIETAS

Para analisar os sete ensaios propostos pelo delineamento experimental, foram preparadas dietas nas quais uma quantidade suficiente de cada mistura, baseada no teor de nitrogênio, foi utilizada de forma a proporcionar um nível de 10% de proteína. As dietas foram preparadas segundo Reeves *et al.* (1993) para animais em crescimento. A composição nutricional das rações foi determinada segundo os procedimentos da AOAC (1980).

PROTOCOLO

Nove grupos experimentais (sete ensaios + grupo controle + grupo com dieta aprotéica) com seis ratos Wistar cada, machos , com 52g ± 4g, da mesma procedência foram acondicionados em gaiolas individuais, com temperatura controlada (22-25°C). Todos os animais receberam dietas "controle", formuladas com caseína suplementada com metionina, durante o período de aclimatação de 2 dias. Água e ração foram oferecidas *ad libitum.* As dietas foram pesadas e acondicionadas em recipientes de aço inoxidável, recolhidas, pesadas e substituídas diáriamente. Considerou-se um período preliminar de 4 dias, seguido de 5 dias como o período do balanço, resultando em um total de 9 dias de experimentação. Diáriamente,

as fezes e a dieta não ingerida foram coletadas para cada rato, desidratadas, pesadas e o teor de N analisado pelo método de MicroKjeldahl (AOAC,1980).

4.4.2. ANÁLISE DA DIGESTIBILIDADE *in vivo*

A digestibilidade protéica de todas as misturas foi determinada segundo método *in vivo* padronizado por McDonough *et al.* (1990[a]).

Digestibilidade Real

DR (%) = {[Ni - (Nf - Ne)]/Ni} * 100 , onde:

DR = Digestibilidade Real

Ni = Nitrogênio ingerido

Nf = Nitrogenio fecal

Ne = Nitrogênio endógeno fecal

Digestibilidade Aparente

DA (%) = {[Ni - (Nf]/Ni} * 100 , onde:

DA = Digestibilidade Aparente

4.3.3.CÁLCULO DO PDCAAS

O valor do PDCAAS para cada ensaio foi determinado conforme proposto pela FAO/WHO (1991) utilizando-se o padrão de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos e considerando-se os índices de digestibilidade real obtidos dos ensaios biológicos.

PDCAAS = {[(Teor de aminoácidos essenciais do substrato) / Padrão de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos (FAO/WHO,1991)]x DR}

4.4.4. Análise da Eficiência Líquida da Proteína (NPR)

O ganho de peso dos animais de todos os ensaios, do grupo controle e do grupo aprotéico, assim como a respectiva ingestão de proteína, foram acompanhados durante os dois dias de aclimatação e os nove dias de experimentação. O valor da taxa de utilização líquida da proteína foi calculada segundo Friedman (1996) :

NPR = [(Ganho de Peso + Perda de Peso do Grupo Aprotéico)/ Proteína consumida],

assumindo-se que a proteína necessária à prevenção da perda de peso de ratos submetidos a dieta aprotéica seja equivalente a proteína necessária à manutenção (Sarwar & Peace, 1994).

4.5. Avaliação Sensorial

4.5.1. Testes de Aceitabilidade Geral

Utilizou-se Escala Hedônica estruturada de cinco pontos, com 40 provadores não treinados (escolares de 7 a 14 anos), conforme recomendação do "Institute of Food Technologists I.F.T." (1981) segundo Morales (1994). Modelo da ficha de avaliação pode ser encontrado no Apêndice I.

4.5.2. Testes Analíticos Discriminativos

Utilizou-se o método de "Diferença Escalar do Controle" com Padrão interno e externo segundo I.F.T. (1981). A equipe sensorial foi composta por seis provadores treinados. O treinamento baseou-se no método simplificado proposto por Rutledge (1992) e as sessões foram conduzidas

em ambiente e horários adequados divididos em sete dias com quatro sessões por período.

Em cada avaliação, o provador procurou quantificar dentro de uma escala o grau de diferença de cada ensaio em relação ao Padrão externo, préviamente apresentado.

Os ensaios propostos pelo delineamento (1 a 7) e o Padrão interno (*Produto Base*) totalizaram oito amostras. Como a avaliação de oito amostras simultaneamente causaria fadiga sensorial dos provadores e consequentemente desvios de resultados, optou-se em dividi-las em grupos com três amostras no máximo. Cada grupo possibilitou seis combinações diferentes *de ordem* e cada provador recebeu uma ordem diferente.

Desta forma, todos os sete ensaios e o Padrão interno foram analisados por todos os provadores, em todas as combinações possíveis de apresentação, totalizando 21 repetições para cada ensaio/provador. O valor médio obtido de cada provador foi então utilizado na elaboração do modelo matemático. Modelo da ficha está representado no Apêndice II.

4.5.3. TESTES DE ACEITABILIDADE GERAL APLICADO AO PRODUTO "SC"

Uma "**S**olução de **C**ompromisso (SC)" para todas as respostas avaliadas foi selecionada e aplicada à mistura láctea. Este produto, designado neste estudo por "SC", foi submetido a um teste sensorial de aceitabilidade geral do tipo "sobra limpa" como recomendado pela FAE (Fundação de Assistência ao Escolar, 1993). Este teste consiste na relação entre a quantidade de produto rejeitada pela criança e a quantidade oferecida.

Os testes foram conduzidos com 103 crianças de 3 a 6 anos e 205 crianças de 11 a 15 anos de escolas públicas da rede municipal de ensino, que participam do Programa de Merenda Escolar (PNAE). O modelo da ficha pode ser visto no Apêndice IV.

4.6. Testes Estatísticos

Modelagem de misturas com três componentes foi desenvolvida, segundo Cornell (1990), utilizando-se um delineamento do tipo *simplex-centróide.*

Os coeficientes do modelo da regressão e a análise de variância (teste F) foram obtidos com o procedimento MIXREG (Barros Neto *et al.*; 1995). A apresentação gráfica foi elaborada através do programa Graphics Statistica (1995).

A análise estatística dos resultados dos demais ensaios foi processada por análise de variância (ANOVA) e teste de Tuckey para identificar os contrastes quando significativos (Gomes,1987; Bower, 1998). Adotou-se, préviamente, um valor α de 0,01 (1%) no teste de hipótese para todos os ensaios. A adequação dos modelos aos resultados experimentais foi avaliada em relação a falta de ajuste (teste F), análise gráfica dos resíduos e comparação entre os valores estimado e observado numa mistura selecionada, realizada após o ajuste do modelo.

Análise Multivariada (ACP) foi aplicada aos dados obtidos em todos os ensaios experimentais somados ao grupo controle e ao grupo que recebeu a mistura final selecionada em relação a todas as variáveis avaliadas neste estudo. Os dados foram organizados de forma matricial (Apêndice III) onde cada linha correspondia a uma formulação (unidade de observação) e cada coluna a uma variável. A matriz original foi centrada e reduzida e seus dados foram processados através do programa SPAD/ versão 3.5 (Crivisqui, 1997). O sistema de classificação hierárquica foi utilizado para classificar as formulações. A ACP foi obtida pela diagonalização do produto da matriz $X^t.X$, onde X é matriz autoescalonada e X^t sua transposta.

A aplicação da ACP aos dados experimentais devem proporcionar (1°) avaliação da semelhança das misturas através das características (*i*) sensoriais, definidas pela avaliação dos provadores, (*ii*) nutricionais,

definidas pelos métodos NPR e PDCAAS e (*iii*) econômicas, definidas pelo custo básico relativo de cada mistura protéica; (2°) projeção gráfica das formulações no espaço das variáveis (R^2) visualizando a relação "custo/qualidade" entre as mesmas e (3°) avaliação do nível de relação entre as variáveis observadas no conjunto de dados, isto é, sua representação no referencial das formulações.

5. Resultados e Discussão

5. 1 Desenvolvimento das formulações (Produto Controle e Produto Base)

A partir da composição centesimal dos ingredientes protéicos (Tabela 01), foi desenvolvida uma formulação em pó para o preparo de bebida láctea sabor chocolate de acordo com os parâmetros nutricionais recomendados nos boletins técnicos da Fundação de Assistência ao Escolar (1993).

Esta formulação, designada neste estudo como "Produto Controle", continha 48g de leite em pó integral, valor mínimo necessário à adequação aos parâmetros nutricionais adotados (Tabela 02).

Com o objetivo de reduzir custos, o leite integral foi gradativamente retirado da formulação. As características sensoriais do produto foram reestruturadas a partir da adição de agentes espessantes e aromatizantes naturais (amido de milho pré-gelatinizado, goma guar e aroma natural de baunilha). O teor de lipídios foi reposto através da adição de óleo de milho refinado, contribuindo também para reduzir a proporção de gorduras saturadas e colesterol. As formulações tiveram sua diluição padronizada em 1:4 (um quilo de mistura em pó para quatro litros de água fria), resultando em um valor per capita de aproximadamente 41g para porções de 200ml (1copo). Um carboidrato (malto-dextrina) foi utilizado como ingrediente na adequação porcentual das formulações (Tabela 02).

Vários testes foram conduzidos até a obtenção de uma mistura que apresentasse aspectos funcionais e sensoriais satisfatórios. Esta mistura, designada neste estudo como "Produto Base", foi então submetida a uma avaliação sensorial para aceitabilidade e adotada como padrão (Tabela 03).

A remoção de 41,67% dos sólidos de leite integral óbviamente conduziu a uma significativa redução de custos, da ordem de 26%. O teor protéico, porém, passou dos 13% recomendados como valor mínimo pela

FAE para apenas 8% (Tabela 03). Sendo assim, o objetivo a seguir foi de readequar o "Produto Base" em termos protéicos de forma quantitativa e qualitativa.

5. 2 Avaliação Sensorial do Produto Base

A Tabela 04 apresenta a análise de variância dos resultados obtidos pelo teste de aceitabilidade geral, no qual 40 crianças de 7 a 14 anos expressaram sua opinião em relação ao sabor dos produtos "Controle" e "Base" apresentados simultâneamente.

Não foi observada diferença significativa ($p<0,01$) entre o nível de aceitabilidade alcançado junto às crianças para ambos os produtos, sendo que os mesmos apresentaram escores elevados (3,95 ⇨ Produto Base e 3,75 ⇨ Produto Controle) correspondendo ao conceito "Muito Bom" (Apêndice I). O aumento do teor de açúcar, assim como a utilização de espessantes e aromatizantes naturais, pode ter contribuído para a boa aceitação do produto "Base" pelo público infantil. A partir deste resultado, adotou-se a formulação "Base" como padrão, e buscou-se a readequação protéica em termos sensoriais e nutricionais.

5. 3 Seleção dos Ingredientes Protéicos

Várias matérias-primas foram avaliadas com o objetivo de readequar o produto "Base" em relação ao teor protéico, buscando-se explorar a possibilidade de ocorrência de uma interação nutricional positiva entre proteínas derivadas de cereais e leguminosas, como já citado anteriormente por vários outros autores (Sarwar & McDonough, 1990; Marchini *et al.*, 1994; Young & Pellet, 1994; Phillips, 1997) ou entre proteínas animais e vegetais (Zarkadas *et al.*, 1993; Hernandez *et al.*, 1996).

Três substratos protéicos foram selecionados (Tabela 05) por atenderem a todos os requisitos préviamente estabelecidos na metodologia,

e ainda com um custo protéico inferior ao custo protéico de leite integral. Como a proporção de nitrogênio em cada tipo de molécula era variável, diferentes fatores de conversão foram adotados (Sgarbiere, 1997) para o cálculo da proteína. Os três ingredientes protéicos selecionados neste estudo foram: gelatina hidrolisada, glúten de trigo e isolado protéico de soja.

A gelatina é uma proteína obtida através da hidrólise parcial do colágeno natural, originado da pele e tecidos conectivos de gado. O comprimento da cadeia dependerá do grau de hidrólise e está diretamente relacionada a solubilidade. O colágeno apresenta elevado conteúdo de aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina e baixo nível de sulfurados e triptofano. A gelatina hidrolisada é obtida através do tratamento do colágeno com álcali, alterando suas propriedades funcionais como solubilidade, sem alterar sua composição de aminoácidos.

As proteínas do trigo são básicamente proteínas solúveis em soluções salinas (globulinas e albuminas) e proteínas de reserva. Estas últimas são a origem do glúten, o qual é separado da farinha de trigo por processos de lavagem, resultando num complexo *proteína-lipídio-carboidrato* com aproximadamente 75% de proteína. As proteínas do glúten representam 80% das proteínas totais dos grãos e dividem-se em duas classes: gliadinas e glutelinas, sendo ambas frações limitadas em lisina.

O isolado protéico é o produto de soja mais refinado disponível no mercado. A maior parte de suas proteínas é classificada como globulinas. O Isolado Protéico de Soja (IPS) é obtido a partir da farinha desengordurada, através da remoção das frações não protéicas por alcalinização seguida de centrifugação e posterior neutralização para torná-lo mais solúvel. O IPS apresenta teores mais baixos de lisina, aminoácidos sulfurados e triptofano que as farinhas ou concentrados, provávelmente porque as proteínas que permanecem no *soro* após o isolamento são mais ricas nesses aminoácidos (Giese, 1994; Sgarbiere, 1997).

5.4 Delineamento Experimental e Elaboração das Misturas

A partir do delineamento experimental proposto neste estudo (Fig.02), misturas contendo gelatina hidrolisada (GH), glúten de trigo (GT) e isolado protéico de soja (IPS) foram elaboradas, de forma que cada substrato contribuísse de 0 a 100% do total de proteína de cada ensaio (Tabela 06).

Com o objetivo de evitar qualquer variação quantitativa, estabeleceu-se a partir do substrato com menor teor de nitrogênio (GT) um valor de 12,80g de nitrogênio em cada 100g de mistura, equivalentes a cerca de 80% de proteína, utilizando-se malto-dextrina na padronização.

Desta forma, limitou-se a variação dos sete ensaios propostos no delineamento experimental únicamente à qualidade protéica, evitando-se a influência de outros fatores nos resultados obtidos. Sarwar (1996) criticou os dados apresentados por Hernandez *et al.*, (1996) em um estudo de avaliação da qualidade protéica de misturas, justamente pela não manutenção do mesmo nível protéico nas dietas utilizadas nos respectivos ensaios experimentais.

5. 5 Avaliação Sensorial das Misturas Protéicas

A Tabela 07 apresenta os resultados médios obtidos do teste de "Diferença Escalar do Controle" para as sete misturas protéicas e o controle. Pode-se observar a ocorrência de interações nas misturas de acordo com a definição de Cornell (1990). Porém, em termos sensoriais, nenhum valor alcançado nas interações foi superior àquele alcançado no ensaio 01 (Fig.03), no qual a gelatina hidrolisada respondia pela totalidade do teor protéico da mistura.

Os três substratos protéicos apresentaram completa solubilidade nas proporções e temperaturas avaliadas. A presença de glúten de trigo (GT) foi

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

descrita pelos provadores como "sabor vegetal estranho" e "textura levemente arenosa".

Esperava-se que o isolado protéico de soja (IPS) fosse o ingrediente mais percebido pelos provadores em função de suas características sensoriais. Faller *et al.* (1999) ressaltam a associação que os consumidores costumam fazer entre produtos com soja e baixa qualidade sensorial. Porém, isto não foi observado. Segundo Moraes (1998), é possível que novas tecnologias empregadas na elaboração dos derivados de soja estejam atualmente contribuindo para a redução de suas limitações sensoriais em produtos alimentícios para consumo humano.

Portanto, a gelatina hidrolisada apresentou-se como a melhor opção sob o aspecto estritamente sensorial à substituição da proteína do leite. A análise de variância (Tabela 08) demonstrou que o resultado sensorial da gelatina hidrolisada foi significativamente superior ($p<0,01$) àqueles apresentados pelos demais substratos, sinalizando para que novas pesquisas ampliem sua aplicabilidade em formulações alimentícias. Por outro lado, em função de sua baixa qualidade nutricional, decorrente da acentuada deficiência em aminoácidos essenciais, recomenda-se que a mesma não seja utilizada como única fonte protéica de um alimento, mas sempre em combinação com outras proteínas nutricionalmente complementares (Rozan *et al.*, 1997).

A análise de variância dos resultados sensoriais (Tabela 08) demonstrou também que não houve variação significativa ($p<0,01$) nas respostas entre os provadores, ocorrendo homogeneidade nos julgamentos, devido provávelmente ao prévio treinamento em relação ao produto. Entretanto, deve-se lembrar que, quando dados sensoriais são analisados por técnicas univariadas, o critério de avaliação adotado pelos provadores é por hipótese homogêneo (Pastor *et al.*, 1996).

5. 6 Estimativa dos Coeficientes para Regressão Sensorial (Y_1) e Análise de Variância

Todos os modelos de regressão (linear, quadrático e cúbico especial) mostraram-se altamente significativos ($p< 0,01$), com o valor de F calculado cerca de 16 vezes maior que o valor F tabelado. Portanto, para todos os modelos, rejeitamos a hipótese de nulidade($H_o = \beta_1 = \beta_2 = \beta_3$), demonstrando a dependência da resposta à variação da proporção dos ingredientes protéicos utilizados nas misturas.

Uma vez que a avaliação da falta de ajuste do modelo linear foi significativa, buscou-se então um modelo mais complexo, como da regressão quadrática, o qual incluísse os efeitos das interações binárias (β_{12}, β_{13} e β_{23}) na resposta.

$$\hat{Y}_1(x) = 6,08\, x_1 + 2,14\, x_2 + 4,70\, x_3 - 2,08\, x_1x_2 + 2,10\, x_1x_3 + 3,84 x_2x_3 \quad \text{Eq1}$$

$$(\pm 0,18)\ (\pm 0,18)\ \ (\pm 0,18)\ \ (\pm 0,83)\ \ (\pm 0,83)\ \ (\pm 0,83)^{*}$$

**erro padrão dos coeficientes*

onde $\hat{y}_{(1)}$ = estimativa do escore sensorial e x_i = proporção de cada proteína na mistura.

A Tabela 09 apresenta a análise de variância do modelo polinomial quadrático, ajustado aos dados experimentais obtidos do teste sensorial de Diferença Escalar do Controle. O modelo apresentou uma falta de ajuste não significativa ($p<0,01$), e seu coeficiente de determinação ($R^2 = 0,90$), o que de acordo com Henika (1982) e Cornell (1990) pode ser considerado adequado.

O máximo de variação explicável poderia ter sido alcançada com a adoção do modelo cúbico especial. A decisão sobre a escolha do modelo foi baseada na aplicação do teste F, onde F=[(SQ Reg. Cúb. - SQ Reg. Quad.)/ QM da Reg. Cúb.], comparando-se a redução da soma dos quadrados do resíduo por unidade de parâmetros adicionados com o quadrado médio do modelo contendo o maior número de parâmetros (Barros Neto *et al.*, 1995). Uma vez que este valor não foi significativo ($p<0,01$), concluí-se que um aumento do número de parâmetros não seria justificável.

Além disso, neste caso, a desvantagem da utilização de um modelo cúbico é que não restariam graus de liberdade suficientes para estimar a falta de ajuste e a análise estaria limitada à divisão da variação total em apenas duas parcelas, regressão e resíduo.

Ainda, de acordo com Barros Neto *et al.* (1995), para uma regressão significativa ser útil para finalidade preditiva, a relação [QM Reg/QM Res] deve ser maior do que 4 a 5 vezes o valor de F tabulado. Portanto, uma vez que esta condição é amplamente satisfeita pelo modelo polinomial quadrático, considera-se este como uma opção adequada a ser usado em simulação.

A Figura 04 apresenta o diagrama triangular com as curvas de nível obtidas a partir da substituição das variáveis x_1, x_2 e x_3 no modelo quadrático selecionado (Tabela 09).

A aplicação do teste paramétrico de Tukey aos resultados sensoriais (Tabela 08) demonstrou que as misturas 1, 5 e 7 não diferiam significativamente do controle ($p<0,01$). Desta forma, assumiu-se que os valores sensoriais a partir de 4,95 poderiam ser considerados satisfatórios na futura otimização por superposição gráfica, com as demais regressões ajustadas neste estudo.

5.7. Avaliação Nutricional de Misturas Protéicas, Estimativa dos Coeficientes para as Regressões Nutricionais (Y_2 e Y_3) e Análise de Variância

Na formulação e composição centesimal das rações empregadas nos ensaios biológicos para as avaliações de Digestibilidade e "Net Protein Ratio - NPR" (Tabelas 10 e 11) pode ser observado que, exceto a qualidade da proteína, todos os demais fatores relacionados à dieta foram mantidos constantes. É importante ressaltar que, especialmente no caso de ensaios com animais, é fundamental que seja isolado o efeito da variável que está sendo estudada. Caso contrário, erros aleatórios podem ser confundidos

com os valores dos efeitos e nenhuma função conseguirá descrever a relação entre o fator selecionado e a resposta avaliada.

Os valores obtidos na análise de digestibilidade (Tabela 12), entre todas as misturas propostas no delineamento experimental, concordam com aqueles observados na literatura (Pedersen & Eggum,1983; Sarwar & McDonough, 1990; Carias *et al.*, 1995). Raiten *et al.*(1998) reportaram que em fórmulas infantis, a digestibilidade real era cerca de 14% maior que a aparente. Neste estudo, verificou-se um valor um pouco menor para essa diferença (8%), refletindo talvez o ajuste do metabolismo e da excreção da proteína endógena em função dos diferentes tipos de proteínas avaliados.

O elevado índice de digestibilidade apresentado para gelatina (97,6%) deve-se justamente a sua forma hidrolisada. O Isolado Protéico de Soja (IPS) também apresentou elevada digestibilidade (94,8%), apesar de menor quando comparada aos demais ingredientes, possivelmente em função da presença de fatores antinutricionais ainda ativos após o processamento industrial na amostra avaliada neste estudo. Sarwar *et al.* (1999) sugerem que, pode haver uma significativa formação de lisinoalanina, um derivado de aminoácidos naturais, quando IPS é processado sob condições inadequadas de pH e temperatura, proporcionando uma redução na digestibilidade com consequente redução na qualidade protéica. Raiten *et al.* (1998) afirmaram que a digestibilidade pode ser influenciada pôr diferentes fatores relacionados a própria natureza da proteína (composição de aminoácidos), presença de compostos que modificariam o processo digestivo e reações químicas que poderiam alterar a liberação de aminoácidos das proteínas para os processos enzimáticos.

A recomendação da FAO/WHO (1991) para o cálculo da qualidade nutricional de misturas protéicas indica a utilização da média ponderal do valor da digestibilidade real na correção do escore químico. Hansen *et al.* (1991) consideraram boa a correlação (r=0,75) encontrada entre os valores de digestibilidade real calculada e observada para diferentes tipos de misturas. Os valores para digestibilidade real observada e calculada obtidos

neste estudo (Tabela 13) apresentaram um coeficiente de correlação de 0,84. Neste caso, a recomendação da FAO/WHO(1991) pode ser adotada sem qualquer prejuízo à estimativa da resposta.

Todas as misturas apresentaram elevada digestibilidade (acima de 95%). Mesmo na ausência de diferença significativa entre os valores calculados e observados (Tabela 14), pode-se verificar que os ensaios contendo IPS foram àqueles que apresentaram os maiores desvios. Pode-se sugerir que, fatores antinutricionais ainda presentes na amostra tenham influenciado esse aumento, e que portanto, a adoção de propriedades aditivas com outros tipos de proteínas, especialmente àquelas de menor digestibilidade, deva ser avaliada com atenção.

A composição de aminoácidos da gelatina hidrolisada (GH), glúten de trigo (GT), isolado protéico de soja (IPS), a recomendação adotada pela FAO/WHO (1991) para crianças de 2 a 5 anos e as necessidades de aminoácidos essenciais de ratos em crescimento, estão apresentados na Tabela 15. O coeficiente de variação médio entre todos os valores avaliados experimentalmente neste trabalho e aqueles apresentados por outros autores para proteínas semelhantes foi de 20% em média para GH, GT e IPS, incluídos todos aminoácidos (Sarwar *et al.*, 1986; Sarwar *et al.*, 1989; FAO/WHO, 1991; Young, 1991; Young & Pellet, 1994; Friedman, 1996; Sgarbiere, 1996; Zarkadas *et al.*, 1997; Linder *et al.*, 1997). Esta variação se reduz para 13% quando se excluem os valores de aminoácidos sulfurados e triptofano. Esses valores parecem adequados considerando que se tratam de variações entre laboratórios com amostras e procedimentos diferenciados.

A GH apresentou deficiência em todos os aminoácidos essenciais , enquanto o GT, como a maioria dos cereais, apresentou maior limitação principalmente de lisina, treonina e triptofano (Fig 5). Vários autores tem reportado a clássica deficiência de metionina e cisteina em leguminosas (Sexton *et al.*, 1998; Sanni *et al.*, 1999) entretanto, a amostra de IPS utilizada neste estudo não apresentou deficiência desses aminoácidos,

quando comparada ao padrão (FAO/WHO,1991), mas por outro lado, o teor de triptofano estava cerca de 23% abaixo dos valores médios referidos em outros estudos (Steinke *et al.*, 1980; Sarwar *et al.*, 1989; Young and Pellet, 1994; Young, 1991; Friedman, 1996; Zarkadas *et al.*, 1997). Essa variação pode ser consequencia da própria falta de padronização e reprodutibilidade na análise de aminoácidos sulfurados e triptofano (FAO/WHO, 1991, Sarwar, 1997), responsável também por variações nos resultados obtidos por diferentes autores. Sarwar *et al.* (1983) obtiveram um CV de 23% para o teor de triptofano de proteína de soja em um estudo colaborativo entre sete laboratórios analisando a mesma amostra.

O cálculo do PDCAAS (Tabela 16), representa a qualidade nutricional de proteínas destinadas ao consumo humano, e é dado pelo escore químico corrigido pela Digestibilidade Real. De acordo com Linder *et al.* (1997) o PDCAAS de gelatinas é praticamente nulo em função da ausência de triptofano em sua composição. Como será visto adiante, não houve crescimento entre os animais alimentados com a ração contendo GH como única fonte protéica. Sarwar & McDonough (1990) apontam um valor de PDCAAS para glúten de trigo (25) muito próximo do valor (23) verificado neste estudo.

Quanto ao PDCAAS do IPS, o valor (80) reflete a deficiência de triptofano encontrada na amostra utilizada neste trabalho. Como será confirmado adiante, animais alimentados com SPI como única fonte protéica tiveram um crescimento, avaliado através do NPR, significativamente inferior ao controle (caseína suplementada com metionina), porém é muito mais provável que essa diferença seja na verdade uma limitação de aminoácidos sulfurados. Pode-se observar na Tabela 15 que o IPS supre apenas 66% das necessidades dos ratos para esses aminoácidos. A qualidade nutricional de proteínas da soja são geralmente subestimadas em ensaios com ratos em função da maior necessidade destes em aminoácidos sulfurados. Porém esperava-se que o PDCAAS do IPS fosse maior que 100, como demonstrado por Young (1991). Em recentes estudos com animais

em crescimento, o valor nutricional protéico de isolado de soja tem-se apresentado inferior à caseína. Entretanto, em ensaios conduzidos com crianças e adultos, o isolado de soja adequadamente processado tem mostrado uma qualidade nutricional igual àquela apresentada por outras fontes protéicas de origem animal de boa qualidade. Estes resultados confirmam um PDCAAS maior que 100 para o isolado de soja (Young, 1995). Tais diferenças podem estar relacionadas às características particulares de processamento industrial da soja para obtenção da proteína isolada, às condições agronômicas da semente ou ainda à inerente variação dos ingredientes (Sarwar, 1996; Phillips, 1997). A proporção entre as proteínas de reserva da soja costuma ser usada como um indicador de qualidade, sendo que a fração 11S apresenta um valor nutricional superior a fração 7S (Sexton *et al.*, 1998). Entretanto, a hipótese da própria falta de padronização na análise de triptofano seja a mais provável razão dessa diferença.

Em relação as misturas, verificou-se que a complementação de aminoácidos essenciais resultou num pronunciado efeito sinergético, característico de respostas tipo III, entre GH e GT (Figura 07), onde a GH contribuiu para o maior teor de lisina do GT e este com todos os demais aminoácidos essenciais para a GH. Neste caso, a interações binária é bastante pronunciada porque, apesar da GH ser deficiente em todos os aminoácidos essenciais, a mesma completou o GT em seu primeiro aminoácido limitante, elevando a qualidade protéica da mistura. No ensaio contendo GH e IPS, houve uma diluição de aminoácidos essenciais do IPS para a GH. Na mistura entre GT e IPS não foi observado o efeito sinergético comum entre cereais e leguminosas, uma vez que não foi constatada nenhuma deficiência em aminoácidos sulfurados na amostra de IPS, e tanto esta como o GT apresentaram deficiência em triptofano. Portanto, observou-se apenas a complementação de lisina e triptofano do IPS para o GT e de aminoácidos sulfurados do GT para o IPS, estando porém a lisina e o triptofano abaixo do limite mínimo (FAO/WHO,1991). Para que fosse

verificado o sinergismo, o valor do PDCAAS da Mistura 06 (GT+IPS) deveria ser superior ao valor do PDCAAS de cada ingrediente isoladamente. Mesmo que o nível de triptofano do IPS fosse superior ao valor obtido experimentalmente neste estudo (68,75mg/gN), a qualidade protéica dessa mistura estaria limitada pelo escore referente a lisina (0,65). O mesmo ocorrendo na mistura ternária.

Com os resultado da Tabela 16, tem-se suficiente evidência para afirmar que um modelo linear não seria capaz de estimar adequadamente a resposta avaliada (PDCAAS) em cada combinação de proteínas. Desta forma, partiu-se diretamente para a proposta de um modelo quadrático, dado pela equação :

$$\hat{y}_{(2)} = 15{,}73\, x_1 + 22{,}72\, x_2 + 79{,}72 x_3 + 50{,}44 x_1x_2 - 2{,}44\, x_1x_3 + 41{,}51\, x_2x_3 \quad \text{Eq. 2}$$

onde $\hat{y}_{(2)}$ = estimativa do PDCAAS e x_i = proporção de cada proteína na mistura.

Procedendo-se à análise de variância (ANOVA) do modelo (Eq.2) concluiu-se que a falta de ajuste foi significativa ($p \leq 0{,}01$), o que sinaliza para um modelo mais complexo. Como tem-se o ensaio realizado no ponto centróide (1/3; 1/3; 1/3), pode-se optar para o modelo cúbico especial, representado pela seguinte equação ajustada:

$$\hat{y}_{(2)} = 15{,}62\, x_1 + 22{,}61\, x_2 + 79{,}60\, x_3 + 52{,}72\, x_1x_2 - 0{,}60\, x_1x_3 + 43{,}79\, x_2x_3 - 45{,}43\, x_1x_2x_3 \quad \text{Eq.3}$$

(± 0,36) (± 0,36) (± 0,36) (± 1,77) (± 1,77) (± 1,77) (±12,49) (*)

(*)erro padrão dos coeficientes

A análise dos resultados sugere a simplificação da Eq.3 através do teste de significância para os coeficientes. Assim, a exclusão do termo β_{13} vai liberar um grau de liberdade para a falta de ajuste (Eq.4).

$$\hat{y}_{(2)} = 15{,}62\, x_1 + 22{,}61\, x_2 + 79{,}60\, x_3 + 52{,}72\, x_1x_2 + 43{,}79\, x_2x_3 - 45{,}43\, x_1x_2x_3 \quad \text{Eq.4}$$

(± 0,29) (± 0,29) (± 0,29) (± 1,40) (± 1,40) (± 9,87) (*)

(*)erro padrão dos coeficientes

Com a falta de ajuste não significativa, pode-se utilizar o quadrado médio do resíduo como uma estimativa conjunta da variância e assim calcular-se o erro padrão do experimento como um todo. A análise dos

resíduos (Barros Neto *et al.*, 1995), embora não mostrada, confirma a boa adequação do modelo (Tabela 17).

O elevado coeficiente de determinação (R^2 = 0,99) significa que praticamente toda a variação do PDCAAS pode ser explicada pela regressão proposta (Eq.3). O valor de F calculado para testar a hipótese de nulidade foi muito significativo. Tratando-se de ensaios biológicos, um coeficiente de variação baixo (CV = 1,59%) parece mesmo improvável. Porém, é preciso lembrar que, no cálculo do PDCAAS, há uma relação entre dois termos: o escore químico (admitido como o menor valor da relação entre os aminoácidos essenciais da amostra e o padrão da FAO/WHO) e a digestibilidade real, que nos ensaios biológicos apresenta um desvio médio da ordem de apenas 1,5%. Ainda assim maior que àqueles reportados por McDonough *et al.* (1990[a]), da ordem de 0,9% para repetibilidade.

Além disso, como todos ensaios apresentaram valores relativamente elevados de digestibilidade real, acima de 95%, o PDCAAS acabou por refletir apenas as respectivas limitações em aminoácidos essenciais de cada mistura.

A Figura 06 apresenta as curvas de nível para as resposta estimadas na Eq.4. Os maiores valores de PDCAAS podem ser alcançados quando x_1 e x_2 (GH e GT) tendem a zero e x_3 (IPS) tende a 1. Desta forma, qualquer resposta pode ser estimada a partir da substituição dos valores proporcionais de GH, GT e IPS na Eq.4, sem necessidade de se proceder a nenhum ensaio biológico adicional.

Uma vez que a Digestibilidade Real dos três ingredientes protéicos utilizados neste estudo apresentaram propriedades aditivas, o cálculo do PDCAAS também pode ser obtido de acordo com a recomendação da FAO/WHO (1991).

Sendo assim, a aplicação de Metodologia de Superfície de Resposta para delineamentos com Misturas (MRSM) pode ser importante para: (I) estimar a qualidade nutricional através do PDCAAS de misturas protéicas. Deve ser observado que, embora o cálculo possa ser inteiramente

realizado através do método recomendado pela FAO/WHO (1991), a aplicação da Eq.4 é muito mais simples; (II) otimizar a resposta avaliada, isto é, identificar qual a proporção de componentes que resultará na melhor qualidade nutricional e (III) representar gráficamente a variação da qualidade nutricional de misturas com mais de dois componentes, em todas as proporções possíveis de combinação, incluindo os efeitos interativos, quando presentes. Trata-se sem dúvida, de uma ferramenta útil principalmente quando outras respostas são otimizadas simultâneamente.

A Tabela 18 apresenta o ganho de peso em relação ao consumo de proteína relativo aos sete ensaios propostos no delineamento experimental, acrescido de um grupo controle. Diferentemente do observado na avaliação da qualidade nutricional através do PDCAAS, uma forte interação binária foi verificada em todas as misturas (Figura 07). Portanto, descartou-se uma função linear como modelo entre as proporções de cada proteína utilizada nas misturas e sua qualidade nutricional, agora sendo avaliada através do NPR.

Desta forma, os dados da Tabela 18 foram utilizados para ajustar um modelo quadrático do tipo:

$$\hat{y}_{(3)} = 0{,}61\, x_1 + 1{,}33\, x_2 + 2{,}33\, x_3 + 4{,}63\, x_1x_2 + 1{,}82\, x_1x_3 + 4{,}48\, x_2x_3 \quad \text{Eq. 5}$$

(± 0,10) (± 0,10) (± 0,10) (± 0,47) (± 0,47) (± 0,47) (*)

(*)erro padrão dos coeficientes

onde $\hat{y}_{(3)}$ = estimativa do NPR e x_i = proporção de cada proteína na mistura (i = 1,2 e 3)

A análise de variância (ANOVA) para a Eq.5 demonstra que a falta de ajuste não foi significativa com a regressão significativa ($p \leq 0{,}01$) e que, portanto, o modelo acima proposto é adequado para descrever a função biológica avaliada (Tabela 17). Esta relação entre F calculado e F tabelado permite, também, que o mesmo seja utilizado para fins preditivos. O teste de significância para estimativa dos coeficientes (teste t) recomenda a manutenção de todos os parâmetros na Eq.5, embora a variação do termo β_{13} aproxime-se de zero. Em relação as dificuldades encontradas no ajuste

de modelos matemáticos com bioensaios pode-se afirmar que dois fatores fundamentais devem ser observados: a minimização do efeito de outras variáveis na resposta avaliada e a conveniente seleção da faixa experimental que será explorada para posterior modelagem e otimização. Diferente de medidas físicas ou químicas, bioensaios envolvem fatores de difícil controle, que podem limitar ou mesmo impedir a utilização de técnicas como a MSR em pesquisas nutricionais. Por outro lado, a utilização adequada dessa técnica estatística em modelos biológicos com mais de dois componentes é indiscutivelmente superior a qualquer modelo empírico. Por exemplo, no estudo conduzido por Marquez *et al.* (1992), os dezenove experimentos biológicos realizados para avaliar a qualidade proteíca de misturas de canola, soja e milho, poderiam ter sido reduzidos a apenas oito, sem qualquer prejuízo à qualidade de informação, incluindo ainda a visualização gráfica das respostas e a possibilidade de otimização da função desejada, no caso, o NPR das misturas.

As curvas de nível das respostas estimadas pela Eq.5 estão apresentadas na Figura 08. Elas são muito úteis na elaboração de misturas protéicas porque mostram todas as combinações possíveis entre os componentes avaliados que podem resultar na mesma resposta. Isto flexibiliza a competitividade do produto final sem alterar sua qualidade.

Os valores de NPR e PDCAAS obtidos nas misturas revelaram uma elevada associação positiva entre as duas medidas (r = 0,84). O mesmo índice de correlação (r=0,84) entre o PDCAAS e a avaliação biológica "Net Protein Utilization (NPU)" foi obtido em ensaios anteriores conduzidos com 71 tipos diferentes de proteínas (Sarwar *et al.*, 1985[b]). Em todas as misturas com IPS entretanto, a avaliação da qualidade nutricional através do PDCAAS não evidenciou totalmente o sinergismo demonstrado na avaliação com o NPR (Figura 07) e discutido em outros estudos, principalmente relacionadas à misturas entre cereais e leguminosas (Steinke *et al.*, 1980; Marchini *et al.*, 1994; Phillipps, 1997). Avaliando-se a Figura 05, pode-se notar que o IPS apresentou um teor de aminoácidos

essenciais superior àquele apresentado na GH e GT, exceto para os aminoácidos sulfurados, que não eram limitantes na amostra avaliada. Sendo assim, o sinergismo não pode ser explicado apenas pela complementação de aminoácidos. Sarwar & Peace (1994) verificando a adequacidade da qualidade protéica de dietas enterais em relação ao padrão FAO/WHO (1991), observaram resultados contraditórios, recomendando que especialmente quando se busca uma melhora de qualidade através de suplementação com aminoácidos, uma confirmação biológica deva sempre ser conduzida em conjunto.

Na realidade há muita controvérsia em relação a adoção do método PDCAAS ou da manutenção dos métodos biológicos para avaliação da qualidade protéica em alimentos. Alguns pesquisadores tem defendido uma posição mais conservadora enquanto outros tem incentivado a maior utilização do PDCAAS (Young, 1995; Sarwar, 1997). Estas posições tem sido debatidas nos últimos anos, em excelentes publicações, proporcionando aos demais pesquisadores a oportunidade de acompanhar uma séria discussão sobre um tema fundamental à nutrição humana.

Neste estudo buscou-se priorizar o método PDCAAS na avaliação da qualidade protéica das misturas, por entendê-lo como mais lógico e coerente frente às recentes pesquisas em termos das necessidades de aminoácidos essenciais em humanos. Entretanto, os resultados obtidos a partir da abordagem biológica revelaram interações não contempladas pelo PDCAAS, que neste caso específico são importantes, pois definem o sinergismo, interferindo, portanto, no processo de otimização.

Ressalte-se também que, ambas medidas de avaliação da qualidade protéica (PDCAAS e NPR) demonstraram que todas as misturas diferiram significativamente da qualidade nutricional do controle ($p<0,01$), lembrando-se que não foram conduzidos ensaios neste estudo utilizando apenas caseína sem complementação com metionina. Sugere-se que este resultado seja reflexo, principalmente, da composição de aminoácidos essenciais da amostra de IPS utilizada neste estudo, entretanto, mais pesquisas com

novas amostras de IPS devam ser conduzidas para que tais resultados sejam confirmados.

Portanto, uma das contribuições do emprego de Metodologia de Superfície de Resposta para Misturas (MRSM) em ensaios nutricionais, como a avaliação da qualidade protéica com três componentes é a possibilidade de representar gráficamente as curvas de nível obtidas a partir das respostas estimadas por um modelo matemático útil para fins preditivos.

5.8 Avaliação de Custo

A Tabela 19 apresenta o cálculo de custo aproximado para as misturas protéicas propostas no delineamento experimental. As curvas de nível geradas na Figura 09 foram obtidas a partir de um modelo cúbico especial apenas para facilitar a otimização gráfica integrada de todas as respostas.

Os preços dos ingredientes protéicos utilizados neste estudo foram obtidos com os respectivos fabricantes. Considerou-se um desconto de 18% referente ao imposto sobre circulação de mercadorias e serviços(ICMS) para todos ingredientes, exceto o leite integral e o óleo de milho refinado, para os quais empregou-se o valor de 7%, de acordo com a legislação tributária do Estado de São Paulo (Decreto 42656 de 19/12/97 art. 53).

5.9 Otimização Conjunta das Respostas

Alguns programas disponíveis para a elaboração das curvas de nível para as diferentes respostas avaliadas apresentam em um ponto o resultado da otimização individual para cada regressão. Algébricamente, o mesmo poderia ser obtido através de processos de derivação e, nos casos mais complexos, com o auxílio dos multiplicadores de Lagrange.

Uma forma alternativa de otimização, principalmente quando múltiplas respostas estão sendo avaliadas em conjunto, é a identificação gráfica através da sobreposição de uma "solução de compromisso" que satisfaça a

determinados critérios. No caso da resposta sensorial, estabeleceu-se que valores superiores a 4,95 (referente ao ensaio 7), poderiam ser adotados, uma vez que não foram observadas diferenças significativas ($p<0,01$) entre esses resultados e o "controle".

Em relação ao aspecto nutricional, todos os ensaios diferiram significativamente ($p<0,01$) do "controle". Portanto, buscou-se uma solução que maximizasse as propriedades nutricionais, ao menor custo, dentro do critério sensorial estabelecido.

Através da superposição dos diagramas triangulares gerados para cada resposta (sensorial, nutricional e econômica), estabeleceu-se uma "solução de compromisso" caracterizada por conter 25% da proteína fornecida pela gelatina hidrolisada (GH), 15% pelo glúten de trigo (GT) e 60% pela Isolado Protéico de Soja (IPS).

5.9.1 Validação

Essa mistura foi submetida a todas as avaliações de qualidade com ensaios biológicos, seguindo-se os mesmos procedimentos experimentais adotados na avaliação das misturas propostas no delineamento *simplex-centróide*.

Através da aplicação do teste Qui-quadrado (Bower, 1998), verificou-se que os valores observados experimentalmente não diferiram significativamente ($p<0,01$) dos valores estimados pelos respectivos modelos propostos neste estudo (Tabela 20).

5.10 Análise de Componente Principal

Todas as variáveis homogêneas (Apêndice III) foram eleitas como variáveis contínuas ativas da análise, exceto as três últimas (proporção de GH, GT e IPS) que não correspondiam a nenhuma avaliação de qualidade. Estas três variáveis são conceitualmente não homogêneas com o grupo das

variáveis ativas, uma vez que seus valores foram inferidos pelo delineamento experimental.

As variáveis ativas apresentavam unidades de medida diferentes, o que influia sobre o valor das variâncias das distribuições que também eram diferentes. Para neutralizar esse efeito, as comparações foram feitas a partir das variáveis centradas e reduzidas (autoescalonadas). Essa transformação dos dados criou uma matriz de inércia que nada mais é que a própria matriz de correlação entre as variáveis (Tabela 21).

O histograma dos autovalores (Fig.10) demonstra que o Primeiro Plano Fatorial foi responsável por 84,77% da inércia total, sendo que as formulações 1, 2 e Controle foram as que mais contribuíram para a inércia projetada sobre o Primeiro Plano.

A projeção dos vetores associados às variáveis (Fig.11) indica que os índices de qualidade nutricional (NPR e PDCAAS) estão fortemente correlacionados com o teor de aminoácidos essenciais, teor de serina e custo das misturas. A correlação do NPR é maior com o balanço de aminoácidos que o PDCAAS. Isto é, o vetor associado a variável NPR define ângulos menores com as variáveis teor de aminoácidos essenciais e serina, enquanto o vetor associado a variável PDCAAS define seu menor ângulo com a variável treonina . Ambas medidas de avaliação da qualidade nutricional (NPR, PDCAAS) definem ângulos pequenos e portanto estão fortemente correlacionadas com a variável custo e apresentam baixa correlação com a variável sensorial, formando com esta ângulos práticamente ortogonais.

As variáveis (Custo, NPR, PDCAAS, tre, ser, gli, leu, iso, val, met, tir, fen, his e trp) têm o extremo de seus respectivos vetores muito próximos ao círculo da hiperesfera de raio unitário, sugerindo uma boa representação destas no primeiro eixo fatorial. As demais variáveis (Sensorial, Asp, Ala, Cis, Lis, Glu e Arg) por sua vez, estão melhor representadas sobre o segundo eixo fatorial, apresentando também uma boa correlação com este eixo.

Em razão da estrutura das variáveis no Primeiro Plano Fatorial adotou-se duas orientações principais, tal como está representado no gráfico (Fig. 12) desse Plano no espaço das variáveis:

1ª Orientação ⇨ segue básicamente a direção dos vetores Qualidade Nutricional e Custos, significando que os pontos (formulações) localizados a esquerda, próximos a esta direção, devem ser àqueles que apresentam a melhor qualidade nutricional e os maiores custos. No outro extremo dessa direção (a direita) as formulações apresentam os menores custos e qualidade nutricional inferiores.

2ª Orientação ⇨ segue práticamente a direção do vetor sensorial. As fórmulas que se encontram próximas ao extremo superior e inferior dessa direção devem ser aquelas que apresentam melhor e pior qualidade sensorial respectivamente.

Buscando-se avaliar a semelhança entre as formulações sob o critério "custo/qualidade", utilizou-se uma classificação hierárquica (Fig.13). Através da observação do dendrograma (Fig. 14) foi proposta uma divisão das formulações em quatro classes básicas (Fig. 15) :

1ª Classe(11%)⇨ caracterizada por alta homogeneidade, alta qualidade sensorial, baixa qualidade nutricional e custo médio.

2ª Classe(11%)⇨ caracterizada por alta homogeneidade, baixa qualidade sensorial, baixa qualidade nutricional e baixo custo.

3ª Classe(66%)⇨ caracterizada por baixa homogeneidade, qualidade sensorial, qualidade nutricional e custo intermediários.

4ª Classe(11%)⇨ caracterizada por alta homogeneidade, alta qualidade sensorial, alta qualidade nutricional e alto custo.

Portanto, observa-se que a formulação "SC" selecionada para a elaboração da mistura láctea final , localizou-se no 3° quadrante no espaço das variáveis, inclusa nas classes que continham os valores intermediários de custo e qualidade sensorial e nutricional. Portanto, pode-se afirmar que a sobreposição das curvas de contorno para as três variáveis foi um critério adequado na identificação da mistura "SC".

A representação gráfica da nuvem de pontos (formulações) no espaço das variáveis foi bem definido em um Plano Fatorial, assim como das variáveis no referencial das formulações.

Observou-se, também, a elevada correlação linear entre as medidas de qualidade nutricional e os aminoácidos essenciais (exceto Cis e Lis), balanço de aminoácidos e teor de serina.

A projeção das variáveis ilustrativas sobre o espaço gerado pela variáveis ativas representou adequadamente a oposição entre a proporção de gelatina hidrolisada e o valor nutricional e a proporção de glúten e a qualidade sensorial.

A ACP evidenciou que o custo das formulações está correlacionado basicamente à qualidade nutricional das formulações e não à qualidade sensorial. Esta informação sugere que um cuidado especial deva ser considerado quando se avalia produtos destinados à alimentação escolar, onde a qualidade nutricional é fundamental para se alcançar as metas propostas nos respectivos programas. É bom lembrar que a fiscalização dos produtos adquiridos nos Programas de Merenda Escolar, quando é realizada, limita-se apenas aos aspectos nutricionais quantitativos.

5.11 Verificação e Validação da "Solução de Compromisso" à formulação alimentícia.

A mistura protéica otimizada (solução de compromisso) foi adicionada na quantidade de 6,14% à formulação do "produto base" de forma a conferir ao mesmo o teor de 13% de proteína. Efetuou-se, também, uma complementação do teor de cálcio através da adição de 0,7% de fosfato de cálcio dibásico.

A composição desta nova formulação, designada neste estudo como "Produto SC", contendo a mistura protéica em substituição parcial dos sólidos de leite integral, está apresentada na Tabela 22. O cálculo do

PDCAAS foi realizado com base no aminograma dos substratos protéicos acrescentados ao aminograma do leite e do cacau solúvel (Tabela 23).

AVALIAÇÃO SENSORIAL

Os resultados do teste sensorial "sobra limpa" adotado pela FAE para avaliar o nível de aceitabilidade dos produtos destinados aos Programas de Merenda Escolar (Fundação de Assistência ao Escolar, 1993) está apresentado no Apêndice IV. De acordo com essas especificações, o produto deveria apresentar uma aceitabilidade mínima de 85 %. Verificou-se que nas duas faixas etárias avaliadas, o produto "SC" alcançou 100% de aceitabilidade, não sendo observada devolução do mesmo. Portanto, a formulação desenvolvida neste estudo proporcionou uma redução de custo médio da ordem de 6,14%, atendendo os níveis de aceitabilidade especificados no mercado institucional, sem diferir nutricionalmente do produto "controle", formulado exclusivamente com o leite integral. Além disso, mostrou-se também como uma interessante opção em termos de redução de gorduras saturadas e colesterol.

Conclusões

A mistura protéica selecionada neste estudo como "solução de compromisso para a relação custo/qualidade", contendo 25% do total protéico derivado de GH, 15% de GT e 60% de IPS, foi adicionada a uma formulação em pó para o preparo de bebida láctea, resultando em um produto com qualidade sensorial e nutricional não diferente ($p<0,01$) do produto "Controle" formulado apenas leite em pó integral, a um custo médio 6% menor, significativo em termos absolutos, considerando-se os volumes comercializados no segmento institucional. Através do delineamento proposto para a aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta para Misturas foi possível explorar todas as interações nutricionais e sensoriais entre os três ingredientes protéicos de forma simultânea e contínua, realizando apenas sete ensaios experimentais. A Análise de Componente Principal (ACP) caracterizou o perfil "intermediário" na relação *custo/qualidade* da mistura selecionada como "solução de compromisso", decorrente da quase ortogonalidade entre os vetores *Sensorial* e *Nutricional*. Da mesma forma, sinalizou uma fraca correlação entre os vetores *Custo* e *Sensorial* ressaltando a importância de se analisar a qualidade da proteína em produtos destinados à Programas Institucionais. A ACP, também, evidenciou a boa correlação entre os métodos utilizados na avaliação da qualidade protéica, isto é, PDCAAS e NPR. Sendo assim, o método PDCAAS pode ser muito útil no desenvolvimento de formulações alimentícias onde a qualidade protéica seja fundamental, como dietas hospitalares e produtos

consumidos em programas de alimentação institucional. As metodologias estatísticas multivariadas utilizadas neste estudo demonstraram ser instrumentos extremamente úteis à escolha e otimização, bem como a visualização de fatores relacionados aos sistemas biológicos. Além de econômicos em termos de ensaios experimentais, a eficiência desses métodos é incomparável frente aos métodos empíricos normalmente utilizados. Espera-se portanto que, observadas determinadas limitações, este estudo possa efetivamente contribuir para que técnicas multivariadas sejam empregadas com maior frequência em avaliações biológicas.

TABELA 01: COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS PRINCIPAIS INGREDIENTES UTILIZADOS NA FORMULAÇÃO DO PRODUTO CONTROLE

Nutrientes [1]	**Leite em pó integral**	**Cacau em pó solúvel**
Umidade (g)	2,53 ± 0,04	4,42 ± 0,30
Nitrogênio (g)	3,94 ± 0,16	3,86 ± 0,14
Fator [2]	6,38	6,25
Proteínas (g)	25,14 ± 1,02	24,12 ± 0,87
Lipídios (g)	26,72 ± 1,79	19,42 ± 1,41
Cinzas (g)	5,51 ± 0,11	7,36 ± 0,09
Carboidratos [3] (g)	40,10	44,68

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=3)*
[2] *Sgarbieri (1997)*
[3] *Determinado por diferença.*

TABELA 02: INGREDIENTES DAS FORMULAÇÕES "CONTROLE" E "BASE"

Ingredientes *(g/100g)*	**Controle**	**Base**
Açúcar	46,75	50,00
Leite em pó	48,00	28,00
Malto-dextrina	-	8,41
Cacau solúvel	5,00	5,00
Sal	0,25	0,30
Espessantes naturais	-	3,26
Aromatizantes naturais	-	0,53
Óleo de milho refinado	-	4,50

TABELA 03: COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E CUSTO APROXIMADO DAS FORMULAÇÕES "CONTROLE" E "BASE" E AS ESPECIFICAÇÕES NUTRICIONAIS SEGUNDO OS BOLETINS DA FAE

Nutrientes[1]	Controle	Base	FAE[2]
Umidade (g)	1,47 ± 0,06	1,12 ± 0,06	< 5,00
Nitrogênio (g)	2,08 ± 0,01	1,28 ± 0,01	-
Fator	6,38	6,38	-
Proteínas (g)	13,27 ± 0,06	8,17 ± 0,06	> 13,00
Lipídios (g)	13,28 ± 0,16	13,46 ± 0,15	< 14,00
Cinzas (g)	3,27 ± 0,10	2,32 ± 0,09	< 4,50
Carboidratos[3] (g)	68,71	74,93	-
Calorias (kcal)	447,44	453,54	> 390,00
Custo[4] (R$/kg)	1,79	1,33	-

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=3)*
[2] *Fundação de Assistência ao Escolar (1993)*
[3] *Determinados por diferença*
[4] *Reais/kg de mistura em pó, com 1,0 US$ equivalente a R$1,95.*

TABELA 04: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS OBTIDOS DO TESTE SENSORIAL PARA ACEITABILIDADE GERAL ENTRE OS PRODUTOS "CONTROLE" E "BASE" COM PROVADORES NÃO TREINADOS

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Inferência
Tratamentos	1	0,61	0,61	0,20	(ns)
Provadores	39	45,39	1,16	0,38	(ns)
Resíduo	39	120,89	3,10	-	-

(ns) não significativo ao nível de 99% de probabilidade (p<0,01)

TABELA 05: COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E CUSTO PROTÉICO DOS TRÊS INGREDIENTES SELECIONADOS PARA A COMPOSIÇÃO DAS MISTURAS PROTÉICAS

Nutrientes[1]	Gelatina hidrolisada	Glúten de trigo	Isolado protéico soja
Nitrogênio (g)	16,89 ± 0,64	13,25 ± 0,54	14,92 ± 0,62
Fator[2]	5,55	5,70	6,25
Proteínas (g)	93,74 ± 3,55	75,52 ± 3,09	93,25 ± 3,85
Lipídios (g)	0,85 ± 0,15	0,45 ± 0,08	0,69 ±0,06
Cinzas (g)	0,84 ± 0,16	0,46 ± 0,10	4,01 ± 0,06
Carboidratos[4] (g)	-	16,32	-
Custo[3]	6,12	5,36	7,29

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=3)*
[2] *Sgarbieri (1997)*
[3] *R$/Kg (Reais/Kg de proteína). Custo protéico aproximado do leite integral ⇨ R$13,10/Kg (custo médio anual)*
[4] *Determinado por diferença.*

TABELA 06: PROPORÇÃO DE SÓLIDOS DE CADA SUBSTRATO UTILIZADOS NAS MISTURAS PROTÉICAS E TEOR DE NITROGÊNIO FINAL DE CADA ENSAIO

Ensaio	Gelatina (g)	Glúten (g)	Soja (g)	Dextrina (g)	Nitrogênio (g/100g)[1]
01	75,78	-	-	24,22	12,77 ± 0,32
02	-	96,60	-	3,40	12,82 ± 0,22
03	-	-	85,79	14,21	12,60 ± 0,19
04	37,89	48,30	-	13,81	13,02 ± 0,12
05	37,89	-	42,90	19,21	12,93 ± 0,12
06	-	48,30	42,90	8,80	12,68 ± 0,22
07	25,26	32,20	28,60	13,94	12,77 ± 0,12
Média	-	-	-	-	**12,80 ± 0,14**

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=3).*

TABELA 07: RESULTADOS DA ANÁLISE SENSORIAL COM TESTE DE DIFERENÇA ESCALAR DO CONTROLE PARA O DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *simplex-centróide*

Ensaio	Mistura protéica (GH, GT, IPS)	Resultado Sensorial[1]
01	(1,0,0)	6,10
02	(0,1,0)	2,17
03	(0,0,1)	4,73
04	(1/2, 1/2, 0)	3,49
05	(1/2, 0, 1/2)	5,82
06	(0, 1/2, 1/2)	4,28
07	(1/3, 1/3, 1/3)	4,95
08[2]	(0,0,0)	5,95

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=6 provadores)*
[2] *Produto Base formulado exclusivamente com leite em pó integral.*

TABELA 08: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS RESULTADOS OBTIDOS DO TESTE SENSORIAL DE "DIFERENÇA ESCALAR DO CONTROLE"

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Inferência
Tratamentos	7	77,29	11,04	52,87	*(**)*
Provadores	5	2,89	0,58	2,76	*(ns)*
Resíduo	35	7,31	0,21	-	-

(**) significativo ao nível de 99% de probabilidade (p<0,01)
(ns) não significativo ao nível de 99% de probabilidade (p<0,01)

Diferenças entre os ensaios	**1**	**5**	**8**	**7**	**3**	**6**	**4**	**2**
(p<0,01), para o teste de Tukey								

TABELA 09: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO AOS DADOS EXPERIMENTAIS

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Regressão	5	65,87	13,17	66,50 *(**)*
Resíduo	36	7,13	0,20	-
Falta de ajuste	1	0,46	0,46	2,42 *(ns)*
Erro puro	35	6,67	0,19	-
% da Variação explicada	90,23	-	-	-
% da variação explicável	91,86	-	-	-

(**) significativo ao nível de 99% de probabilidade (p<0,01)
(ns) não significativo ao nível de 99% de probabilidade (p<0,01)

TABELA 10 : FORMULAÇÃO DAS DIETAS (AIN/93G) [1]

Ingredientes (g)	Ensaios (1 - 7)	Controle	Aprotéica
Mistura Protéica	12,30	-	-
Caseína	-	11,50	-
DL-Metionina	-	0,30	-
Mistura Mineral	3,50	3,50	3,50
Mistura Vitamínica	1,00	1,00	1,00
Óleo de milho refinado	10,00	10,00	10,00
Celulose	5,00	5,00	5,00
Amido de milho	39,75	39,75	39,75
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25
Malto-dextrina	17,90	18,70	30,20
Antioxidante (BHA)	0,0014	0,0014	0,0014
Sacarose	10,00	10,00	10,00

[1] *Reeves et al. (1993)*

TABELA 11: COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

Nutrientes[1]	Ensaios (1 a 7)	Controle	Aprotéica
Umidade (g)	7,5 ± 0,6	7,1 ± 0,1	6,8 ± 0,1
Nitrogênio (g)	1,6[3] ± 0,1	1,7 ± 0,1	-
Proteínas (g)	10,1 ± 0,1	10,6 ± 0,1	-
Lipídios (g)	10,5 ± 0,5	10,0 ± 0,1	10,1 ± 0,1
Cinzas (g)	2,6 ± 0,3	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1
Carboidratos[2] (g)	69,9	69,8	80,6
Calorias (kcal)	412,1	411,8	413,6

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=3)*
[2] *Determinado por diferença*
[3] *As dietas foram formuladas para conter aproximadamente 1,6g de Nitrogênio. Quando analisadas, as dietas dos ensaios de 1 a 7 apresentaram respectivamente os seguintes valores para o Nitrogênio: 1.56, 1.51, 1.49, 1.56, 1.71, 1.68, e 1.74 . Valores experimentais, de acordo com método Microkeldahl (AOAC, 1980). Não foi observada diferença significativa (p<0,010).*

TABELA 12: DIGESTIBILIDADE APARENTE E REAL OBSERVADA PARA AS MISTURAS PROTÉICAS

Ensaios	Mistura protéica (GH, GT, IPS)	Digestibilidade Aparente[1](%)	Digestibilidade Real[1,2] (%)
01	(1,0,0)	90,5 ±1,7	97,6 ± 1,7 $_{ab}$
02	(0,1,0)	90,9 ± 1,3	98,3 ±1,3 $_{ab}$
03	(0,0,1)	87,3 ± 2,0	94,8 ± 2,0 $_{c}$
04	(1/2, 1/2, 0)	90,7 ± 1,4	97,9 ± 1,4 $_{ab}$
05	(1/2, 0, 1/2)	88,4 ± 0,8	94,9 ± 0,8 $_{c}$
06	(0, 1/2, 1/2)	88,8 ± 2,0	95,5 ± 2,0 $_{c}$
07	(1/3, 1/3, 1/3)	90,0 ± 1,3	96,4 ± 1,3 $_{ac}$
Controle[3]	(0, 0, 0)	91,1 ± 1,5	97,6 ± 1,5 $_{a}$

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=6 ratos/grupo)*
[2] *Valores com a mesma letra não diferem significativamente ($p \leq 0,01$)*
[3] *Caseína suplementada com metionina.*

TABELA 13: DIGESTIBILIDADE REAL OBSERVADA E CALCULADA PARA AS MISTURAS PROTÉICAS

Ensaios	Mistura protéica (GH, GT, IPS)	Digestibilidade Real Observada[1] (%)	Digestibilidade Real Calculada (%)
01	(1,0,0)	97,61 ± 1,69	-
02	(0,1,0)	98,29 ±1,27	-
03	(0,0,1)	94,77 ± 2,00	-
04	(½, ½ , 0)	97,86 ± 1,38	97,95
05	(½, 0, ½)	94,92 ± 0,82	96,19
06	(0, ½ , ½)	95,47 ± 2,01	96,53
07	(1/3, 1/3, 1/3)	96,39 ± 1,33	96,89

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=6 ratos/grupo).*

TABELA 14: ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE OS VALORES CALCULADOS E OBSERVADOS EXPERIMENTALMENTE PARA DIGESTIBILIDADE REAL[1]

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Inferência
Grupos (Obs x Calc)	1	0,70	0,70	3,54	*(ns)*
Repetições	4	6,49	1,62	8,22	*(ns)*
Resíduo	4	0,79	0,20	-	

(**) significativo ao nível de 99% de probabilidade (p<0,01)
(ns) não significativo ao nível de 99% de probabilidade (p<0,01).
[1] *Nesta tabela estão também inclusos os valores observados na formulação SC*

TABELA 15: COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS (mg/gN) DOS INGREDIENTES PROTÉICOS UTILIZADOS NAS FORMULAÇÕES COMPARADA ÀS NECESSIDADES DE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS PARA CRIANÇAS DE 2 A 5 ANOS (FAO/WHO; 1991)

Aminoácido[1]	GH	GT	IPS	FAO[2]	NRC[3]
Ac.Aspártico	455,7 ± 30,3	164,7 ± 5,6	677,5 ± 8,4	-	-
Treonina	108,2 ± 8,5	140,8 ± 4,0	209,4 ± 6,9	212,5	262,5
Serina	180,9 ± 13,4	249,1 ± 8,8	298,7 ± 25,2	-	-
Ac.Glutâmico	612,2 ± 38,0	2158,0 ± 87,2	1230,6 ± 11,4	-	-
Prolina	790,3 ± 57,9	690,8 ± 31,0	328,8 ± 5,5	-	-
Glicina	1378,6 ± 74,6	176,7 ± 5,2	243,1 ± 11,0	-	-
Alanina	536,1 ± 28,2	140,8 ± 2,6	253,1 ± 8,5	-	-
Valina	140,4 ± 3,2	213,2 ± 7,5	286,9 ± 2,5	218,7	312,5
Metionina	56,6 ± 4,4	108,3 ± 13,1	93,7 ± 16,2	-	-
Cistina	-	173,85 ± 21,7	112,5 ± 13,1	-	-
Isoleucina	84,9 ± 4,4	196,6 ± 12,5	282,5 ± 2,9	175,0	262,5
Leucina	167,6 ± 10,3	383,6 ± 6,4	485,0 ± 3,2	412,5	387,5
Tirosina	27,2 ± 4,7	169,9 ± 10,3	198,7 ± 8,9	-	-
Fenilalanina	98,2 ± 1,6	304,95 ± 12,4	337,5 ±13,6	-	-
Histidina	88,2 ± 2,2	137,4 ± 13,2	190,0 ± 14,6	118,7	-
Lisina	285,3 ± 31,0	83,2 ± 1,0	385,0 ± 10,5	362,5	362,5
Triptofano	11,1 ± 0,4	33,6 ± 0,4	57,5 ± 0,9	68,7	75,0
Arginina	528,9 ± 36,0	175,0 ± 4,7	471,2 ± 26,1	-	-
(Met+Cis)	56,6 ± 4,4	282,1 ± 34,8	206,2 ± 29,4	156,2	312,5
(Fen + Tir)	125,4 ± 6,3	474,8 ± 22,7	536,2 ± 22,5	393,7	418,7

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=3)*
[2] *Food and Agriculture Organisation & World Health Organisation (1991), para crianças de 2 a 5 anos*
[3] *NRC (1978). National Research Council. Nutrient Requirements of Laboratory Animals, 3rd Ed. NRC, National Academy of Sciences, Washington, DC. In: Sarwar et al. (1985 b).*

TABELA 16: CÁLCULO DO ESCORE DE AMINOÁCIDOS CORRIGIDO PELA DIGESTIBILIDADE REAL (PDCAAS) PARA AS MISTURAS PROTÉICAS

Ensaios	Mistura protéica (GH, GT, IPS)	Aminoácido limitante	Escore	Digestibilidade Real	PDCAAS[1,2]
01	(1,0,0)	triptofano	0,16	97,6	15,6 ± 0,3
02	(0,1,0)	lisina	0,23	98,3	22,6 ± 0,3
03	(0,0,1)	triptofano	0,84	94,8	79,6 ± 1,7
04	(1/2, 1/2, 0)	triptofano	0,33	97,9	32,3 ± 0,5
05	(1/2, 0, ½)	triptofano	0,50	94,9	47,5 ± 0,4 [a]
06	(0, 1/2, ½)	lisina	0,65	95,5	62,0 ± 1,3
07	(1/3, 1/3, 1/3)	triptofano	0,50	96,4	48,2 ± 0,7 [a]
Controle	(0, 0, 0) [3]	-	1,00	97,6	97,6 ± 1,5

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=6 ratos/grupo)*
[2] *Valores com a mesma letra não diferem significativamente ($p \leq 0,01$)*
[3] *Caseína suplementada com metionina.*

TABELA 17: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MODELO CÚBICO ESPECIAL SIMPLIFICADO AJUSTADO AOS DADOS EXPERIMENTAIS PARA A RESPOSTA PDCAAS (Y_2) E NPR (Y_3)

Causas da Variação	GL	PDCAAS	NPR
Regressão	5	18.150,39 (**)	22,92 (**)
Resíduo	36	17,63	2,28
Falta de ajuste	1	0,16 (ns)	0,00 (ns)
Erro puro	35	17,47	2,28
Variabilidade explicada (R^2)	-	99,90	90,95

(**) significativo ao nível de 99% de probabilidade ($p<0,01$)
(ns) não significativo ao nível de 99% de probabilidade ($p<0,01$).

TABELA 18: GANHO DE PESO, CONSUMO DE RAÇÃO, INGESTÃO DE PROTEÍNA E NPR DOS ENSAIOS EXPERIMENTAIS

Ensaios	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Dieta (g)	Ing. Protéica (g)	NPR [1,2,3]
1	51,9 ± 1,6	47,8 ± 1,0	46,8 ± 5,3	4,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1[a]
2	58,9 ± 8,8	60,9 ± 8,8	79,9 ± 9,8	6,9 ± 0,8	1,3 ± 0,2[b]
3	54,3 ± 9,4	63,4 ± 11,3	75,4 ± 18,9	7,0 ± 1,7	2,3 ± 0,3[c]
4	56,9 ± 1,9	61,2 ± 2,0	61,6 ± 9,7	5,4 ± 0,9	2,1 ± 0,1[c]
5	53,6 ± 2,2	57,8 ± 2,5	59,9 ± 9,6	6,0 ± 0,9	1,9 ± 0,3[c]
6	56,0 ± 3,3	69,7 ± 6,9	70,8 ± 16,2	7,1 ± 1,6	2,9 ± 0,2[d]
7	57,6 ± 4,3	69,7 ± 5,9	72,4 ± 14,6	7,3 ± 1,5	2,6 ± 0,4[cd]
Controle[4]	56,0 ± 5,1	80,4 ± 6,5	74,1 ± 7,8	7,8 ± 0,8	4,0 ± 0,2[e]

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=6 ratos/grupo)*
[2] *Valores com a mesma letra não diferem significativamente ($p \leq 0,01$)*
[3] *Perda de peso dos ratos alimentados com dieta aprotéica (7g), considerando-se o período de 9 dias.*
[4] *Caseína suplementada com metionina.*

TABELA 19: CUSTOS DAS MISTURAS PROTÉICAS PARA O DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *simplex-centróide*

Ensaio	Mistura protéica (GH, GT, IPS)	Custo [1]
01	(1,0,0)	5,75
02	(0,1,0)	4,93
03	(0,0,1)	7,47
04	(1/2, 1/2, 0)	5,34
05	(1/2, 0, 1/2)	6,61
06	(0, 1/2, 1/2)	6,20
07	(1/3, 1/3, 1/3)	6,05

[1] *Valores em Reais /Kg de mistura, sendo 1 US$ equivalente a R$1,95.*

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

TABELA 20: RESULTADOS OBTIDOS DE ENSAIOS BIOLÓGICOS E RESPOSTAS ESTIMADAS PELAS REGRESSÕES (EQ.4) E (EQ.5) PARA A MISTURA (x1=0,25; x2= 0,15; x3=0,60)

Avaliação Nutricional	**Mistura (** 0,25; 0,15; 0,60**)**
Digestibilidade Aparente[1](%)	88,5 ± 2,8
Digestibilidade Real[1](%)	96,2 ± 2,8
Aminoácido limitante	triptofano
Escore	0,62
PDCAAS[1,2]	59,67 ± 1,75 *(ns)*
PDCAAS - estimado pela regressão ([Eq.4])	59,95 *(ns)*
Peso Inicial (g) [1,3]	52,0 ± 2,8
Peso Final (g) [1,3]	61,8 ± 4,0
Dieta consumida (g) [1,3]	79,29 ± 18,0
Ingestão Protéica (g) [1,3]	6,4 ± 1,5
NPR[1,3]	2,65 ± 0,17 *(ns)*
NPR - estimado pela regressão ([Eq.5])	2,61 *(ns)*

[1] *Valores médio (n=6 ratos/grupo)*
[2] *Vem relação ao Padrão FAO/WHO (1991) para crianças de 2 a 5 anos.*
[3] *Considerando-se o período de 9 dias.*
(ns) não significativo ao nível de 99% de probabilidade (p<0,01).

TABELA 21 : MATRIZ DE CORRELAÇÕES UTILIZADA NA ACP[1]

	Sens	Custo	NPR	PDCA	Asp	Tre	Ser	Acglu	Pro	Gli	Ala	Val	Met	Cis	Iso	Leu	Tir	Fen	His	Lis	Trp	Arg	Es/N	Es/T
Senso	1,00																							
Custo	0,49	1,00																						
NPR	0,19	0,72	1,00																					
PDCA	0,35	0,82	0,85	1,00																				
Asp	0,70	0,38	0,26	0,59	1,00																			
Tre	0,30	0,93	0,82	0,94	0,41	1,00																		
Ser	0,15	0,83	0,83	0,92	0,29	0,98	1,00																	
Acglu	0,29	0,42	0,77	0,67	0,42	0,48	0,45	1,00																
Pro	-0,02	0,05	-0,24	-0,49	-0,65	-0,25	-0,26	-0,32	1,00															
Gli	0,38	-0,40	-0,65	-0,65	0,07	-0,68	-0,79	-0,28	0,43	1,00														
Ala	0,56	-0,25	-0,54	-0,46	0,30	-0,52	-0,66	-0,16	0,29	0,97	1,00													
Val	0,25	0,94	0,77	0,88	0,31	0,98	0,97	0,37	-0,14	-0,66	-0,52	1,00												
Met	0,03	0,86	0,74	0,71	-0,06	0,88	0,91	0,31	0,13	-0,71	-0,65	0,91	1,00											
Cis	-0,79	-0,43	0,04	-0,05	-0,40	-0,11	0,05	-0,09	-0,43	-0,65	-0,75	-0,13	-0,01	1,00										
Iso	0,08	0,76	0,81	0,93	0,35	0,94	0,97	0,47	-0,46	-0,86	-0,72	0,91	0,82	0,21	1,00									
Leu	0,04	0,79	0,82	0,90	0,24	0,95	0,99	0,44	-0,34	-0,87	-0,75	0,93	0,89	0,20	0,99	1,00								
Tir	0,06	0,86	0,81	0,85	0,12	0,95	0,99	0,39	-0,13	-0,81	-0,71	0,96	0,97	0,08	0,94	0,97	1,00							
Fen	-0,27	0,46	0,69	0,75	0,10	0,74	0,83	0,35	-0,54	-0,99	-0,92	0,71	0,69	0,58	0,92	0,91	0,82	1,00						
His	0,06	0,62	0,75	0,92	0,46	0,86	0,89	0,48	-0,66	-0,85	-0,70	0,80	0,66	0,31	0,97	0,93	0,83	0,93	1,00					
Lis	0,75	0,88	0,58	0,80	0,75	0,80	0,68	0,47	-0,19	-0,13	0,09	0,76	0,53	-0,62	0,61	0,59	0,60	0,25	0,56	1,00				
Trp	0,19	0,86	0,83	0,95	0,37	0,99	1,00	0,48	-0,34	-0,78	-0,64	0,96	0,87	0,05	0,98	0,99	0,97	0,84	0,92	0,71	1,00			
Arg	0,58	-0,25	-0,37	-0,15	0,70	-0,34	-0,48	0,04	-0,31	0,70	0,82	-0,41	-0,71	-0,50	-0,42	-0,53	-0,61	-0,58	-0,29	0,23	-0,41	1,00		
Es/Nes	0,09	0,75	0,80	0,94	0,40	0,94	0,96	0,48	-0,50	-0,83	-0,69	0,91	0,78	0,19	0,99	0,98	0,91	0,90	0,97	0,64	0,98	-0,37	1,00	
Es/Tot	0,11	0,76	0,88	0,93	0,33	0,92	0,94	0,61	-0,40	-0,80	-0,67	0,87	0,81	0,15	0,95	0,95	0,91	0,85	0,91	0,62	0,95	-0,41	0,94	1,00

[1] *Significativo quando o Valor teste > 1,96*

TABELA 22: COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E ESTIMATIVA DE CUSTO DAS FORMULAÇÕES "CONTROLE" E " SC" E AS ESPECIFICAÇÕES NUTRICIONAIS SEGUNDO OS BOLETINS DA FAE

Nutrientes	Controle	SC	FAE
Umidade[1] (g)	1,5 ± 0,1	2,3 ± 0,0	< 5,0
Nitrogênio[1] (g)	2,1 ± 0,0	2,2 ± 0,1	-
Fator[2]	6,38	5,99	-
Proteínas[1] (g)	13,27 ± 0,06	13,1 ± 0,8	> 13,0
PDCAAS[6]	92,21	91,54	-
Lipídios[1] (g)	13,3 ± 0,2	13,4 ± 0,2	< 14,0
Cinzas[1] (g)	3,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	< 4,5
Cálcio[3] (mg)	447,0	484,2	-
Fósforo[3] (mg)	373,8	377,6	-
Carboidratos[4] (g)	68,7	68,9	-
Calorias (kcal)	447,4	448,9	> 390,0
Custo[5] (R$/kg)	1,79	1,68	-

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=3).*
[2] *Composição média para o fator de correção.*
[3] *Valores calculados.*
[4] *Determinado por diferença.*
[5] *Reais/ kg de mistura láctea em pó.*
[6] *Os valores do PDCAAS Controle e SC não diferiram significativamente (p<0,01).*

TABELA 23: COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS (mg/gN) DOS INGREDIENTES PROTÉICOS COMPLEMENTARES, UTILIZADOS PARA O CÁLCULO DO PDCAAS DAS FORMULAÇÕES "CONTROLE" E "SC"

Aminoácidos [1]	Leite	Cacau
Ác. Aspártico	454,3 ± 7,8	708,1 ± 3,7
Treonina	253,9 ± 10,3	277,5 ± 2,3
Serina	301,8 ± 8,4	319,4 ± 2,4
Ác. Glutâmico	1336,6 ± 34,4	1113,1 ± 5,6
Prolina	619,5 ± 26,3	303,7 ± 6,2
Glicina	128,9 ± 9,3	303,1 ± 0,8
Alanina	202,9 ± 8,9	291,9 ± 0,3
Valina	385,4 ± 5,2	378,1 ± 1,7
Metionina	199,7 ± 24,2	142,5 ± 3,1
Cistina	82,9 ± 11,5	215,0 ± 5,6
Isoleucina	306,9 ± 15,7	231,2 ± 0,5
Leucina	589,5 ± 5,5	413,7 ± 2,1
Tirosina	249,5 ± 0,2	190,0 ± 2,9
Fenilalanina	292,2 ± 11,2	311,9 ± 1,2
Histidina	173,5 ± 15,0	111,9 ±1,5
Lisina	466,4 ± 4,8	261,3 ± 3,1
Triptofano	65,7 ± 5,7	151,9 ± 3,7
Arginina	269,2 ± 4,1	518,7 ± 102,7
(Met+Cis)	282,6 ± 35,7	357,5 ± 8,8
(Fen + Tir)	541,7 ± 11,4	501,9 ± 4,1

[1] *Valores médios ± desvio padrão (n=3)*

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

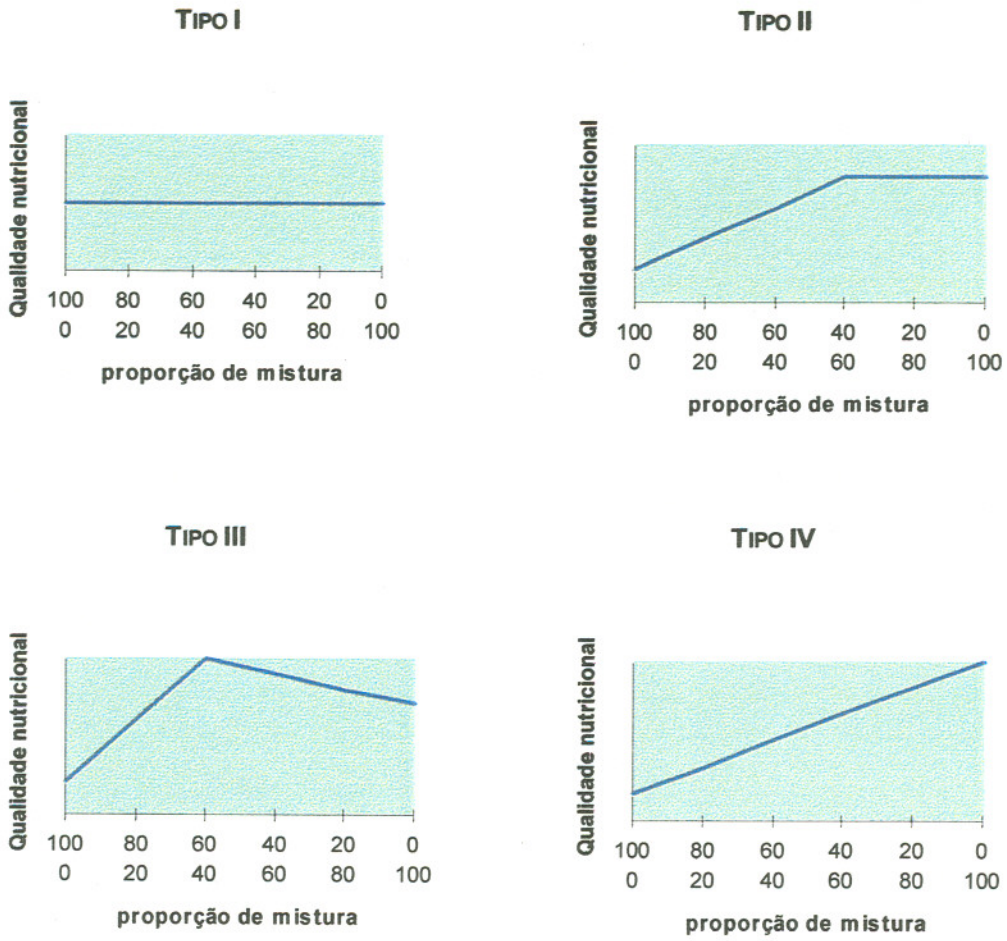
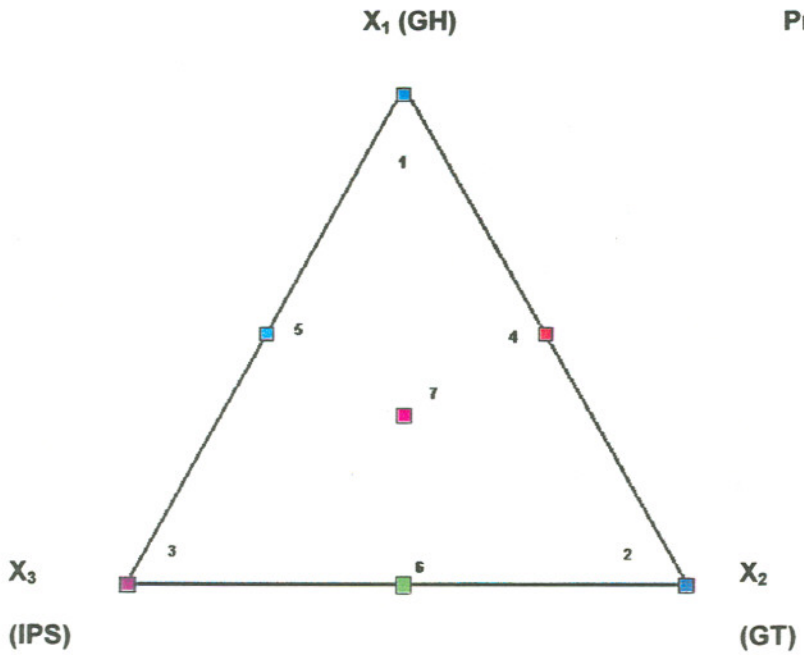


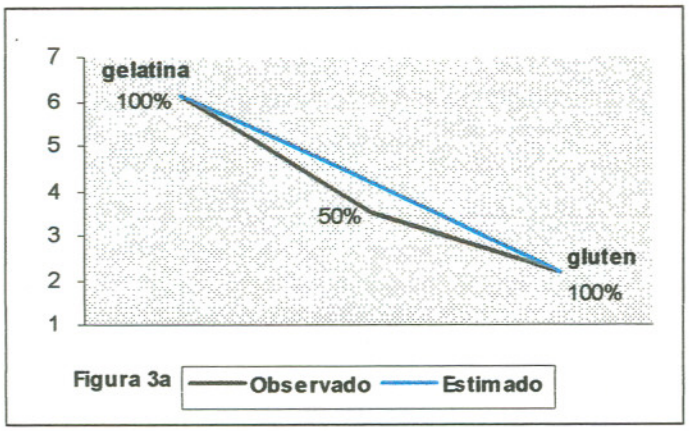
Figura 01 : Tipos de respostas, avaliadas em termos de um índice biológico de avaliação da qualidade protéica, obtidas a partir da mistura de duas proteínas alimentares. Adapatado de Bressani *et al.* (1989).

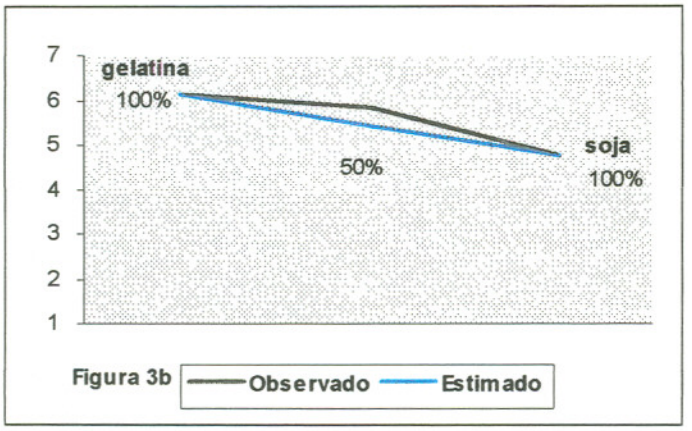


Proporção de proteínas na mistura

	x1	x2	x3
01	1,00	0,00	0,00
02	0,00	1,00	0,00
03	0,00	0,00	1,00
04	0,50	0,50	0,00
05	0,50	0,00	0,50
06	0,00	0,50	0,50
07	0,33	0,33	0,33

FIGURA 02 : Delineamento experimental (*simplex-centróide*) .





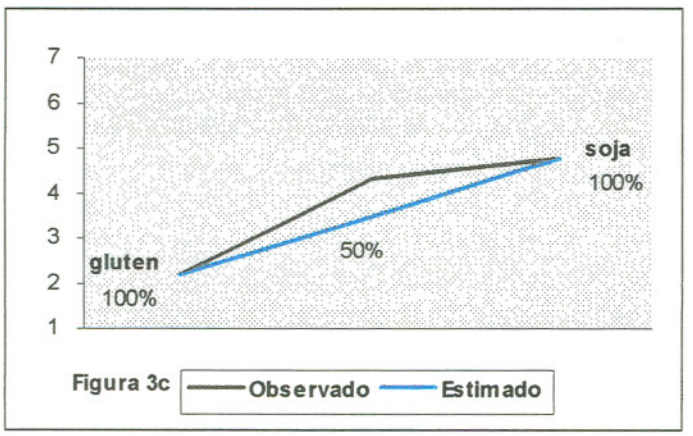


FIGURA 03 : Interações sensoriais binárias: a ⇨ gelatina-glúten, b⇨ gelatina-soja e c ⇨ glúten-soja. Valores observados experimentalmente e valores estimados por regressão linear.

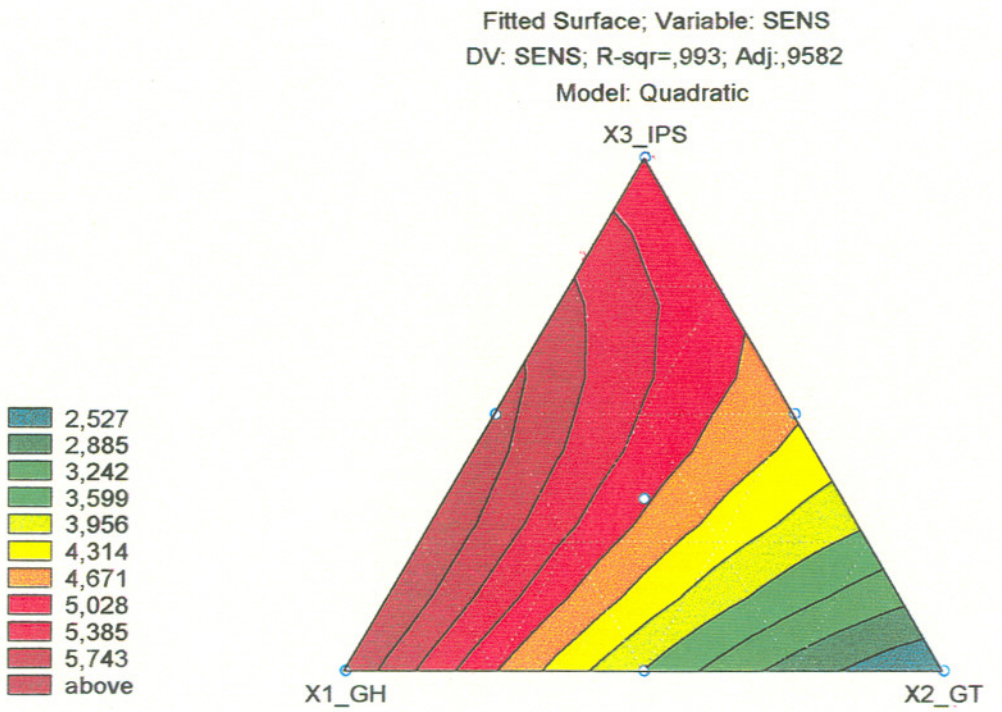


FIGURA 04 : Curvas de nível para resposta sensorial.

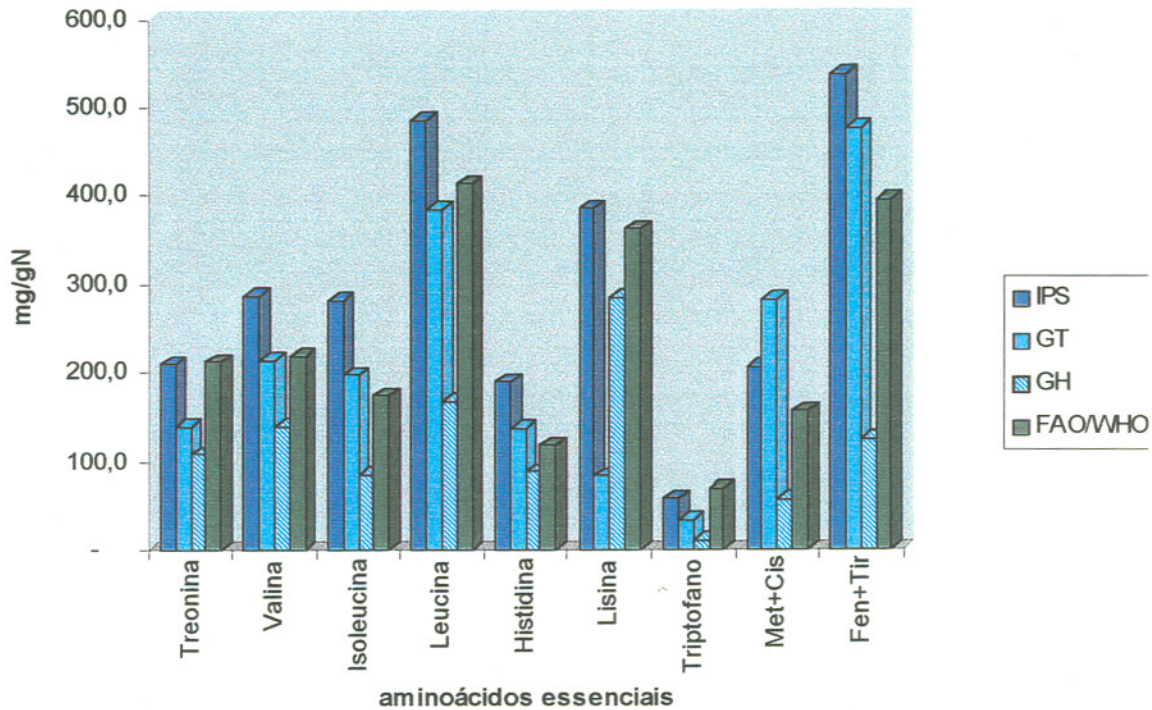


FIGURA 05: Perfil de aminoácidos essenciais dos ingredientes protéicos comparados ao padrão FAO/WHO (1991).

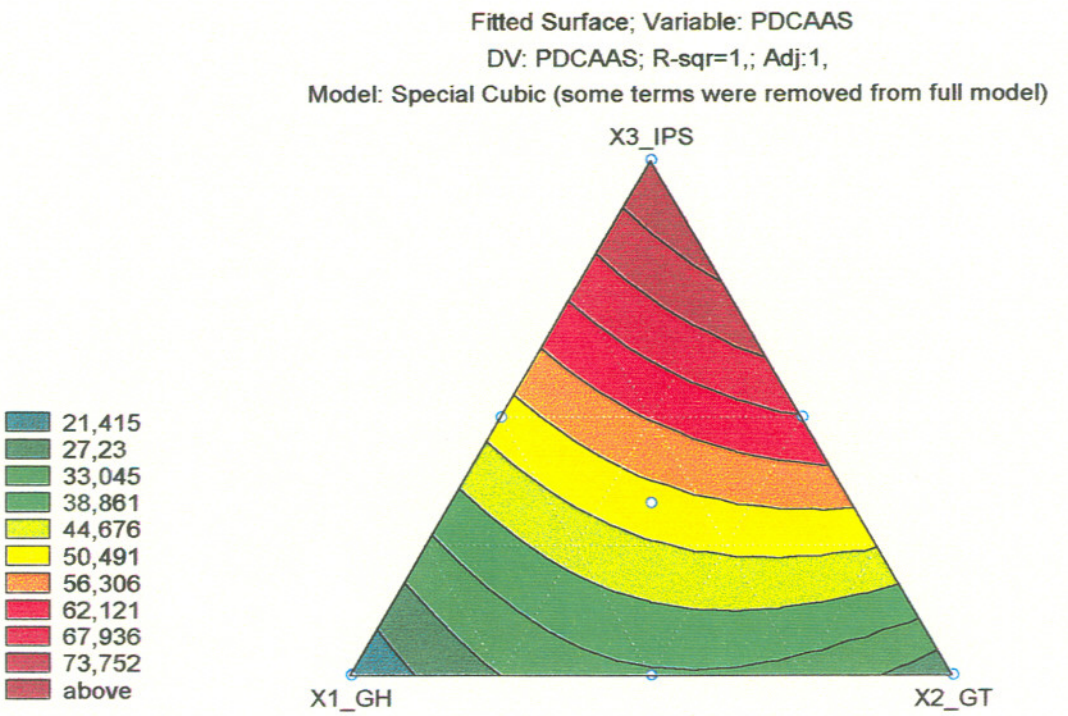


FIGURA 06 : Curvas de nível para a resposta PDCAAS.

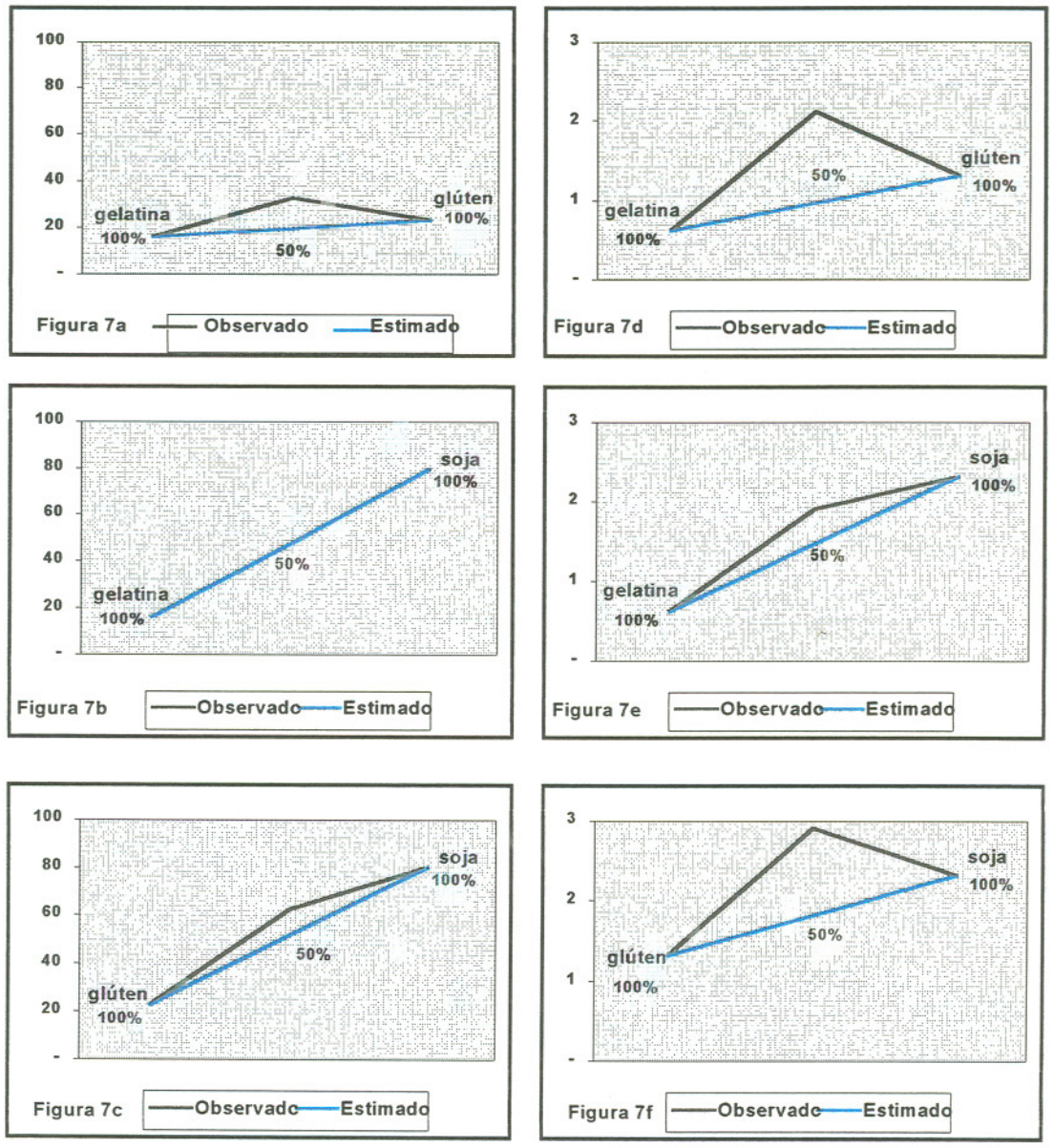


Figura 07: Interações binárias para as respostas nutricionais avaliadas através dos métodos **PDCAAS** (a ⇨ gelatina e glúten; b ⇨ gelatina e soja e c⇨ glúten e soja) e **NPR** (d ⇨ gelatina e glúten, e ⇨ gelatina e soja e f⇨ glúten e soja). Valores observados experimentalmente e valores estimados por regressão linear.

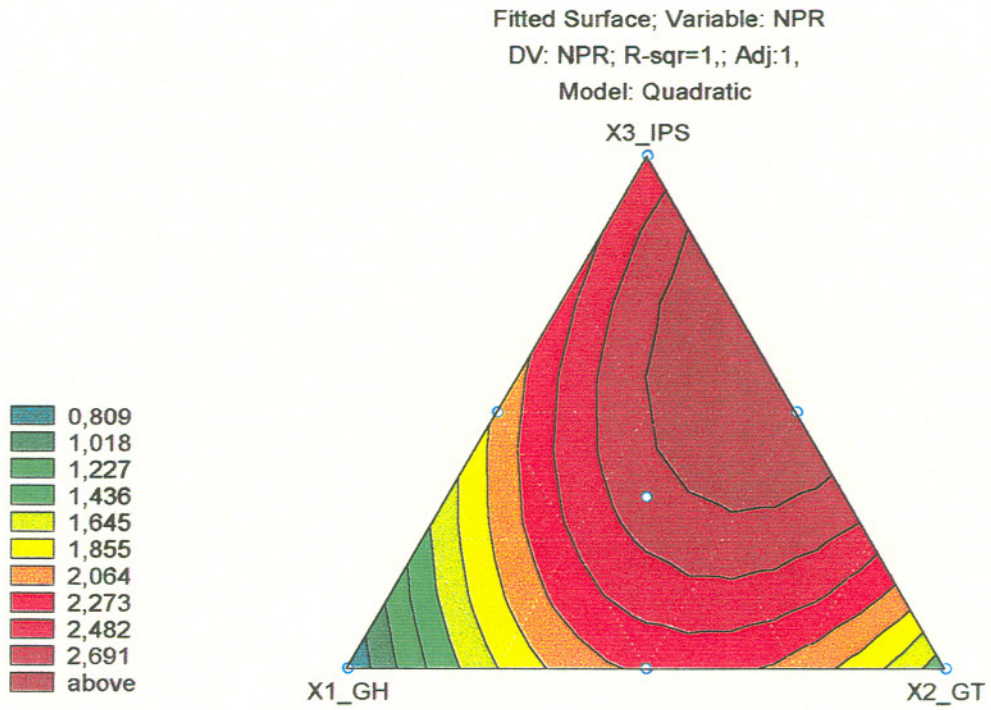


Figura 08: Curvas de Nível para a resposta NPR.

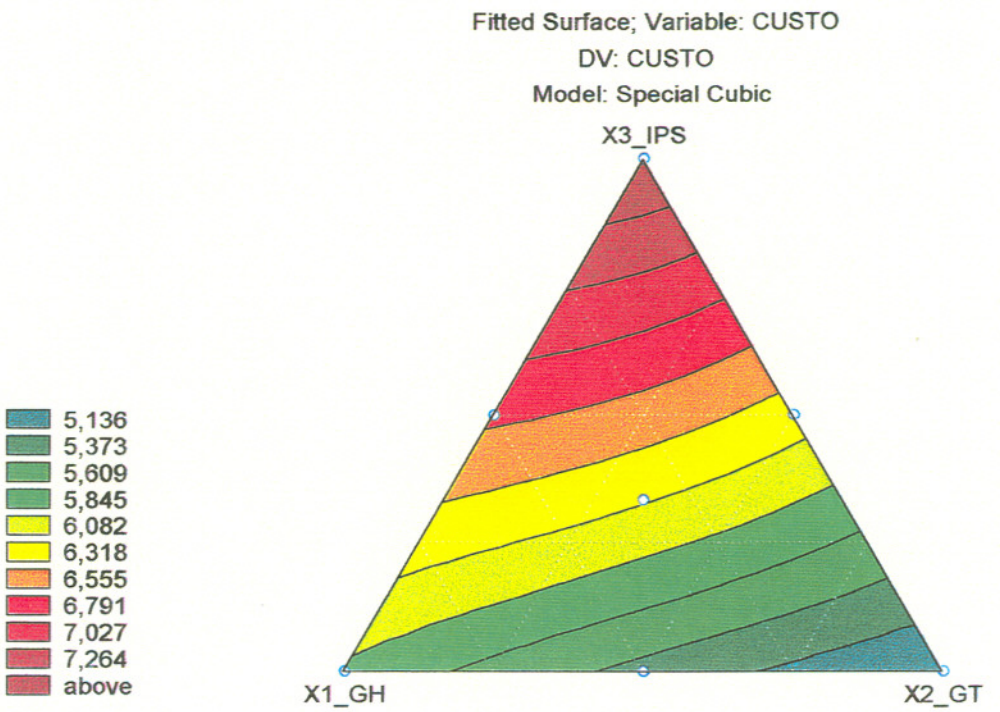


Figura 09: Curvas de Nível para resposta Custo.

NUMERO	AUTOVALORES	%	Σ%	
1	15.6145	65.06	65.06	**********
2	4.7301	19.71	84.77	**********
3	2.4261	10.11	94.88	**********
4	0.9092	3.79	98.67	*****
5	0.1767	0.74	99.40	*
6	0.0767	0.32	99.72	*
7	0.0484	0.20	99.92	*
8	0.0159	0.07	99.99	*
9	0.0016	0.01	100.00	*
10	0.0008	0.00	100.00	*
11	0.0000	0.00	100.00	*
12	0.0000	0.00	100.00	*
13	0.0000	0.00	100.00	*
14	0.0000	0.00	100.00	*
15	0.0000	0.00	100.00	*
16	0.0000	0.00	100.00	*
17	0.0000	0.00	100.00	*
18	0.0000	0.00	100.00	*
19	0.0000	0.00	100.00	*
20	0.0000	0.00	100.00	*
21	0.0000	0.00	100.00	*
22	0.0000	0.00	100.00	*
23	0.0000	0.00	100.00	*
24	0.0000	0.00	100.00	*

Taxa de inércia total = 24,00 (variáveis contínuas ativas)

FIGURA 10 : Histograma dos autovalores.

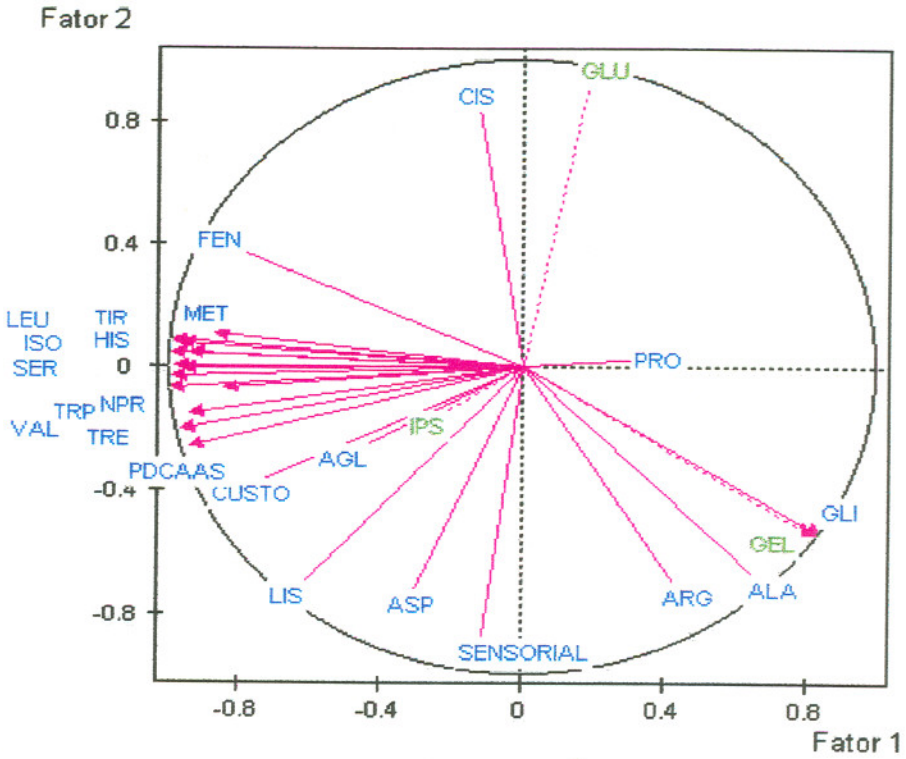


FIGURA 11: Representação das variáveis no primeiro plano fatorial.

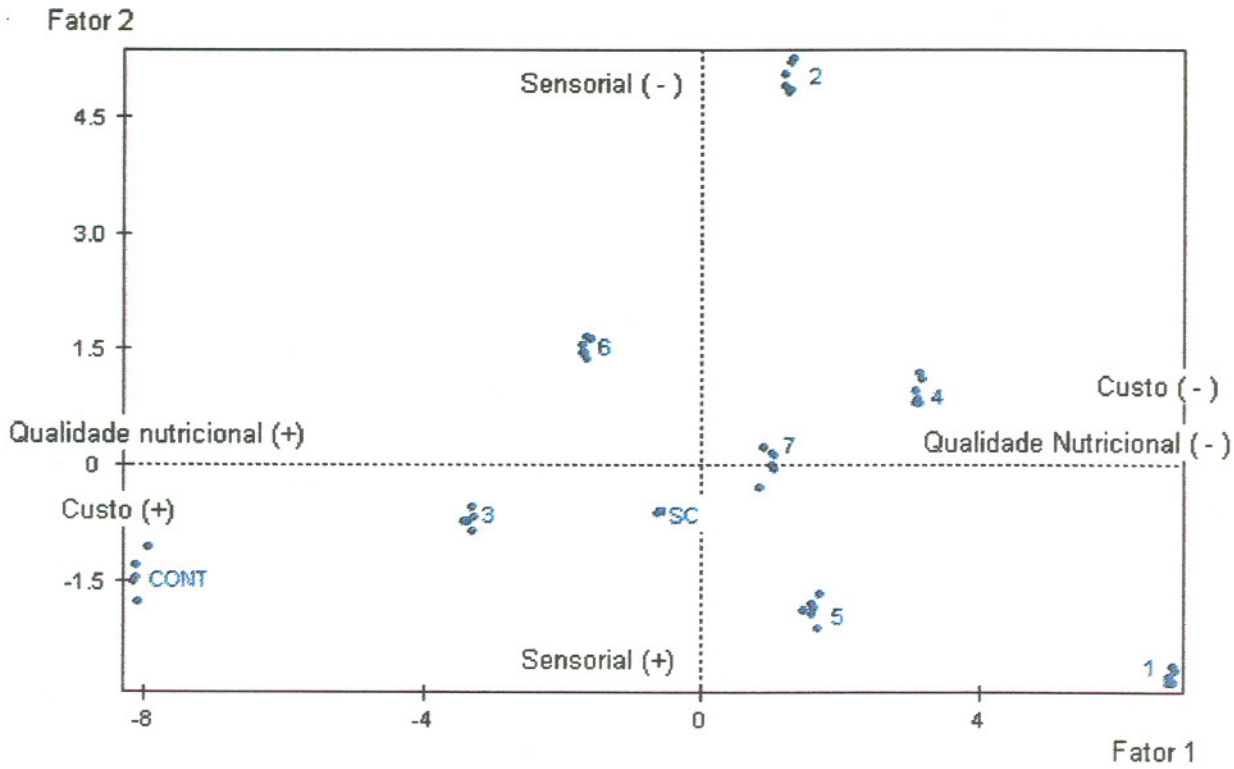


Figura 12 : Representação da nuvem de pontos (formulações) no primeiro plano fatorial.

NUM.	MAIOR	MENOR	REPR.	PESOS	INDICE	HISTOGRAMA DE ÍNDICES DE NÍVEL
55	53	54	2	2.00	0.00000	*
56	18	17	2	2.00	0.00000	*
57	52	51	2	2.00	0.00000	*
58	34	35	2	2.00	0.00000	*
59	55	49	3	3.00	0.00000	*
60	57	50	3	3.00	0.00001	*
61	13	15	2	2.00	0.00001	*
62	48	46	2	2.00	0.00002	*
63	3	1	2	2.00	0.00002	*
64	7	9	2	2.00	0.00002	*
65	8	11	2	2.00	0.00002	*
66	40	42	2	2.00	0.00002	*
67	20	22	2	2.00	0.00002	*
68	6	4	2	2.00	0.00004	*
69	29	30	2	2.00	0.00004	*
70	5	2	2	2.00	0.00004	*
71	19	21	2	2.00	0.00004	*
72	67	23	3	3.00	0.00005	*
73	39	41	2	2.00	0.00006	*
74	59	60	6	6.00	0.00006	*
75	31	36	2	2.00	0.00006	*
76	68	63	4	4.00	0.00009	*
77	58	32	3	3.00	0.00010	*
78	69	28	3	3.00	0.00012	*
79	65	10	3	3.00	0.00012	*
80	45	44	2	2.00	0.00018	*
81	75	33	3	3.00	0.00018	*
82	72	24	4	4.00	0.00023	*
83	78	25	4	4.00	0.00023	*
84	14	56	3	3.00	0.00024	*
85	61	16	3	3.00	0.00025	*
86	37	66	3	3.00	0.00034	*
87	62	47	3	3.00	0.00043	*
88	64	12	3	3.00	0.00044	*
89	85	84	6	6.00	0.00058	*
90	70	76	6	6.00	0.00068	*
91	27	83	5	5.00	0.00074	*
92	86	73	5	5.00	0.00102	*
93	81	77	6	6.00	0.00107	*
94	91	26	6	6.00	0.00128	*
95	87	43	4	4.00	0.00161	*
96	82	71	6	6.00	0.00232	*
97	92	38	6	6.00	0.00266	*
98	88	79	6	6.00	0.00282	*
99	95	80	6	6.00	0.00495	*
100	74	97	12	12.00	0.17444	**
101	100	94	18	18.00	0.33037	****
102	89	93	12	12.00	0.42684	*****
103	101	96	24	24.00	0.77641	********
104	102	103	36	36.00	2.17557	**********
105	98	104	42	42.00	2.66545	**********
106	105	90	48	48.00	5.25537	**********
107	99	106	54	54.00	8.51697	

****

Soma dos índices de nível: 20,34462

Figura 13: Histograma de classificação hierárquica.

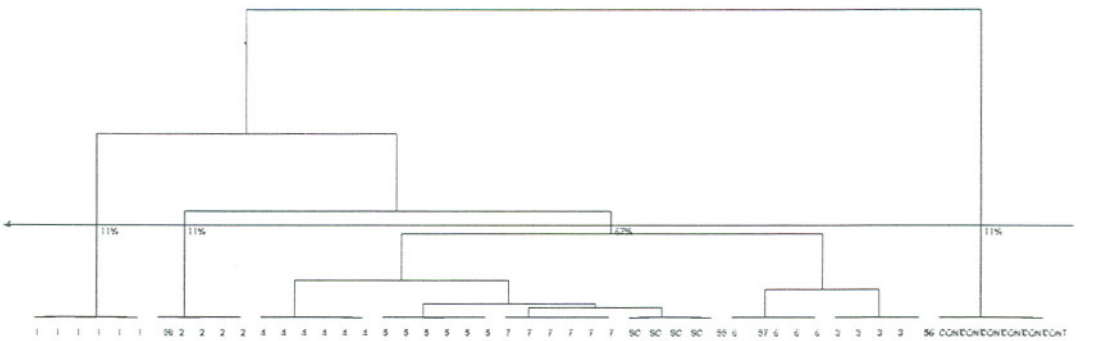


Figura 14: Dendrograma.

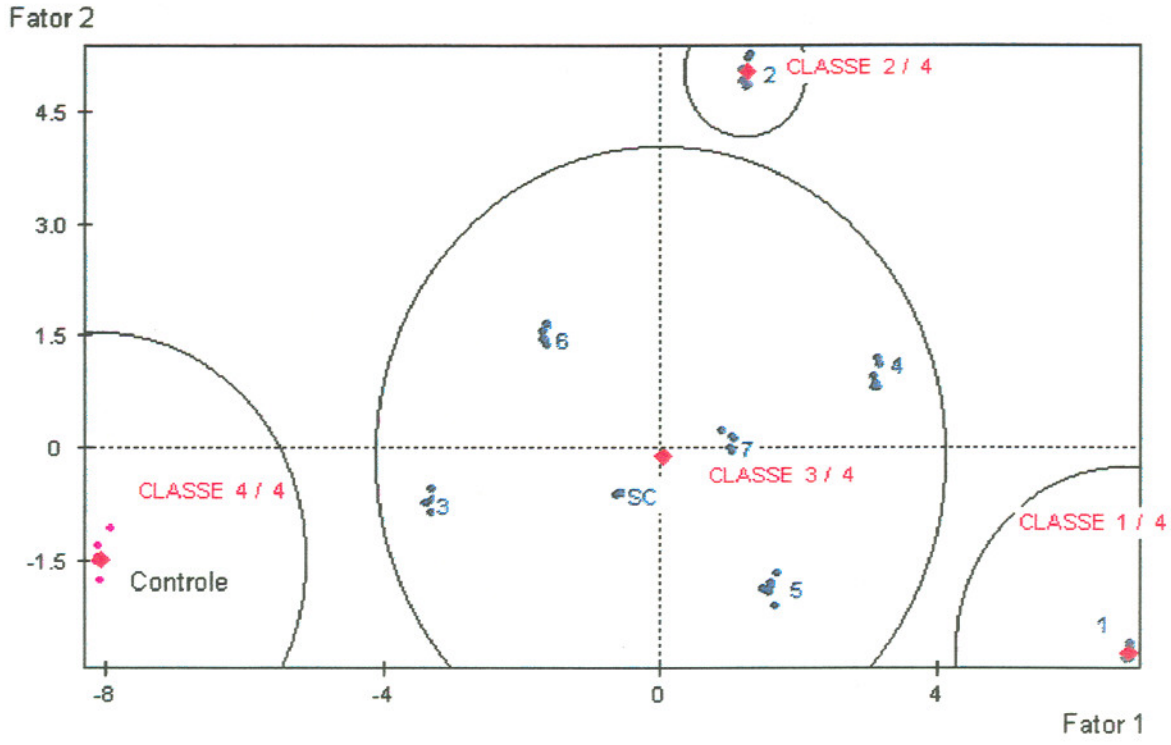


Figura 15: Representação da nuvem de pontos (formulações) no primeiro plano fatorial divididas em quatro classes básicas.

4. Bibliografia

Abromovay, R. A. Atualidade do método de Josué de Castro e a situação alimentar mundial. In: Cyrillo, D.C., Cozzolino, S.M.F., Philippi, S.T., Marucci, M.F.N. Delineamentos da pesquisa na nutrição humana aplicada. São Paulo: IPE/USP/FIPE/PRONUT, 1996.Parte II, p.57-76.

Alvim, C. Política governamental de alimentação pública. In: FÓRUM ESTADUAL DE ALIMENTAÇÃO PÚBLICA, 1, São Paulo, 1998. Anais. São Paulo: Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação (FNDE), 1998. p.25-33.

Association of Official Analytical Chemists. AOAC. Official Methods of Analysis.12.ed. Washington, DC: AOAC, 1980.

Barros Neto, B. B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Editora da UNICAMP,1995. 299 p.

Bower, J.A. Statistics for food science V:ANOVA and multiple comparisons (Part B). Nutr. Food Sci., v.1, p. 41-48, 1998.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n.3.925, de 13 de novembro de 1998. [Aprova o Manual para Organização da Atenção Básica no Sistema Única de Saúde]. Brasília: Diário Oficial da União, 02 de fevereiro de 1999. Seção 1, n.22, p.23-30, 1999[a].

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 710, de 10 de junho de 1999. [Art. 1. Aprovar a Política nacional de Alimentação e Nutrição] Brasília: Diário Oficial da União,11 de junho de 1999. Seção 1, n.11, p.14-19, 1999[b].

Bressani, R. Protein complementation of foods. In: Karmas, E., Harris, R. Nutritional evaluation of food processing. 3.ed. New York: AVI Book, 1989, p.627-657.

Buassi, N., Da Silva, R.S.F., Rao, C.S., Perera, A. D. Farinha de soja integral: aplicação da metodologia de superfície de resposta para estudo de aspectos nutricionais. Arch. Latinoam. Nutr., v.33, p.557-571, 1983.

Buassi, N. Rat serum proteins and nutritional quality of full-fat soy flour: application of response surface methodology. Arch. Latinoam. Nutr., v.37, p. 295-304, 1987.

Carias, D., Cioccia, A., Hevia, P. grado de concordancia entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas *in vivo* y su efecto sobre el cómputo químico. Arch. Latinoamer. Nutr., v.45, p.111-116, 1995.

Castro I.A., Tirapegui J., Silva, R.S.S.F. Development of protein mixtures and evaluation of their sensory properties using the statistical response surface methodology. Intern. J. Food Sci. Nutr. , v.49, p. 453-461, 1998.

Chang, H.I., Catignani, G.L., Swaisgood, H.E. Protein digestibility of alkali and fructose-treated protein by rat true digestibility assay and by the immobilised digestive enzyme assay system. J. Agric. Food Chem., v. 38, p.1016-1018, 1990.

Cornell, J.A. Experiments with mixtures. designs, models and the analysis of mixture data. 2.ed. Nova York: John Wiley & Sons,1990. 632 p.

Crivisqui, E. Apresentação da análise em componentes principais. Bruxelas: Programme de reserche et d'ensignement en statistique appliquée (PRESTA), 1997. 57p. site: www.ulb.ac.be/assoc/presta

Cyrillo, D.C., Braga, M.B., Sae, M.S.M. Tendências do consumo de alimentos e o plano real . uma avaliação para a grande São Paulo. (comunicação pessoal), 1997, 29p.

Drewnowski, A., Popkin, B.M. the nutrition transition: new trends in the global diet. Nutr. Rev. v.55, p.31-43, 1997.

El, S.N., Kavas, A. Determination of protein quality of rainbow trout (*Salmo irideus*) by *in vitro* Protein Digestibility Corrected Aminoacid Score (PDCAAS). Food Chem. v.55. p.221-223, 1996.

Elleckjar, M. R., Naes, T., Baardseth, P. Milk proteins affect yield and sensory quality of cooked sausages. J. Food Sci., v.61, p.660-666, 1996.

Faller, J.Y., Klein, B.P., Faller J.F. Acceptability of extruded corn snacks as affected by inclusion of soy protein. J.Food Sci., v.64, p. 185-188, 1999.

Food and Agriculture Organisation & World Health Organisation (FAO/WHO). Protein quality evaluation. Report of joint FAO/WHO Expert Consulation Committee on Protein Quality Evaluation. Paper 51, Rome, 1991, p. 1-65.

Friedman, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. J.Agric. Food Chem., v.44, p.6-29, 1996.

Fundação de Assistência ao Escolar (FAE). Manual técnico , administrativo e operacional de CQ.V2. Código MT 01.07.03 (S), Brasília, 1993. 48p.

Giese, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. Food Technol., v. 10, p.50-60, 1994.

Gomes, F.P. Curso de estatística experimental.12.ed. São Paulo: Nobel/EDUSP. Universidade de São Paulo (USP), 1987. 467p.

Gross, R., Lima, F.D., Freitas, C.J., Gross, U. The relationships between selected anthropometric and socio-economic data in schoolchildren from different social strata in Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Saúde Pública, v.24, p.11-19, 1990.

Guinard, J.X., Zoumas-Morse, C., Mori, L., Uatoni, B., Panyam, D., Kilara, A. Sugar and fat effects on sensory properties of ice cream. J. Food Sci., v.62, p.1087-1904, 1997.

Hansen I., Larsen, T., Bach Knudsen, K.E., Eggum, B.O. Nutrient digestibilities in ingredients fed alone or in combinations. Br. J. Nutr., v.66, p.27-35, 1991.

Henika, R.G. Use of response surface methodology in sensory evaluation. Food Technol., v.11, p.96-101, 1982.

Henley, E.C., Kuster, J.M. Protein quality evaluation by Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scoring. Food Technol., v.48,p.74-77, 1994.

Hernández, M., Montalvo, I., Sousa, V., Sotelo, A. The protein efficiency ratios of 30:70 mixtures of animal vegetal protein are similar or higher than those of the animal foods alone. J. Nutr., v.126, p.574-581,1996.

Igbedi, S.O. Undernutrition in Nigeria: dimension, causes and remedies for alleviation in a changing socio-economic environment. Nutr. Health, v.9, p.1-14, 1993.

Institute of Food Technology (IFT) Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. Food Technol., v.11, p.50-57, 1981.

Iop, S.C.F., Silva, R.S.F., Beleia, A.P. Formulation and evaluation of dry dessert mix containing sweetener combinations using mixture response methodology. Food Chem., v.66, p.167-171, 1999.

Johnson, R.A., Wichern, D.W. Applied multivariate statistical analysis. New Jersey: Prentice-Hall, 1982. 704p.

Kennedy, E.T. Approaches to linking agricultural and nutrition programmes. Health Policy and Planning, v.9, p.294-305, 1994.

Kessler, D.A. The evolution of national nutritional policy. Ann. Rev. Nutr., v.15, p. XIII – XXVI, 1995.

Krause, M.V., Mahan, L.K. Alimentos, nutrição e dietoterapia. um livro texto do cuidado nutricional. 7.ed. São Paulo: Livraria Roca Ltda. 1991. 981p.

Lajolo, F.M., Tirapegui, J. Proteínas e aminoácidos. In: Ciências Nutricionais. Oliveira, J.E.D, Marchini, J.S. São Paulo: Sarvier, 1999. Capítulo 3, p. 41-69.

Linder, M., Rozan, P., Kossori,L., Fanni, J., Villaume, C., Méjan, L., Parmentier, M. Nutritional value of veals bone hydrolysate. J. Food Sci., v.62, p.183-189, 1997.

Lindsay, H.A. The nutrition CRSP: What is marginal malnutrition, and does it affect human function? Nutr. Rev., v.51, p.255-267, 1993.

Lucas, B., Sotelo, A. Effect of different alkalies, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. Anal. Biochem., v.109, p.192-197, 1980.

Mainly, B.F.J. Multivariate statistical methods. A primer. London: Chapman and Hall, 1990. 525p.

Marchini,J.S., Rodrigues, M.M.P., Cunha, S.F.C., Fausto, M.A., Vanuchi, H., Oliveira, J.E.D. Calculation for recommendations regarding protein intake: the application to children and adult taking Brazilian foods. Rev. Saúde Pública, v.28, p.146-152, 1994.

Marquez, U.M.L., Filisetti-Cozzi, T.M.C.C., Lajolo, F.M. Nutritional value of rapeseeds (*Brassica napus*, l) alone or in blends with corn or soybean. Ciênc. Tecnol. Aliment., v.12, p.52-61, 1992.

Marquez, U.M.L. Preparo de amostras para análise de aminoácidos em proteínas alimentares. Boletim da SBCTA , v.30, p.19-27, 1996.

McDonough, F.E., Sarwar, G., Steinke, F.H., Slump, P., Garcia, S., Boisen, S. *In vitro* assay for protein digestibility: interlaboratory study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., v.73, p.622-625, 1990[b]

McDonough, F.E., Steinke, F.H., Sarwar, G., Eggum, B.O., Bressani, R., Barbeau, W.E., Mitchell, G.V., Phillips, J.G. *In vivo* rat assay for true protein digestibility: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., v.73, p.801-805, 1990[a].

McLarney, M.J., Pellet, P.L., Young, V.R. Pattern of amino acid requirements in humans: an interspecies comparison using published amino acid requirement recommendations. J. Nutr., v.126, p.1871-1882, 1996.

Messer, E. Intra-household allocation of food and health care: current findings and understands - Introduction. Soc. Sci. Med., v.44, p.1675-1684, 1997.

Ministério da Educação e Cultura. MEC/FAE/DAAN. Relatório Anual , Brasília. 1995. p. 17-31.

Ministério da Educação e Cultura. MEC/FAE/DAAN. Diretrizes e critérios para operacionalização do controle de qualidade do programa nacional de alimentação escolar (PNAE), Brasília, 1996. 10p.

Ministério da Educação e do Desporto. Fundação de Assistência ao Estudante (Brasil) Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE). Cartilha: Direito a Merenda Escolar. Brasília, 1996. 19p.

Molina, M.C., Gross, R., Schell, B., Leão, M.A.C., Shack, U., Brunken, B. Nutritional status of children of urban low-income communities, Brazil (1986) Rev. Saúde Pública, v.23, p. 89-97, 1989.

Mondini, L., Monteiro, C.A. Mudanças no padrão alimentar da população urbana brasileira (1962-1988). Rev. Saúde Pública, v.28, p.433-439, 1994.

Monteiro, C.A., Mondini, L., de Souza AL., Popkin, B.M. The nutrition transition in brazil. Eur. J. Clin. Nutr., v.49, p.105-113, 1995.

Monteiro, C. A., Mondini, L., Torres, A.M., dos Reis, I.M. Patterns of intra-familiar distribution of undernutrition: Methods and applications for developing societies. Eur. J. Clin. Nutr., v.51, p. 800-803, 1997.

Moore, S.J. On the determination of cystine as cysteic acid. J. Biol. Chem., v.238, p.235 -237, 1963.

Moraes, R., Kribb, D.K.Y. Novos produtos de soja. In: FÓRUM ESTADUAL DE ALIMENTAÇÃO PÚBLICA, 1, São Paulo, 1998. Anais. São Paulo, Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação(FNDE), 1998. p.17-20.

Morales, A.A. La evalucación sensorial de los alimentos en la teoria y la práctica. Zaragoza : Editorial Acribia,1994. 198 p.

Muñoz, A.M., Chambers, E. Relating sensory measurements to consumer acceptance of meat products. Food Technol, v.9,p. 128-134, 1993.

Musgrove, P. Do nutrition programs make a difference? The case of Brazil. Int J. Health Serv. , v.20, p.691-715, 1990.

Pastor, M.V., Costell, E., Izquierdo, L., Durán, L. Optimising acceptability of a high fruit-low sugar peach nectar using aspartame and guar gum. J. Food Sci., v.61, p.852-855, 1996.

Pedersen, B., Eggum, B.O. Prediction of protein digestibility by an *in vitro* enzymatic pH-stat procedure. Z. Tierphysiol. Tierernahrg. U Fittermittelkde, v.49, p.265-277, 1983.

Pelletier, D.L. The relationship between child anthropometry and mortality in developments countries: implications for policy, programs and feature research. J Nutr., v.124 (10 Suppl.), p. 2047S-2081S, 1994.

Philipsen, D.H., Clydesdale, F.M., Griffin, R.W., Stem, P. Consumer age effects response to sensory characteristics of a cherry flavoured beverage. J. Food Sci., v.60, p.364-368, 1995.

Phillips, R.D. Nutritional quality of cereal and legume storage proteins. Food Technol., v.51, p.62-66, 1997.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Popkin, B.M. The nutrition transition in low-income countries: an emerging crisis. Nutr. Rev., v. 52, p.285-298, 1994.

Popkin, B.M. Urbanisation, lifestyle changes and the nutrition transition. World Develop., v.27, p.1905-1916, 1999.

Porter, D.H., Swaisgood, H.E., Catignani, G.L. Characterization of on immobilised digestive enzyme system for determination of protein digestibility. J. Agric. Food Chem., v.32, p. 334-339, 1984.

Raiten, D.J., Talbot, J.M., Waters, J.H. LSRO Report: assessment of nutrient requirements for infant formulas. J.Nutr., v.128, p.2110S-2118S, 1998.

Reeves, P.G., Nielsen, F.H, Fahey JR.G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on the reformulation of the AIN-76. A rodent diet. J. Nutr.,v.123, p. 1939-1951, 1993.

Rozan, P., Lamghari, R., Linder,M., Villaume,C., Fanni, J., Parmentier, M., Méjan, L. *In vivo* and *in vitro* digestibility of soybean, lupine, rapeseed meal proteins after various technological process. J.Agric. Food Chem., v.45, p.1762-1769, 1997.

Rutledge, K.P. Accelerated training of sensory descriptive flavour analysis panellists. Food Technol., v.11,p. 114-118, 1992.

Salay, E., Carvalho, J.F. Avaliação do programa de merenda escolar do município de Campinas, Brasil. Arch. Latinoam. Nutr., v.45, p.167-171, 1995.

Sanni, A.I., Onilude, A.A., Ibidapo, O.T. Biochemical composition of infant weaning food fabricated from fermented blends of cereal and soybean. Food Chem., v.65, p.35-39, 1999.

Sarwar, G. The protein efficiency ratios of animal: vegetable protein mixtures. J. Nutr., v.126, p.2278-2279, 1996.

Sarwar, G. The Protein Digestibility-Corrected Aminoacid Score method oversestimates quality of proteins containing antinutritional factors and poorly digestible proteins supplemented with limiting aminoacids in rats. J. Nutr., v.127, p.758-764, 1997.

Sarwar, G., Christensen, D.A., Finlayson, A.J., Friedman, M., Hackler, L.R., Mackenzie, S.L., Pellet, P.L., Tkachuk, R. Inter and intra-laboratory variation in aminoacid analysis of food proteins. J. Food Sci., v.48, p.526-531, 1983.

Sarwar, G, Peace, R.W., Botting, H.G. Corrected Relative Net Protein Ratio (CRNPR) method based on differences in rat and human requirements for sulphur amino acids. J. Assoc. Off. Anal. Chem, v.68, p. 689-693, 1985[a].

Sarwar, G., Blair, R., Friedman, M., Gumbmann, M.R., Hackler, L.R., Pellet, P.L., Smith, T.K. Comparison of inter-laboratory variation in amino acid analysis and rat growth assays for evaluating protein quality. J. Assoc. Off. Anal. Chem, v.68, p. 52-56, 1985[b].

Sarwar, G., Peace, R.W. Comparisons between true digestibility of total nitrogen and limiting aminoacids in vegetable proteins fed to rats. J. Nutr., v.116, p.1172-1184, 1986.

Sarwar,G., Peace, R.W., Botting, H.G., Brulé, D. Relationship between amino acid scores and protein quality indices based on rat growth. Plant Foods Hum. Nutr., v.39, p. 33-44, 1989.

Sarwar,G., McDonough, F.E. Evaluation of Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score method for assessing protein quality of foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem.,v.73, p. 347-356, 1990.

Sarwar, G., Peace, R.W. The protein quality of some enteral products is inferior to that of casein as assessed by rat growth methods and digestibility corrected aminoacid scores. J. Nutr., v.124, p.2223-2232, 1994.

Sarwar, G., L'Abbe, M.R., Trick, K., Botting, H.G., Ma, C.Y. Influence of feeding alkaline/heat processed proteins on growth and protein and mineral status of rats. Adv. Exp. Med. Biol., v.459, p.161-177, 1999.

Satterlee, L.D., Kendrick, J.G., Marshall, H.F., Jewell, D.K., Ali, R.A., Heckman, M.M., Steinke, H.F., Larson, P., Phillips, R.D., Sarwar, G., Slump, P. *In vitro* assay for predicting protein efficiency ratio as measured by rat bioassay: collaborative study. J. Assoc. Anal.Chem.,v.65, p.798-809, 1982.

Scarminio, I.S. Desenvolvimento de um sistema quimiométrico para microcomputadores em algumas aplicações. Campinas, 1989. 124p. (Tese de Doutorado. Universidade de Campinas. UNICAMP).

Scrimshaw, N.S., SanGiovanni,J.P. Synergism of nutrition, infection, and immunity: An overview. Amer. J. Clin. Nutr., v.66, p.464S-477S, 1997.

Scrimshaw, N.S. Nutrition: prospects for the 1990s. Ann. Rev. Public Health, v.11, p.53-68, 1990.

Secretaria Municipal de Abastecimento. SEMAB/PMSP (Brasil). Programa de Alimentação do Município de São Paulo, 1996. 117p.

Sexton, P.J., Paek, N.C., Shibles R.M. Effects of nitrogen source and timing of sulphur deficiency on seed yield and expression of 11S and 7S seed storage proteins of soybean. Field Crops Res., v.59, p.1-8, 1998.

Sgarbiere, V.C. Proteínas em alimentos protéicos. propriedades. degradações. Modificações. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 517p.

Shirose, I., Mori, E.E.M. Estatística aplicada à análise sensorial. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, p. 74-89, 1996./Separata/.

Silva, A. C. De Vargas a Itamar. Políticas e programas de alimentação e nutrição. In: Seminário: Pobreza, fome e desnutrição. São Paulo, 1994. Anais. São Paulo, Universidade de São Paulo. USP. Intituto de Estudos Avançados,1994. 25p.

Silva, M.V. Contribuição da merenda escolar para o aporte de energia e nutrientes de escolares do ciclo básico. Rev. Nutr. PUCCAMP, v.9, p.69-91, 1996.

Silva, R.S.S.F., Castro, I.A. Desenvolvimento de pudim com sólidos de soja: formulação com o emprego da metodologia de superfície de resposta. Arq. Biol.Tecnol., v.35, p.239-247, 1992.

Simeon, D.T., McGregor, S.M.G. Nutritional deficiences and children's behavior and mental development. Nutr. Res. Rev., v.3, p.1-24, 1990.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Statistica. Graphics Statistica Version 5.0. SAS Institute Inc., Tulsa. (1995).

Steinke, F.H., Prescher, E.E., Hopkins, D.T. Nutritional evaluation (PER) of isolated soybean protein and combinations of food proteins. J. Food Sci., v.45, p.323-327, 1980.

Stone H., Sidel, J.L. Sensory evaluation practices. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1993. 338p.

Toufeili, I., Dagher, S., Shadarevian, S., Noureddine, A., Sarakabi, M., Farran, M.T. Formulation of gluten-free pocket type flat breads: optimisation of methylcellulose, gum arabic and egg albumen levels by response surface methodology. Cereal Chem., v.71, p.594-601, 1994.

Troung, V.D., Walter, W.M.JR., Giesbrecht, F.G. Texturization of sweet potato puree with alginate: effects of tetrasodium pyrophosphate and calcium sulphate. J. Food Sci., v.60, p.1.054-1.059, 1.074, 1995.

UNICEF. The state of the world's children 1998: A UNICEF report. Malnutrition: causes, consequences and solutions. Nutr. Rev., v.56, p. 115-123,1998.

Wu, W., Williams, W.P., Acton, J.C., Huang, Y., Wardlaw, F.B., Grimes, L.W. True protein digestibility and digestibility-corrected aminoacid score of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*,l.). J. Agric. Food Chem., v.43, p.1.295-1.298, 1995[a].

Wu, W., Williams, W.P., Kunkel, M.E., Acton, J.C., Hang, F.B., Wardlaw, F.B., Grimes, L.W. True N conversion factor for diet and excreta in evaluating protein quality. J. Food Sci, v.60, p.854-857, 1995[b].

Wu, W., Williams, W.P., Kunkel, M.E., Acton, J.C., Huang, Y., Wardlaw, F.B., Grimes, L.W. Amino acid availability and availability-corrected amino acid score of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) J. Agric.Food Chem., v.44, p.1.296-1.301, 1996.

Young V.R. Soy protein in relation to human protein and aminoacid nutrition. J. Am. Diet Assoc., v.91, p.828-835, 1991.

Young V.R. Protein quality of enteral nutritionals. J. Nutr., v.125, p.1363-1364, 1995.

Young,V.R., Marchini, J.S. Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and aminoacids, with reference to nutritional adaptation in humans. Am.J.Clin.Nutr., v.51, p.270-279, 1990.

Young, V.R., Pellett, P.L. Protein evaluation, amino acid scoring and the Food and Drug Administration's proposed food labelling regulations. J. Nutr.,v.121, p.145-150, 1991.

Young, V.R., Pellett, P.L. Plant proteins in relation to human protein and aminoacid nutrition. Am.J.Clin.Nutr. , v.59, p.1203S-1212S, 1994.

Zarkadas, C.G., Karatzas, C.N., Khanizadeh, S. Evaluation protein quality of model meat/soybean blends using aminoacid compositional data. J. Agric. Food Chem., v.41, p.624-632, 1993.

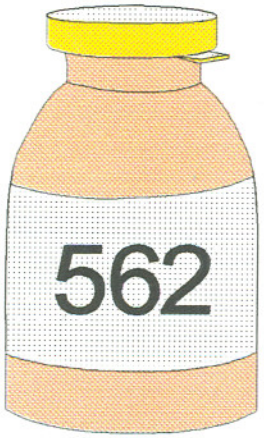
Zarkadas, C.G., Voldeng, H.D., Yu, Z.R. Determination of the protein quality of three new northern adapted cultivars of common and miso type soybeans by aminoacid analysis. J. Agric. Food Chem., v.45, p. 1161-1168, 1997.

APÊNDICE I : Modelo da ficha de avaliação sensorial para "aceitabilidade geral"

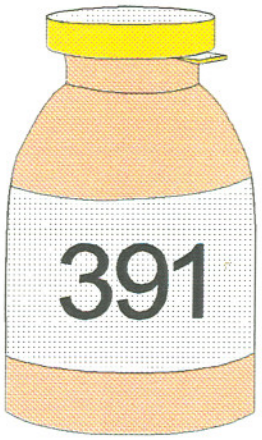
Nome :	Idade :

Experimente a bebida láctea sabor chocolate das duas embalagens.

Agora assinale a sua opinião sobre o sabor de cada uma delas.



( ) Excelente
( ) Muito Bom
( ) Bom
( ) Ruim
( ) Muito Ruim



( ) Excelente
( ) Muito Bom
( ) Bom
( ) Ruim
( ) Muito Ruim

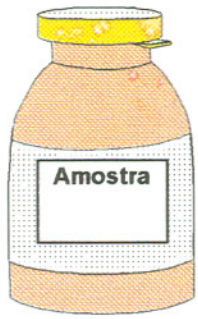
APÊNDICE II : Modelo da ficha de avaliação sensorial para "diferença escalar do controle"

Análise Sensorial : Bebida Láctea Sabor Chocolate

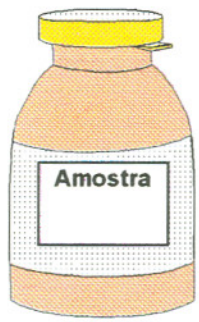
Você esta recebendo três amostras codificadas de Bebida Láctea Sabor Chocolate e um PADRÃO.

Experimente um pouco da amostra Padrão.

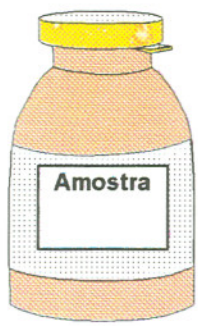
Agora, classifique o SABOR das amostras em relação ao Padrão, fazendo um traço vertical na linha ao lado da figura, de acordo com a sua opinião.



Extremamente DIFERENTE do Padrão _____ Extremamente IGUAL ao Padrão



Extremamente DIFERENTE do Padrão _____ Extremamente IGUAL ao Padrão



Extremamente DIFERENTE do Padrão _____ Extremamente IGUAL ao Padrão

Comentários :

Apêndices

APÊNDICE III : Matriz de dados Originais para ACP

Form	sensl	custo	NPR	PDC	Asp	Tre	Ser	Agl	Pro	Gll	Ala	Val	Met	Cis	Iso	Leu	Tir	Fen	His	Lis	Trp	Arg	E/N	E/T	GEL	GLU	IPS
1a	6,4	5,8	0,5	15,3	455,7	108,2	180,9	612,2	790,3	1.379	536,1	140,4	56,6	-	84,9	167,6	27,2	98,2	88,2	285,3	11,1	528,9	0,2	0,2	1,0	-	-
1b	5,9	5,8	0,5	15,4	455,7	108,2	180,9	612,2	790,3	1.379	536,1	140,4	56,6	-	84,9	167,6	27,2	98,2	88,2	285,3	11,1	528,9	0,2	0,2	1,0	-	-
1c	6,3	5,8	0,6	15,6	455,7	108,2	180,9	612,2	790,3	1.379	536,1	140,4	56,6	-	84,9	167,6	27,2	98,2	88,2	285,3	11,1	528,9	0,2	0,2	1,0	-	-
1d	6,3	5,8	0,8	15,7	455,7	108,2	180,9	612,2	790,3	1.379	536,1	140,4	56,6	-	84,9	167,6	27,2	98,2	88,2	285,3	11,1	528,9	0,2	0,2	1,0	-	-
1e	5,7	5,8	0,6	15,7	455,7	108,2	180,9	612,2	790,3	1.379	536,1	140,4	56,6	-	84,9	167,6	27,2	98,2	88,2	285,3	11,1	528,9	0,2	0,2	1,0	-	-
1f	6,1	5,8	0,8	16,0	455,7	108,2	180,9	612,2	790,3	1.379	536,1	140,4	56,6	-	84,9	167,6	27,2	98,2	88,2	285,3	11,1	528,9	0,2	0,2	1,0	-	-
2a	1,5	4,9	1,2	22,3	164,7	140,8	249,1	158,0	690,8	176,7	140,8	213,2	108,3	173,9	196,6	383,6	169,9	305,0	137,4	83,2	33,6	175,0	0,5	0,3	-	1,0	-
2b	2,7	4,9	1,2	22,4	164,7	140,8	249,1	158,0	690,8	176,7	140,8	213,2	108,3	173,9	196,6	383,6	169,9	305,0	137,4	83,2	33,6	175,0	0,5	0,3	-	1,0	-
2c	1,6	4,9	1,3	22,5	164,7	140,8	249,1	158,0	690,8	176,7	140,8	213,2	108,3	173,9	196,6	383,6	169,9	305,0	137,4	83,2	33,6	175,0	0,5	0,3	-	1,0	-
2d	2,5	4,9	1,6	22,6	164,7	140,8	249,1	158,0	690,8	176,7	140,8	213,2	108,3	173,9	196,6	383,6	169,9	305,0	137,4	83,2	33,6	175,0	0,5	0,3	-	1,0	-
2e	2,8	4,9	1,3	22,8	164,7	140,8	249,1	158,0	690,8	176,7	140,8	213,2	108,3	173,9	196,6	383,6	169,9	305,0	137,4	83,2	33,6	175,0	0,5	0,3	-	1,0	-
2f	2,0	4,9	1,6	23,1	164,7	140,8	249,1	158,0	690,8	176,7	140,8	213,2	108,3	173,9	196,6	383,6	169,9	305,0	137,4	83,2	33,6	175,0	0,5	0,3	-	1,0	-
3a	4,8	7,5	2,8	76,9	677,5	209,4	298,7	1.231	328,8	243,1	253,1	286,9	93,7	112,5	282,5	485,0	198,7	337,5	190,0	385,0	57,5	471,2	0,8	0,4	-	-	1,0
3b	4,3	7,5	2,4	78,1	677,5	209,4	298,7	1.231	328,8	243,1	253,1	286,9	93,7	112,5	282,5	485,0	198,7	337,5	190,0	385,0	57,5	471,2	0,8	0,4	-	-	1,0
3c	4,8	7,5	2,5	80,3	677,5	209,4	298,7	1.231	328,8	243,1	253,1	286,9	93,7	112,5	282,5	485,0	198,7	337,5	190,0	385,0	57,5	471,2	0,8	0,4	-	-	1,0
3d	5,2	7,5	2,2	80,4	677,5	209,4	298,7	1.231	328,8	243,1	253,1	286,9	93,7	112,5	282,5	485,0	198,7	337,5	190,0	385,0	57,5	471,2	0,8	0,4	-	-	1,0
3e	4,7	7,5	2,0	81,0	677,5	209,4	298,7	1.231	328,8	243,1	253,1	286,9	93,7	112,5	282,5	485,0	198,7	337,5	190,0	385,0	57,5	471,2	0,8	0,4	-	-	1,0
3f	4,7	7,5	2,1	81,0	677,5	209,4	298,7	1.231	328,8	243,1	253,1	286,9	93,7	112,5	282,5	485,0	198,7	337,5	190,0	385,0	57,5	471,2	0,8	0,4	-	-	1,0

APÊNDICE III : Matriz de dados Originais para ACP- continuação

Form	sensl	custo	NPR	PDC	Asp	Tre	Ser	Agl	Pro	Gli	Ala	Val	Met	Cis	Iso	Leu	Tir	Fen	His	Lis	Trp	Arg	E/N	E/T	GEL	GLU	IPS
4a	2,8	5,3	2,1	31,4	310,2	124,5	215,0	1.385	740,6	777,7	338,5	176,8	82,5	86,9	140,8	275,6	98,6	201,6	112,8	184,3	22,4	352,0	0,4	0,3	0,5	0,5	-
4b	3,8	5,3	2,1	32,4	310,2	124,5	215,0	1.385	740,6	777,7	338,5	176,8	82,5	86,9	140,8	275,6	98,6	201,6	112,8	184,3	22,4	352,0	0,4	0,3	0,5	0,5	-
4c	3,0	5,3	2,0	32,4	310,2	124,5	215,0	1.385	740,6	777,7	338,5	176,8	82,5	86,9	140,8	275,6	98,6	201,6	112,8	184,3	22,4	352,0	0,4	0,3	0,5	0,5	-
4d	3,9	5,3	2,3	32,5	310,2	124,5	215,0	1.385	740,6	777,7	338,5	176,8	82,5	86,9	140,8	275,6	98,6	201,6	112,8	184,3	22,4	352,0	0,4	0,3	0,5	0,5	-
4e	4,0	5,3	2,0	32,5	310,2	124,5	215,0	1.385	740,6	777,7	338,5	176,8	82,5	86,9	140,8	275,6	98,6	201,6	112,8	184,3	22,4	352,0	0,4	0,3	0,5	0,5	-
4f	3,5	5,3	2,3	32,6	310,2	124,5	215,0	1.385	740,6	777,7	338,5	176,8	82,5	86,9	140,8	275,6	98,6	201,6	112,8	184,3	22,4	352,0	0,4	0,3	0,5	0,5	-
5a	5,8	6,6	2,5	46,9	566,6	158,8	239,8	921,4	559,6	810,9	394,6	213,7	75,2	56,3	183,7	326,3	113,0	217,9	139,1	335,2	34,3	500,1	0,5	0,3	0,5	-	0,5
5b	6,6	6,6	1,6	47,3	566,6	158,8	239,8	921,4	559,6	810,9	394,6	213,7	75,2	56,3	183,7	326,3	113,0	217,9	139,1	335,2	34,3	500,1	0,5	0,3	0,5	-	0,5
5c	5,3	6,6	1,6	47,5	566,6	158,8	239,8	921,4	559,6	810,9	394,6	213,7	75,2	56,3	183,7	326,3	113,0	217,9	139,1	335,2	34,3	500,1	0,5	0,3	0,5	-	0,5
5d	6,0	6,6	2,0	47,5	566,6	158,8	239,8	921,4	559,6	810,9	394,6	213,7	75,2	56,3	183,7	326,3	113,0	217,9	139,1	335,2	34,3	500,1	0,5	0,3	0,5	-	0,5
5e	5,6	6,6	2,0	47,6	566,6	158,8	239,8	921,4	559,6	810,9	394,6	213,7	75,2	56,3	183,7	326,3	113,0	217,9	139,1	335,2	34,3	500,1	0,5	0,3	0,5	-	0,5
5f	5,8	6,6	1,9	48,1	566,6	158,8	239,8	921,4	559,6	810,9	394,6	213,7	75,2	56,3	183,7	326,3	113,0	217,9	139,1	335,2	34,3	500,1	0,5	0,3	0,5	-	0,5
6a	3,9	6,2	3,0	60,6	421,1	175,1	273,9	1.694	509,8	209,9	197,0	205,1	101,0	143,2	239,6	434,3	184,3	321,2	163,7	234,1	45,6	323,1	0,6	0,4	-	0,5	0,5
6b	4,8	6,2	2,9	61,1	421,1	175,1	273,9	1.694	509,8	209,9	197,0	205,1	101,0	143,2	239,6	434,3	184,3	321,2	163,7	234,1	45,6	323,1	0,6	0,4	-	0,5	0,5
6c	4,2	6,2	3,2	61,1	421,1	175,1	273,9	1.694	509,8	209,9	197,0	205,1	101,0	143,2	239,6	434,3	184,3	321,2	163,7	234,1	45,6	323,1	0,6	0,4	-	0,5	0,5
6d	4,5	6,2	3,1	62,8	421,1	175,1	273,9	1.694	509,8	209,9	197,0	205,1	101,0	143,2	239,6	434,3	184,3	321,2	163,7	234,1	45,6	323,1	0,6	0,4	-	0,5	0,5
6e	4,5	6,2	3,0	63,1	421,1	175,1	273,9	1.694	509,8	209,9	197,0	205,1	101,0	143,2	239,6	434,3	184,3	321,2	163,7	234,1	45,6	323,1	0,6	0,4	-	0,5	0,5
6f	4,0	6,2	2,6	63,7	421,1	175,1	273,9	1.694	509,8	209,9	197,0	205,1	101,0	143,2	239,6	434,3	184,3	321,2	163,7	234,1	45,6	323,1	0,6	0,4	-	0,5	0,5

APÊNDICE III : Matriz de dados Originais para ACP- continuação

Form	sensl	custo	NPR	PDC	Asp	Tre	Ser	Agl	Pro	Gll	Ala	Val	Met	Cls	Iso	Leu	Tir	Fen	His	Lis	Trp	Arg	E/N	E/T	GEL	GLU	IPS
7a	4,3	6,1	3,1	47,5	432,6	152,8	242,9	1.334	603,3	599,5	310,0	213,5	86,2	95,5	188,0	345,4	131,9	246,9	138,5	251,2	34,1	391,7	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3
7b	5,9	6,1	3,2	47,7	432,6	152,8	242,9	1.334	603,3	599,5	310,0	213,5	86,2	95,5	188,0	345,4	131,9	246,9	138,5	251,2	34,1	391,7	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3
7c	5,1	6,1	2,5	47,8	432,6	152,8	242,9	1.334	603,3	599,5	310,0	213,5	86,2	95,5	188,0	345,4	131,9	246,9	138,5	251,2	34,1	391,7	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3
7d	4,6	6,1	2,5	48,1	432,6	152,8	242,9	1.334	603,3	599,5	310,0	213,5	86,2	95,5	188,0	345,4	131,9	246,9	138,5	251,2	34,1	391,7	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3
7e	5,3	6,1	2,3	49,0	432,6	152,8	242,9	1.334	603,3	599,5	310,0	213,5	86,2	95,5	188,0	345,4	131,9	246,9	138,5	251,2	34,1	391,7	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3
7f	4,7	6,1	2,3	49,0	432,6	152,8	242,9	1.334	603,3	599,5	310,0	213,5	86,2	95,5	188,0	345,4	131,9	246,9	138,5	251,2	34,1	391,7	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3
8a	4,8	13,1	3,4	95,1	481,9	290,0	381,3	1.500	732,5	125,0	206,3	428,1	188,8	29,4	335,0	635,0	377,5	341,9	185,6	527,5	81,9	231,9	0,9	0,5	-	-	-
8b	6,9	13,1	3,8	97,0	481,9	290,0	381,3	1.500	732,5	125,0	206,3	428,1	188,8	29,4	335,0	635,0	377,5	341,9	185,6	527,5	81,9	231,9	0,9	0,5	-	-	-
8c	6,9	13,1	3,8	97,3	481,9	290,0	381,3	1.500	732,5	125,0	206,3	428,1	188,8	29,4	335,0	635,0	377,5	341,9	185,6	527,5	81,9	231,9	0,9	0,5	-	-	-
8d	5,9	13,1	3,9	98,7	481,9	290,0	381,3	1.500	732,5	125,0	206,3	428,1	188,8	29,4	335,0	635,0	377,5	341,9	185,6	527,5	81,9	231,9	0,9	0,5	-	-	-
8e	5,4	13,1	4,0	98,9	481,9	290,0	381,3	1.500	732,5	125,0	206,3	428,1	188,8	29,4	335,0	635,0	377,5	341,9	185,6	527,5	81,9	231,9	0,9	0,5	-	-	-
8f	6,0	13,1	4,1	98,9	481,9	290,0	381,3	1.500	732,5	125,0	206,3	428,1	188,8	29,4	335,0	635,0	377,5	341,9	185,6	527,5	81,9	231,9	0,9	0,5	-	-	-
9a	5,2	6,7	2,5	58,7	545,1	173,8	261,9	1.215	498,5	517,0	307,0	239,2	86,7	93,6	220,2	390,4	151,5	272,8	156,7	314,8	42,3	441,2	0,6	0,4	0,3	0,2	0,6
9b	5,2	6,7	2,7	60,9	545,1	173,8	261,9	1.215	498,5	517,0	307,0	239,2	86,7	93,6	220,2	390,4	151,5	272,8	156,7	314,8	42,3	441,2	0,6	0,4	0,3	0,2	0,6
9c	5,2	6,7	2,8	58,5	545,1	173,8	261,9	1.215	498,5	517,0	307,0	239,2	86,7	93,6	220,2	390,4	151,5	272,8	156,7	314,8	42,3	441,2	0,6	0,4	0,3	0,2	0,6
9d	5,2	6,7	2,9	57,2	545,1	173,8	261,9	1.215	498,5	517,0	307,0	239,2	86,7	93,6	220,2	390,4	151,5	272,8	156,7	314,8	42,3	441,2	0,6	0,4	0,3	0,2	0,6
9e	5,2	6,7	3,0	61,8	545,1	173,8	261,9	1.215	498,5	517,0	307,0	239,2	86,7	93,6	220,2	390,4	151,5	272,8	156,7	314,8	42,3	441,2	0,6	0,4	0,3	0,2	0,6
9f	5,2	6,7	3,0	60,8	545,1	173,8	261,9	1.215	498,5	517,0	307,0	239,2	86,7	93,6	220,2	390,4	151,5	272,8	156,7	314,8	42,3	441,2	0,6	0,4	0,3	0,2	0,6

Apêndice IV: Fichas de Avaliação para o Teste de Aceitabilidade Geral conduzidos nas Instituições de Ensino da Rede Pública.

Prefeitura Municipal de **Mairiporã**
SECRETARIA DA EDUCAÇÃO E CULTURA
RUA IPIRANGA, 84 - TEL.: 439 2888 - R 245 - 236
MAIRIPORÃ - SÃO PAULO

UNIDADE ESCOLAR: CRECHE "Tia Laura"

ENDEREÇO: _____

DATA: 10 / 06 / 1999

TESTE BEBIDA LÁCTEA

SABOR: CHOCOLATE

MARCA: TESTE – D.A.N.E da FCF/USP

ENVIADO: 02 Kg

MODO DE PREPARO (X) FÁCIL ( ) DIFÍCIL ( ) RUIM

COR (X) ÓTIMO ( ) BOM ( ) RUIM

SABOR (X) ÓTIMO ( ) BOM ( ) RUIM

ODOR (X) ÓTIMO ( ) BOM ( ) RUIM

COMENTÁRIOS: _____

FAIXA ETÁRIA: 03 a 6 anos
HORÁRIO: 14:00 hs
Nº ALUNOS: 103
QUANTIDADE FEITA 2 KG 8 LITROS
RESTO INGESTA (DEVOLUÇÃO) - LITROS
SOBRA LIMPA - LITROS

COMENTÁRIOS: _____

Apêndice IV: Fichas de Avaliação para o Teste de Aceitabilidade Geral conduzidos nas Instituições de Ensino da Rede Pública - continuação.

Prefeitura Municipal de Mairiporã
SECRETARIA DA EDUCAÇÃO E CULTURA
RUA IPIRANGA 84 - TEL.: 430 2888 - R 246 - 236
MAIRIPORÃ - SÃO PAULO

UNIDADE ESCOLAR: E.E. Prof. Nidu Zaim Cardoso

ENDEREÇO: R. VEREADOR IRACY ROLIM Nº 96
TEL: 430.4221 – NÚCLEO RESIDENCIAL
DATA: 09 / 06 / 99 (4ª FEIRA)

TESTE BEBIDA LÁCTEA

SABOR: CHOCOLATE

MARCA: TESTE: D.A.N.E. da FCF/USP

ENVIADO: 06 Kg

MODO DE PREPARO (X) FÁCIL ( ) DIFÍCIL ( ) RUIM

COR (X) ÓTIMO ( ) BOM ( ) RUIM

SABOR (X) ÓTIMO ( ) BOM ( ) RUIM

ODOR (X) ÓTIMO ( ) BOM ( ) RUIM

COMENTÁRIOS: É MUITO BOM, PORÉM O CAPUCCINO É MAIS SABOROSO.

FAIXA ETÁRIA: 11 A 15 ANOS
HORÁRIO: 18 HORAS
Nº ALUNOS: 205
QUANTIDADE FEITA 04 KG 16 LITROS
RESTO INGESTA (DEVOLUÇÃO) 03 LITROS
SOBRA LIMPA 00 LITROS

COMENTÁRIOS: "MUITO BOM!" "PARECE COM CAPUCCINO" "É MAIS SEM DOCE."
(COMENTÁRIOS DE ALUNOS)