UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Bromatologia

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA QUALIDADE PROTÉICA DA
SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA

Cintia Gisela Bezuti Giora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Flavio Finardi Filho

São Paulo
2004

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Giora, Cintia Gisela Bezuti

G497a Avaliação *in vivo* da qualidade protéica da soja geneticamente
modificada / Cintia Gisela Bezuti Giora. -- São Paulo. 2004.
73p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Finardi Filho, Flavio

I. Soja : Ciência dos alimentos 2. Biotecnologia 3. Análise
clínica : Medicina I. T. II. Finardi Filho, Flavio, orientador.

641.35655 CDD

Cintia Gisela Bezuti Giora

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA QUALIDADE PROTÉICA DA SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADA

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho
orientador/presidente

Profa. Assoc. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres
1º. examinador

Profa. Dra. Célia Colli
2º. examinador

São Paulo, 14 de abril de 2004.

**Aos meus pais,
pelo incentivo, dedicação, amor e exemplo de vida.**
**Ao Marcello,
pelo amor, amizade, compreensão e dedicação.**

AGRADECIMENTOS

Ao professor Flavio Finardi Filho pela orientação, apoio e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental FCF/USP pela oportunidade de realização deste trabalho.

À professora Primavera Borelli pela grande colaboração e participação especial neste trabalho.

À professora Célia Colli pela confiança, pelas sugestões dadas e pelo auxílio na discussão do trabalho.

Ao Sr. Rodrigo Guerzoni pelo fornecimento da matéria-prima utilizada neste trabalho.

Ao Departamento de Farmácia FCF/USP, especialmente o técnico Edgar, pelo auxílio na elaboração das rações.

Ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica FCF/USP, especialmente os técnicos Nilton de Moraes Bloisi e Gledson Manso Guimarães, pelo uso das instalações para preparação da amostra utilizada.

À Roche pelo fornecimento da mistura vitamínica.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos, especialmente à Dra. Vera Baldini, pela realização das análises de aminoácidos.

Às técnicas de laboratório e amigas Ivanir Santana Oliveira Pires, Helena Pontes Chiebao e Eliana May pelo auxílio e paciência prestadas no decorrer deste trabalho.

À professora Inar de Castro pela elaboração das análises estatísticas realizadas.

Aos colegas Chiu Chih Ming, Patrícia Cintra, Alexandre Lobo, Marcelo Rogero, Cristina de S. Carlos, Tatiana C. Pires, Joana de Almeida Santos, Jonas Alves Araújo Junior, José Donato Junior, Rogério Graça Pedrosa, pela ajuda prestada durante a elaboração deste trabalho.

Aos amigos deste e de outros Departamentos pela companhia, amizade,
paciência e momentos de alegria.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	i
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Abreviaturas.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – A Tecnologia na produção de alimentos.....	1
1.1.1 – Tecnologia do DNA recombinante.....	4
1.1.2 – Desenvolvimento de um novo alimento.....	5
1.1.3 – Segurança do novo alimento.....	7
1.1.3.1 – Risco e perigo.....	8
1.1.3.2 – Equivalência substancial.....	8
1.1.3.3 – Alergenicidade.....	10
1.1.3.4 – Testes de avaliação da segurança do novo alimento.....	10
1.2 - A Soja.....	12
1.2.1 – Características biológicas.....	13
1.2.2 – Soja tolerante ao glifosato.....	15
1.3 - Proteínas	17
1.3.1 – Importância biológica.....	17
1.3.2 - Métodos de avaliação da qualidade das proteínas.....	18
1.4 – Hematopoese.....	20

1.4.1 – Sistema eritrocitário.....	22
1.4.2 – Sistema imunológico.....	23
1.4.2.1 – A relação entre dieta e sistema imunológico.....	25
2 – OBJETIVO.....	27
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 – Materiais... ..	28
3.1.1 – Soja	28
3.1.2 – Ingredientes das Rações.....	28
3.1.3 - Reagentes.....	29
3.2 - Métodos.....	29
3.2.1 – Preparação das Amostras de Soja.....	29
3.2.2 – Elaboração das Rações Experimentais.....	29
3.2.3 – Ensaio com animais.....	31
3.2.3.1 – Modelo animal	31
3.2.3.2 – Ensaio	31
3.2.3.3 – Coleta e manipulação de amostras dos animais	32
3.2.4 – Análises Químicas.....	33
3.2.5 – Análise da Composição dos Aminoácidos dos Ingredientes Protéicos utilizados nas Rações.....	33
3.2.6 – Análise da Digestibilidade <i>in vivo</i>	34
3.2.7 – Cálculo do PDCAAS.....	34
3.2.8 – Análise da Retenção Protéica Líquida (NPR)	35

3.2.9 – Análise da Utilização Protéica Líquida (NPU)	35
3.2.10 – Análises Estatísticas.....	35
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 – Processamento das Leguminosas.....	37
4.2 – Elaboração das Rações Experimentais.....	37
4.3 – Ensaio Nutricional.....	38
4.4 – Avaliação da Qualidade Protéica.....	42
4.4.1 – Análise da Composição de Aminoácidos dos Ingredientes Protéicos Utilizados	42
4.4.2 – Análise da Digestibilidade <i>in vivo</i> e Cálculo do PDCAAS	47
4.4.3 – Análise da Eficiência da Proteína Líquida (NPR) e Utilização Protéica Líquida (NPU).....	49
4.5 – Análises hematológicas	51
5 – CONCLUSÕES	56
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7 – ANEXOS	68

LISTA DE TABELAS

		Páginas
Tabela 1 -	Variedades transgênicas comercializadas atualmente no mundo.....	6
Tabela 2 -	Formulação das dietas (AIN/93 G).....	30
Tabela 3 -	Vitaminas utilizadas nas rações (AIN/93 G).....	30
Tabela 4 -	Minerais utilizados nas rações (AIN/93 G).....	31
Tabela 5 -	Composição centesimal dos três tipos de soja (%).....	38
Tabela 6 -	Composição centesimal das rações (%).....	39
Tabela 7 -	Ração total ingerida, nitrogênio total ingerido, peso das fezes, nitrogênio total excretado e ganho de peso em 14 dias.....	40
Tabela 8 -	Massa dos órgãos dos animais após ensaio expressos pela média e desvio padrão (g).....	42
Tabela 9 -	Composição de aminoácidos essenciais (mg aa/g proteína) dos ingredientes protéicos utilizados nas rações comparados às necessidades de crianças de 2 a 5 anos (FAO/WHO/UNU, 1989) e necessidades de ratos (NRC, 1995).....	44
Tabela 10 -	Composição de aminoácidos (mg aa/g proteína) dos ingredientes protéicos utilizados nas rações comparada às necessidades de aminoácidos essenciais para ratos de laboratório (NRC, 1995 <i>in</i> Sarwar, 1996) e escore calculado.....	45
Tabela 11 -	Composição de aminoácidos (mg aa/g proteína) dos ingredientes protéicos utilizados nas rações comparada às necessidades de aminoácidos essenciais para crianças de 2-5 anos (FAO/WHO, 1991) e escore calculado.....	46
Tabela 12 -	Valores obtidos de digestibilidade real e aparente com os ensaios <i>in vivo</i>	47

Tabela 13 -	Concentração de hemoglobina, do volume hematócrito e do percentual de reticulócitos presentes no sangue periférico de ratos alimentados com diferentes tipos de soja.....	51
Tabela 14 -	Número total de leucócitos, monócitos, segmentados e linfócitos presentes no sangue periférico de ratos alimentados com diferentes tipos de soja.....	54
Tabela 15 -	Peso dos órgãos dos animais alimentados com ração à base de caseína no período de 14 dias (g).....	69
Tabela 16 -	Peso dos órgãos dos animais alimentados com ração à base de soja comercial no período de 14 dias (g)	69
Tabela 17 -	Peso dos órgãos dos animais alimentados com ração à base de soja parental no período de 14 dias (g)	70
Tabela 18 -	Peso dos órgãos dos animais alimentados com ração à base de soja GM no período de 14 dias (g)	70
Tabela 19 -	Valores da série vermelha de ratos alimentados com rações aprotéica, à base de caseína, soja comercial, soja parental e soja GM durante 14 dias.....	71
Tabela 20 -	Valores da série branca de ratos alimentados com rações aprotéica e à base de caseína e soja comercial durante 14 dias.....	72
Tabela 21 -	Valores da série branca de ratos alimentados com rações à base de soja convencional e GM durante 14 dias.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma de avaliação do potencial de gerar efeitos adversos em alimentos derivados de cultivares geneticamente modificados.....	11
Figura 2 -	Variação de peso corporal dos animais em 14 dias expresso pelo valor médio do grupo	41
Figura 3 -	Escore de Aminoácidos Corrigido pela Digestibilidade Real (PDCAAS) dos Ingredientes Protéicos.....	48
Figura 4 -	Valores de Retenção Protéica Líquida	50
Figura 5 -	Valores de Utilização Protéica Líquida.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE: aminoácidos essenciais
AIN: American Institute of Nutrition
EPSPS: enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
CQB: Certificado de Qualidade em Biossegurança
CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA: ácido desoxirribonucleico
GM: geneticamente modificado
GTS: glifosate tolerate soyabean
ID: intestino delgado
IN: instrução normativa
IT: indutor de tumor
NB: nível de biossegurança
NPR: retenção protéica líquida
NPU: utilização protéica líquida
OGM: organismo geneticamente modificado
PDCAAS: escore aminoacídico da proteína corrigido pela digestibilidade real
PER: relação da eficácia protéica
RNA: ácido ribonucleico
RR: Round up Ready ®

RESUMO

A soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato foi testada em ensaio nutricional. A qualidade protéica da soja foi avaliada durante 14 dias de experimento com ratos machos tipo Wistar recém desmamados. Além de um grupo controle aprotéico, quatro dietas testadas continham cerca de 10% de proteínas de diferentes fontes: caseína, soja comercial, soja parental e soja GM. Resultados similares entre os grupos demonstraram o baixo aproveitamento da proteína ingerida, conforme esperado para todas as dietas com soja não suplementadas com metionina e expressos pelos valores de PDCAAS. As análises hematológicas realizadas demonstraram a síntese comprometida de células eritrócitárias e imunológicas nos mesmos grupos experimentais. Este comportamento fisiológico dos animais indica que a ingestão da variedade GM não causou diferença significativa no desenvolvimento dos animais entre as três amostras de soja ensaiadas e tampouco foram observados efeitos adversos em órgãos dos animais e nos parâmetros químicos analisados.

ABSTRACT

A glyphosate tolerant soybean obtained by genetic modification was tested on a nutritional essay. The quality of the soy protein was assessed by a 14-day long experiment with Wistar male rats, three weeks old. Besides the control free protein group, four different diet groups containing about 10 % protein were pooled out: casein, commercial, parental and GM soybeans. Similar results showed the regular low biological value of the consumed soy proteins not supplemented by methionine displayed by PDCAAS values. The hematological analysis pointed to a commitment of the synthesis of erythrocytic and immunologic cells at the experimental soy groups. The overall behavior of the animals indicate the ingestion of the GM variety of soybean did not cause significant differences for the rat development when compared to the other soybean groups, neither side effects on inner organs and chemical analyzed parameters.

1 - Introdução

1.1 – A Tecnologia na produção de alimentos

Por séculos, o homem tem buscado novos caminhos para cultivar alimentos de melhor qualidade e, com novos avanços na agricultura, tem contribuído com a estabilidade, diversidade e abundância de alimentos existente atualmente (Rogers, 1998). O homem domesticou, em sua existência, somente cerca de cem a duzentas espécies entre os milhares de vegetais presentes na natureza. Destas, menos de 15, hoje em dia, suprem a maior parte da dieta humana, incluindo cereais, raízes, caules, legumes e frutas (Costa, 2000).

Inicialmente, os agricultores simplesmente replantavam algumas das sementes de suas melhores plantas para obterem plantas mais fortes, resistentes ou com outras características desejadas (Madden, 1995). A partir de 1900, a agricultura mundial ganhou um forte impulso com o melhoramento genético de plantas, onde, através de cruzamentos entre indivíduos selecionados rigorosamente, obtinham-se outros portando características capazes de melhorar o seu perfil organoléptico e/ou torná-lo mais resistente a doenças, pestes, mais nutritivos, além de outras peculiaridades (ABC, 2000). A seleção é simplesmente um processo de melhoramento genético pelo qual são escolhidos para reprodução animais ou plantas cujas características são desejadas na descendência (Costa, 2003). Foram criados, então, vegetais híbridos, provenientes de cruzamentos entre indivíduos da mesma espécie ou com aqueles passíveis de multiplicação, como ancestrais selvagens ou de outras espécies correlatas (Costa, 2000). A partir daí, os híbridos têm sido totalmente dependentes da intervenção humana devido à sua natureza limitada de dispersar suas sementes (Madden, 1995).

A década de 1960 foi marcada pela desesperança em relação à habilidade mundial de arcar com o equilíbrio entre população e alimentação, principalmente nos trópicos. As fronteiras de terras cultivadas estavam fechando enquanto que, na maioria dos países da Ásia, o crescimento populacional estava acelerado, devido ao rápido declínio das taxas de mortalidade resultante dos grandes avanços da medicina moderna (Khush, 2001).

No entanto, o IWP (Indicative World Plan for Agricultural Development) ou Plano Sinalizador Mundial para o Desenvolvimento da Agricultura designado “Revolução Verde” foi elaborado em 1960 e publicado pela FAO em 1970 com o objetivo de resolver os problemas alimentares da humanidade. Este projeto caracterizou-se pela criação de cultivares mais produtivos embora altamente dependentes de energia e de insumos, mecanização da agricultura, uso intensivo da irrigação e de agroquímicos (Costa, 2003).

De 1960 a 1985, o aumento do cultivo de grãos facilmente excedeu o crescimento populacional da época, elevando o cultivo *per capita* de 279 Kg em 1960 para 343 kg em 1985 (Khush, 2001). A “Revolução Verde” teve importância fundamental neste avanço ao impulsionar o desenvolvimento de novas variedades de alimentos, principalmente os cereais, altamente produtivos (Clugstom&Smith, 2002) por meio de novas técnicas de irrigação, disponibilidade de fertilizantes inorgânicos e políticas governamentais favoráveis (Khush, 2001). Sharma *et al.* (2002) comentam que este aumento também ocorreu graças às novas práticas agronômicas, como a mutação e a seleção induzida, e ainda, ao avanço em áreas ainda não cultivadas.

Com o passar dos anos, as formas tradicionais de cruzamento de plantas e de seleção resultaram em plantas mais produtivas e mais nutritivas (ABC, 2000). Por exemplo, a introdução de genes para baixa estatura em trigo e outros cereais como arroz e milho, aumentou substancialmente a produtividade destes alimentos, além da resistência dos mesmos a danos ambientais (Peng *et al.*, 1999).

Desde 1966, quando o primeiro cultivar de arroz de alta qualidade foi liberado, a área cultivada aumentou de 126 para 148 x 10⁶ hectares (17%), enquanto a média de arroz produzido cresceu de 2,1 a 3,6 toneladas / hectare (71%). Num período de 25 anos, o total de arroz dobrou de 257 x 10⁶ toneladas em 1966 para 520 x 10⁶ toneladas em 1990 (Khush, 2001), da mesma forma que a produção de trigo aumentou de 308 para 541 x 10⁶ toneladas no mesmo período (Lipton, 2001).

Porém, a quantidade de terras disponíveis para a produção de alimentos está diminuindo regularmente devido ao crescimento urbano e à degradação das mesmas (Sharma *et al.*, 2002), a produtividade de cereais em países em desenvolvimento tem caído anualmente de 3% de 1967-1982 para cerca de 1% a partir de 1995 (Lipton, 2001). Durante os últimos 10 anos, o crescimento no cultivo

de grãos permaneceu abaixo do patamar da população mundial e esta queda pode ser decorrente da falta de novas terras a serem exploradas para cultivo, da manutenção das áreas irrigadas em relação ao aumento dos campos de cultivo, além da queda no uso de fertilizantes, devido à baixa aceitação da sociedade e a contaminação ambiental (Khush, 2001).

A população mundial no começo do século passado consistia em cerca de 2 bilhões de pessoas, triplicando para aproximadamente 6 bilhões atualmente e estima-se que avance mais 25% (7,5 bilhões) até a década de 2020 (Cockburn, 2002), ou mesmo mais 50% ou 9 bilhões até as décadas de 2040 ou 2050. Em média, um adicional de 73 milhões de pessoas nasce anualmente, entre as quais 97% viverão nos países em desenvolvimento (Sharma *et al.*, 2002). E ainda, cerca de 800 milhões de pessoas estão sob condição de subnutrição no mundo e 2 bilhões são mal nutridas (Avery, 2000).

Além do crescimento populacional, vale a pena ressaltar que os métodos tradicionais de criação de plantas incluem vários cruzamentos com indivíduos sexualmente compatíveis que necessitam de longos períodos de pesquisa em campo para a obtenção do gene desejável ou a retirada do gene indesejável na variedade comercial, por meio de troca de genomas inteiros ou partes de cromossomos das plantas (ABC, 2000). Esta troca permite uma recombinação de genes e retorno de características indesejáveis, tornando o trabalho lento (Madden, 1995), oneroso e muitas vezes incerto. Recentemente, uma nova variedade de milho rica em lisina foi anunciada após 30 anos de trabalho de melhoramento genético clássico.

Algumas das limitações encontradas no quadro atual, estão expostas abaixo:

- a quantidade de terras disponíveis para a produção de colheitas está diminuindo constantemente (Cockburn, 2002);
- os recursos hídricos estão cada vez mais escassos (Lipton, 2001), ou seja, com a urbanização e industrialização, a demanda e necessidade por água aumentou drasticamente;
- entre 1980 e 1990, produtos de várias colheitas têm alcançado um *platô* em países desenvolvidos (Sharma *et al.*, 2002);

- no cruzamento por métodos convencionais grandes blocos de genes são transferidos entre os organismos, sendo provável a recepção de características indesejáveis (Jones, 1992);
- a mutação artificialmente induzida não deve ser aplicada em excesso (Madden, 1995);
- o método tradicional de cultivo é um processo lento que exige um longo período de tempo para as plantas crescerem e produzirem sementes (Madden, 1995);
- a diversidade genética de algumas plantas decresceu e existem espécies sem contrapartidas silvestres com as quais se poderiam cruzar para enfrentar os problemas atuais através das técnicas tradicionais de cruzamento (ABC, 2000).

Sob esta conjuntura, observa-se que novos patamares devem ser alcançados para expandir a produção de alimentos para, pelo menos, 50% a mais nas próximas décadas, mantendo e, principalmente, melhorando a diversidade ambiental sem desrespeitar as estruturas sociais (Cockburn, 2002). Para isso, as práticas agrícolas e o processamento de alimentos devem ser aprimorados e habilitar a agroindústria a produzir alimentos seguros, nutritivos e em quantidades suficientes (Clugstom & Smith, 2002). Em longo prazo, os ganhos na produtividade são essenciais para o crescimento econômico, mas a curto prazo, é necessário manter o suprimento de alimentos adequado para a população (Sharma *et al.* , 2002).

1.1.1 - Tecnologia do DNA recombinante

Os humanos têm modificado plantas por séculos através da criação de híbridos descendentes que contenham características parentais importantes para melhoramento convencional do vegetal. Porém, com as limitações mencionadas acima, a tecnologia do DNA recombinante conquistou espaço na agricultura mundial e rompeu barreiras com a introdução de técnicas para inserir características numa planta selecionada por meio da inclusão de um gene exógeno no genoma da mesma. Com isso, criou uma ferramenta que, em conjunto com o melhoramento genético vegetal convencional, possibilita a obtenção de alimentos planejados e/ou

construídos para objetivos específicos, importantes para a saúde humana, animal e do meio ambiente (CSA Reports, 2000).

1.1.2- Desenvolvimento de um Novo Alimento

O gene é a unidade básica funcional de herança e, em conjunto, formam a molécula de DNA, a qual permite que estes genes se expressem produzindo proteínas particulares específicas que determinam as características de um indivíduo (Robinson *et al.* , 2000). A engenharia genética permite a transferência de genes entre espécies não próximas (Jones, 1992), já que todos os organismos fazem uso do mesmo código genético, onde os genes podem ser cortados e retirados de um DNA e unidos ou inseridos em outro (Madden, 1995).

O primeiro estágio da engenharia genética é identificar o gene de interesse para cloná-lo e, uma vez obtido, inseri-lo em outra planta de interesse (Jones, 1992). O sistema vetor largamente usado para a maioria das plantas é o plasmídeo indutor de tumor (TI) encontrado no DNA da bactéria de solo *Agrobacterium tumefaciens*. Através de seu plasmídeo, a bactéria tem a habilidade de construir novas células vegetais por meio de uma ação natural de introdução deste plasmídeo no DNA da planta hospedeira, para que a última produza substâncias de interesse à bactéria (Madden, 1995). Biologistas moleculares usam esta ferramenta para introduzir genes exógenos de sua escolha nas plantas, ou seja, desenvolvem plasmídeos modificados do *Agrobacterium* com genes de sua preferência (Robinson *et al.* , 2000) e a própria bactéria os insere na célula a ser modificada.

No entanto, as monocotiledôneas como milho, arroz, trigo e cevada são resistentes ao *Agrobacterium* (Jones, 1992), sendo necessário transferir os genes por outros métodos como:

- o Biolística: atingir o interior das células vegetais com minúsculas esferas revestidas com o transgene.
- o Eletroporação: usando corrente elétrica para promover a formação de poros de transição nas membranas das células alvo, obtendo o DNA de uma solução circundante.

o Microinjeção: injeção direta de DNA nas células. Este é o mais indicado para células animais.

Existem mais de 150 vegetais GM diferentes aprovados para produção em torno do mundo, incluindo cereais, leguminosas, vegetais fibrosos, frutas, nozes e plantas ornamentais. Esta modificação permite a introdução de novos traços nos alimentos para torná-los tolerantes, resistentes, mais produtivos, mais saborosos, mais nutritivos, mais duráveis (com capacidade de manter maior vida de prateleira), menos agressivos ao meio ambiente, veicular medicamentos e/ou vacinas, ou qualquer outro objetivo passível da nova técnica (Madden, 1995; Robinson *et al.*, 2000; Chassy, 2002; Aulrich *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2002; Clugstom & Smith, 2002; Moffat, 2002). A tabela 1 apresenta alguns exemplos de vegetais em escala comercial ou viáveis para comercialização.

Tabela 1: Variedades transgênicas comercializadas atualmente no mundo

Países	Alimentos	Extensão de plantio (milhões de hectares)
Canadá	Canola, milho verde, soja	4,4
Estados Unidos	Soja, milho verde, canola e algodão	41,6
México	Algodão e soja	0,05
Honduras	Milho verde	0,05
Colômbia	Algodão	0,05
Argentina	Soja, milho verde, milho	13,9
Uruguai	Soja e milho verde	0,05
Brasil	Soja	3
África do Sul	Milho verde, soja e algodão	0,05
Índia	Algodão	0,1
Austrália	Algodão	0,1
Indonésia	Algodão	0,05
Filipinas	Milho verde	0,05
China	Algodão	2,8
Bulgária	Milho verde	0,05
Romênia	Soja	0,05
Alemanha	Milho verde	0,05
Espanha	Milho verde	0,05

Fonte: Relatório ISAAA, 2003

1.1.3- Segurança do Novo Alimento

Um alimento será considerado seguro se houver razoável certeza de que o seu consumo, sob condições apropriadas, não implicará em nenhum dano à saúde (OECD,1992). Por muitos anos, novos cultivares de programas de melhoramento genético tradicional têm sido liberados no mercado com características benéficas em relação às variedades anteriores, como cultivares de trigo resistentes a doenças e com proteínas de melhor qualidade, ou mesmo, a batata resistente a peste e mais adequada ao processamento industrial*, sem que nenhum teste de segurança alimentar tenha sido feito (Belém *et al.*, 2000^B; Chassy, 2002). Entende-se ser seguro neste caso o cruzamento entre duas variedades de uma planta de forma que qualquer que seja a combinação de seus genes, não haveria produção de compostos tóxicos que gerassem reações adversas.

A estrutura do material genético dos seres vivos é idêntica (Madden, 1995; Cockburn, 2002), não sendo, portanto, um risco a simples presença de um trecho de bases nitrogenadas pareadas de procedência conhecida no DNA de um outro organismo*.

De acordo com Cockburn (2002), é necessário considerar que em qualquer transferência de genes como nos cultivares tradicionais ou naqueles geneticamente modificados, existe o risco potencial de alterar a segurança dos alimentos. A expressão de um ou mais novos genes no vegetal pode estar associada à toxicidade e alergenicidade através de alterações na estrutura de moléculas, as quais, segundo Novak & Haslberger (2000), podem ocorrer devido à imprevisibilidade de onde será integrado o novo gene no DNA. Estes novos constituintes podem ser produzidos quando a integração leva ao silenciamento ou à inativação de genes essenciais bem como às alterações no metabolismo secundário das plantas.

Devido a este fato, existe a necessidade de rigorosas especificações para assegurar a inocuidade destes produtos para a saúde humana, animal e do ambiente (Novak & Haslberger, 2000; Cockburn, 2002; Madden, 1995; Belém *et al.*, 2000^B, Metcalfe *et al.*, 1996). Deve-se ressaltar que, a metodologia convencional de

* Consultado em: <http://www.crop.cri.nz/psp/articles.htm>

melhoramento genético, se comparada à tecnologia do DNA recombinante, é imprecisa, imprevisível e, com potencial de toxicidade desconhecido do novo alimento (Belém et al, 2000^B), pois permite a troca de genoma inteiro de uma planta para a outra (Cockburn, 2002).

1.1.3.1 – Risco e Perigo

A segurança ou avaliação de risco de alimentos geneticamente modificados está baseado na identificação do perigo, caracterização deste perigo e o cálculo da exposição a este perigo (Kuiper *et al.*, 2001).

O perigo pode ser definido como o potencial intrínseco de um material de causar efeitos adversos à saúde devido a três fatores: a) sua toxicidade e/ou alergenicidade; b) alteração nutricional ou efeitos antinutricionais e c) possibilidade remota de transferir genes a bactérias ou células de mamíferos (Cockburn, 2002). Já o risco é determinado em função da probabilidade de que um efeito adverso ocorrer em presença de um composto perigoso no alimento e a severidade deste efeito adverso, portanto uma função da exposição e da toxicidade (Kuiper *et. al.*, 2001). Esta exposição é quantificada em termos de dose, intensidade, duração e rota (Cockburn, 2002).

De acordo com Borlaug et al (2000), nenhum produto alimentar, seja produzido por técnicas de DNA recombinante ou por métodos tradicionais, é totalmente isento de risco. Os riscos apresentados por alimentos ocorrem em função das características biológicas dos mesmos e dos genes que foram utilizados, ao invés do processo empregado para seu desenvolvimento.

1.1.3.2 – Equivalência substancial

Em 1993, a Organização para Colaboração e Desenvolvimento Econômico (OECD) formulou o conceito de equivalência substancial como um guia para a avaliação dos alimentos geneticamente modificados (Kok & Kuiper, 2003). Este conceito sugere que organismos utilizados diretamente como alimento ou como fonte alimentar podem ser usados como base de comparação para o alcance da

segurança de um componente alimentar modificado ou novo, que é consumido por seres humanos (OECD, 1992), ou seja, a partir do princípio de que a variedade tradicional utilizada para dar origem a um organismo GM seja segura, a comparação entre estes dois indivíduos é o fator inicial predominante na avaliação da segurança do novo alimento (Kok & Kuiper, 2003).

O cálculo da equivalência substancial é um processo analítico que dá início à avaliação de segurança, onde o novo alimento é comparado ao seu análogo convencional, ou a outro já a venda no mercado (Kuiper *et. al.*, 2001).

De acordo com a FAO/WHO (1996), o estabelecimento desta equivalência engloba:

1. Avaliação em nível molecular da fonte alimentícia geneticamente modificada.
2. A comparação das características fenotípicas desta planta com uma planta convencional.
3. A comparação analítica entre a composição da planta e seus derivados e a composição de análogos convencionais.

As análises para determinação da composição dos alimentos derivados de OGMs devem focar o conteúdo de nutrientes-chaves (macro e micronutrientes), de componentes tóxicos-chaves e de fatores antinutricionais-chaves (Belém *et. al.*, 2000^A). Além destas, experimentos *in vivo* adicionais podem ser necessários e também análises como biodisponibilidade dos nutrientes presentes no alimento, caracterização molecular do fragmento introduzido, potencial de transferência de genes do OGM para microorganismos no sistema digestório de humanos e animais (Kuiper *et. al.*, 2002), fonte do gene a ser transferido e perfil alergênico da proteína produzida, perfil de aminoácidos da proteína, digestibilidade desta proteína e, enfim, a estabilidade da nova proteína em várias etapas do processo de transformação (Metcalf *et al.*, 1996).

Devido à complexidade dos alimentos, a meta do cálculo não é provar absoluta segurança, mas estabelecer se o alimento modificado é tão seguro quanto seu homólogo tradicional (Cockburn, 2002).

1.1.3.3 – Alergenicidade

Outro aspecto analisado para determinação da segurança dos alimentos GMs é a avaliação da alergenidade da nova proteína a ser expressa com um novo gene inserido, pois as alergias alimentares atingem cerca de 2 % da população mundial, e, em alguns casos, podem levar a choques anafiláticos (Young *et al.*, 1994). De modo geral, os pacientes são alérgicos a poucas proteínas específicas presentes em um ou dois alimentos (Metcalf *et al.*, 1996), porém, é dever dos pesquisadores evitar que essa proporção aumente através dos novos cruzamentos interespecíficos.

O cálculo do potencial de alergenidade dos alimentos derivados da biotecnologia deve ser focado num processo analítico diferenciado no qual são fundamentais alguns parâmetros como o conhecimento da fonte alimentar de origem do gene, comparações de seqüências de aminoácidos com alérgenos conhecidos, as análises imunológicas *in vitro* e *in vivo* e as características físico-químicas chaves da planta (Metcalf *et al.*, 1996). Para tanto, estes autores (Metcalf *et al.*, 1996) propuseram uma árvore decisória cujo objetivo é conduzir o cálculo de potencial alergênico cuidadosamente, a fim de assegurar que os alimentos derivados de uma nova variedade não introduzirão outros alergênicos, além daqueles que já existem no mercado (Fig. 1).

1.1.3.4 – Testes de avaliação da segurança do novo alimento

Plantas produzidas por métodos tradicionais de melhoramento genético comercializadas atualmente não sofreram nenhum teste de avaliação de sua segurança (Kuiper *et al.*, 2002), ao passo que os alimentos transgênicos são rigorosamente avaliados dentro de um processo global de análise de sua segurança alimentar, por meio de métodos *in vitro* e *in vivo*, antes de serem liberados para comercialização (Belém *et al.*, 2000^A). Por meio da realização desses testes, não se tem conhecimento, até o momento, de nenhum produto GM, aprovado para consumo, que tenha causado alergias ou outro efeito adverso (Belém *et al.*, 2000). Vale lembrar

o caso dos estudos com soja GM contendo o gene da proteína 2S da castanha-do-Pará

Figura 1: Fluxograma de avaliação do potencial de gerar efeitos adversos em alimentos derivados de cultivares geneticamente modificados.

Fonte: CTNBio, Instrução Normativa nº 20.

que foi interrompido devido a testes positivos com soros de pacientes alérgicos à castanha (Nordlee *et al.*, 1996). Se um novo produto da biotecnologia realmente causar alergias, o mesmo não deveria ser proposto para comercialização ou, então, deveria ser devidamente rotulado para evitar que consumidores alérgicos ao alimento fonte consumam o novo produto (Avery, 2000).

Por outro lado, a tecnologia de modificação genética oferece a oportunidade de reduzir ou eliminar alergênicos protéicos que ocorrem naturalmente em alimentos específicos (FAO/WHO, 2000). Pesquisadores têm trabalhado para retirar alergênicos naturalmente presentes em trigo, leite e amendoim. Assim, a biotecnologia tem contribuído para reduzir problemas com alergias alimentares e não para agravá-los (Avery, 2000). Recentemente Herman *et al.* (2003) silenciaram o gene de soja responsável pela síntese de GLy em Bd 30K, uma das três proteínas que desenvolvem reações alérgicas reduzindo as reações *in vitro* com soros de pacientes sensíveis.

E, para possibilitar o desenvolvimento da biotecnologia com segurança o Brasil estabeleceu, através de legislação específica, normas de biossegurança para regular o uso da engenharia genética e a liberação no meio ambiente de organismos modificados por essa técnica (Belém *et al.*, 2000^A).

1.2 - A soja

A soja, *Glycine Max*, é uma leguminosa anual, oleaginosa, originária da China e cultivada em diversos países. Possui grande importância ambiental uma vez que fixa nitrogênio atmosférico através de bactérias *Rhizobium* que nodulam nas raízes, porém, esta planta exige a inoculação de sementes pelo menos por três anos consecutivos com a cepa específica da bactéria (Costa, 2003).

A agroindústria representa mais de 30% da economia brasileira e 40% do total de nossas exportações e é, sem dúvida, neste setor em que o Brasil detém competitividade internacional (Costa, 2000). Neste cenário, a soja como principal item da pauta de exportações brasileira justifica a pesquisa sobre a segurança de produtos derivados de suas sementes.

1.2.1 – Características Biológicas

A existência da soja é descrita desde 1000 anos antes de Cristo no Japão e na China e, somente a partir do século XIX, passou a ter importância econômica de expressão mundial (Miura *et. al.*, 2000).

A composição da soja chama atenção pelo seu rico teor nutricional. Os grãos possuem em média 20% de gorduras, 40% de proteínas, 4 a 10% de umidade, minerais como ferro, cobre, cálcio, magnésio, zinco, cobalto, fósforo e potássio e vitaminas como a tiamina e a riboflavina (Garcia *et. al.*, 1997). Além destes, a soja é uma excelente fonte de fibra dietética, principalmente a fibra insolúvel, a qual tem sido utilizada em dietas para minimizar os níveis de colesterol sérico em indivíduos hipercolesterolêmicos (Messina, 1999). A soja é utilizada na alimentação humana e animal em forma de grãos e outros produtos obtidos do seu processamento como concentrados, isolados e texturizados protéicos, óleo, lecitina, flocos desengordurados, farinha e outros (Horan, 1974).

Como alimento funcional, a soja se destaca como a única entre as leguminosas que possui concentração elevada de isoflavonas, substância com propriedades estrogênicas capaz de ajudar na prevenção e tratamento da osteoporose e câncer (Messina, 1999).

No entanto, as propriedades e as características físico-químicas de significância nutricional desta leguminosa são influenciadas pelo seu processamento, interações entre seus componentes (Garcia *et. al.*, 1997), além do seu genótipo e ambiente de cultivo (Cromwell *et. al.*, 1999). A qualidade de produtos contendo soja pode ser reduzida por conter sementes que se deterioraram durante o armazenamento em decorrência de reações enzimáticas e desenvolvimento de bolores (Mao *et. al.*, 1993; Wettlaufer&Leopold, 1991).

De acordo com Liener (1994), o perfil de aminoácidos de algumas proteínas pode determinar o seu valor nutricional, com exclusão à proteína de soja, a qual exige a aplicação de processamento térmico para esta determinação, devido a (Rackis, 1974) presença de substâncias consideradas antinutricionais que comprometem a biodisponibilidade de suas frações protéicas como os inibidores de proteases, compostos fenólicos, lectinas, saponinas, fitatos e outras.

As lectinas são glicoproteínas distribuídas largamente pela natureza que possuem a habilidade de se combinar reversivelmente com receptores de moléculas glicoconjugadas na superfície de membrana das células (Povineli & Finardi Filho, 2002; Liener, 1994). Quando ligadas às do epitélio intestinal, causam efeitos adversos como atrofia das microvilosidades e redução da atividade das células epiteliais por meio da diminuição da absorção dos nutrientes (Armour *et al.*, 1998; Liener, 1994). São termo-lábeis, ou seja, instáveis em altas temperaturas (Liener, 1994).

Os inibidores de proteases inibem especificamente a tripsina e a quimiotripsina presentes no intestino delgado simultaneamente em sítios de ligação independentes (Lajolo & Genovese, 2002) causando a diminuição do consumo alimentar em animais, redução da absorção de aminoácidos e conseqüentemente, o nitrogênio, além da queda no desenvolvimento corporal (Rackis, 1974). Também são consideradas termo-lábeis (Liener, 1994).

De acordo com Friedman *et al.* (1991), tratamentos térmicos reduzem o conteúdo de inibidores de proteases e melhoram a qualidade das frações protéicas, porém não completamente. Os inibidores do tipo Bowman-Birk são mais resistentes ao aquecimento que os do tipo Kunitz, necessitando de cerca de 60 minutos a 95 °C para serem inativados. No entanto, isto poderia causar além da desnaturação protéica, reações paralelas que prejudicariam a estrutura dos aminoácidos presentes e causariam danos à biodisponibilidade de outros nutrientes (Qin *et al.*, 1998).

Armour *et al.* (1998) avaliaram o efeito do tratamento térmico aquoso sobre a atividade dos inibidores de proteases e lectinas presentes na soja e observaram completa inativação dos inibidores de quimiotripsina e tripsina e lectinas em 10 minutos em temperatura de 100°C. Porém, questionam a instabilidade térmica dos inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk *in situ*, pois nos ensaios *in vitro* os mesmos estavam isolados e purificados.

Os taninos, que estão presentes principalmente na casca da soja, são substâncias polifenólicas que podem causar queda na taxa de crescimento por diminuição da digestibilidade de proteínas e carboidratos. O conteúdo desses compostos é de 45 mg/100g, o que é considerado baixo se comparado a outras leguminosas como o feijão (2000 mg/100g). São estáveis em temperaturas altas,

impedindo sua inativação com o processamento térmico (Liener, 1994; Garcia *et al.*, 1997).

Os fitatos são compostos cíclicos que contém seis grupos de fosfato e estão presentes na soja em torno de 1 a 1,5% do seu peso seco. Eles são responsáveis pela diminuição da absorção de substâncias como cálcio, magnésio, zinco e ferro pois agem como quelantes destes minerais (Rackis, 1974). Além dessa reação, podem interagir com resíduos de proteínas, inibindo a ação de enzimas importantes na digestão como pepsina, tripsina e alfa-amilase, o que conseqüentemente, diminui a disponibilidade de nitrogênio e altera o crescimento. São relativamente termoestáveis, podendo ser destruídos com aquecimento em altas temperaturas por 2 horas ou mais (Liener, 1994; Garcia *et al.*, 1997).

1.2.2 - Soja Tolerante ao Glifosato

Desde 1996, variedades tolerantes ao glifosato tem sido comercializadas para a soja, a canola, o algodão e milho (Cromwell *et al.*, 2002).

O glifosato (*N*-fosfoenometil-glicina) é um herbicida de aplicação foliar, não-seletivo, eficaz contra a maioria dos capins anuais e perenes e contra plantas daninhas de folhas largas, matando ou diminuindo o tamanho destas e, desta maneira, maximizando a rentabilidade da colheita e a qualidade nutricional do vegetal (Rogers, 1998).

A tecnologia do DNA recombinante possibilitou a introdução de um gene na soja que a torna resistente especificamente ao glifosato (Padgett *et al.*, 1995). O desenvolvimento de colheitas tolerantes ao glifosato ocorre desde meados de 1980 e mudaram os rumos das práticas agronômicas atuais (Shaner, 1995). A soja tolerante ao glifosato, também conhecida como GTS, *Roundup Ready*®, ou simplesmente soja RR, permite o controle de ervas daninhas pelo uso do herbicida durante todo o ciclo de vida da planta. Na planta de soja convencional o mesmo herbicida deve ser aplicado somente na preparação do solo e após a semeadura antes da emergência da plântula. Deve-se ressaltar que o glifosato não afeta o meio ambiente pois não possui atividade residual no solo, é de baixa tendência à lixiviação, ou seja, não é carregado para os cursos d'água, é essencialmente atóxico para mamíferos, pássaros e peixes,

apresenta compatibilidade com sistemas de conservação pois aumenta a umidade do solo, além de reduzir a erosão e o uso de combustível e, por fim, de custo acessível (Padgett, *et al.*, 1995). Além disso, não demonstrou, até então, resistência das ervas-daninhas em 20 anos de uso (Holt *et al.*, 1993).

O modo primário de ação do glifosato é a inibição competitiva da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), uma enzima envolvida na produção de precursores de aminoácidos aromáticos e outros compostos em plantas. Esta enzima catalisa a reação do chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato para formar 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato e fosfato inorgânico. O bloqueio dessa reação impede a planta de formar aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas e alguns metabólitos secundários (Padgett *et al.*, 1995). Desta maneira, quando as plantas convencionais são tratadas com glifosato, não conseguem produzir aminoácidos aromáticos essenciais à sua sobrevivência.

Esta enzima somente é alvo fisiológico do glifosato em vegetais, ou seja, está presente em plantas, bactérias, fungos mas não em animais (Rogers, 1998).

A introdução de um gene quimérico que expressa a enzima EPSP sintase tolerante ao glifosato não deve afetar a princípio o desenvolvimento das plantas modificadas para a inclusão desta característica, no entanto, há possibilidade de alterações de genes pré-existentes causadas pela inserção do gene na planta. Em consequência, há dúvidas sobre eventuais perdas do perfil nutricional da semente (Rogers, 1998).

Taylor *et al.* (1999), Padgett *et al.* (1995) e Cromwell *et al.* (2002) realizaram análises composicionais e de segurança na soja tolerante ao glifosato e não encontraram diferença entre ela e sua cultivar parental. Entre estas análises estavam incluídas dosagens de níveis de expressão da CP4 EPSPS, níveis de aminoácidos, análise da composição centesimal e isoflavonas.

Hammond *et al.* (1996) realizaram ensaios com animais (ratos, gatos, aves e gado leiteiro) e não encontraram nenhum efeito adverso nos animais alimentados com soja alterada geneticamente para expressar tolerância ao glifosato.

1.3 -Proteínas

1.3.1 – Importância Biológica

As proteínas são componentes essenciais da dieta imprescindíveis à sobrevivência de animais e de humanos (Friedman, 1996). São macronutrientes que fornecem nitrogênio para síntese protéica e para a síntese de vários compostos nitrogenados envolvidos em uma série de funções específicas no organismo como hormônios, neurotransmissores, substâncias de competência imunológica, DNA ou RNA, além de possibilitarem a síntese de aminoácidos não-essenciais (Tomé & Bos, 2000).

Os principais mecanismos responsáveis pela manutenção da proteína corporal e pela homeostase dos aminoácidos no organismo são a síntese e a degradação de proteínas bem como a oxidação e a síntese de novos aminoácidos conhecidos como nutricionalmente não-essenciais (Young *et. al.*, 1990). Alterações nas taxas de síntese e de degradação contribuem para que o balanço nitrogenado mantenha-se em equilíbrio com consumo adequado de proteína ou se torne negativo, quando este é menor que o necessário (Young & Marchini, 1990).

As necessidades de proteínas e de aminoácidos estão relacionadas à essencialidade da deposição biológica de proteínas e manutenção do equilíbrio de aminoácidos em função do crescimento dos tecidos e órgãos corporais, o equilíbrio entre as proteínas corporais e a ocorrência de processos fisiológicos adequados (Reeds & Garlick, 2003).

Young & Pellet (1994) sugerem que a necessidade de ingestão de proteína consiste em dois parâmetros:

- 1) Aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) sob todas as condições e aminoácidos condicionalmente essenciais (cistina, tirosina, glicina, arginina, glutamina, prolina) sob condições patológicas e fisiológicas específicas.
- 2) Nitrogênio para a síntese de aminoácidos não-essenciais (ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico, alanina, serina) e outros compostos

fisiologicamente importantes que contêm nitrogênio como os ácidos nucléicos, creatina e porfirinas.

Porém, Reeds & Garlick (2003) sugerem que a eficiência de uma proteína também se deva a fatores relevantes como: composição de aminoácidos (valor biológico), sua digestibilidade e a eficiência com a qual disponibiliza os aminoácidos para suportarem o crescimento dos tecidos corporais.

1.3.2- Métodos de Avaliação da Qualidade das Proteínas

O valor nutritivo das várias fontes protéicas é determinado pela concentração e disponibilidade de aminoácidos essenciais ao organismo em questão. Portanto, a eficiência com a qual uma determinada fonte protéica é utilizada em suporte a um adequado estado nutricional depende da relação entre as necessidades fisiológicas de aminoácidos essenciais e a concentração destes na fonte protéica de interesse (Young & Pellet, 1994). Friedman (1996) propõe que a proporção entre os aminoácidos presentes nas proteínas é um fator decisivo na qualidade da mesma, pois a deficiência em um ou mais aminoácidos essenciais pode prejudicar sua biodisponibilidade.

Desde 1919, o *Protein Efficiency Ratio* (PER, relação entre o ganho de peso e a quantidade de proteína ingerida) tem sido utilizado e reconhecido como o melhor método para avaliar a qualidade protéica em muitos países. Porém, com o alcance de novos patamares na pesquisa sobre a necessidade de aminoácidos, as limitações deste método tornaram-se bastante evidentes. O método subestima o valor de proteínas vegetais (Henley & Kuster, 1994), principalmente aquelas deficientes em aminoácidos sulfurados, uma vez que os animais utilizados nos ensaios (ratos) possuem necessidades relativamente maiores para estes aminoácidos se comparado aos humanos (Sarwar *et. al.*, 1984; FAO/WHO, 1991).

Sarwar *et. al.* (1984) propuseram o uso do *Net Protein Retention* (NPR) como uma alternativa segura para a avaliação da disponibilidade da proteína tanto em estágio de crescimento quanto para o de manutenção. Este método faz uso de um grupo experimental de animais que ingere uma ração isenta de proteína.

Segundo Miller&Bender (1953), o método de *Net Protein Utilization* (NPU) é uma forma mais rápida e menos árdua para determinar a valor nutritivo das proteínas, se comparado ao balanço nitrogenado. O primeiro, obtém valores de nitrogênio utilizado pelo metabolismo do animal e retido na carcaça do organismo num período de 10 dias, sem a necessidade da avaliação de dados não fidedignos.

Porém, FAO/WHO (1991) concluíram que a alternativa mais lógica e confiável era o sistema de escore aminoacídico no qual o conteúdo de aminoácidos da proteína teste é correlacionado às necessidades dos humanos, corrigido pelos valores de digestibilidade real para ajustar os dados da composição de aminoácidos na avaliação da qualidade protéica. É denominado *Protein Digestibility corrected Aminoacid Score* (PDCAAS) (Henley&Kuster, 1994; Schaafsma, 2000).

A correção pela digestibilidade *in vivo* se faz necessária devido às várias diferenças que as fontes protéicas, principalmente vegetais, demonstram entre si, concernente ao próprio perfil aminoacídico, às condições de tratamento utilizadas, às proporções e concentrações dos aminoácidos e à conseqüente disponibilidade dos nutrientes (Young & Pellet, 1994).

A metodologia do PDCAAS é caracterizada por três parâmetros de avaliação da qualidade protéica: o perfil de aminoácidos essenciais da proteína alimentar, sua digestibilidade e sua capacidade de suprir a quantidade de aminoácidos essenciais necessária ao bom estado nutricional do ser humano (Henley & Kuster, 1994; Darragh & Hodgkinson, 2000). Uma vez que a necessidade de aminoácidos varia conforme a idade, a necessidade de aminoácidos essenciais para crianças entre 2 e 5 anos foi estabelecida como padrão, uma vez que corresponde ao maior valor se comparado às outras faixas etárias, exceto lactentes e crianças menores de 2 anos.

O procedimento clássico para determinar a digestibilidade é o índice fecal, um procedimento *in vivo* no qual o nitrogênio excretado nas fezes é subtraído da quantidade ingerida e o valor é expresso como porcentagem de ingestão. Isto, na verdade, pode ser considerado um valor de digestibilidade aparente (FAO/WHO,1989), pois, o nitrogênio fecal pode ser proveniente também de proteínas de bactérias que o habitam e/ou partes de ácidos nucléicos de células da

mucosa intestinal e não somente de origem dietética (McDonough *et al.*, 1990^A; Reeds & Garlick, 2003).

McDonough *et al.* (1990)^A padronizaram o procedimento para medir a digestibilidade real por ensaio com rato, o qual é necessário utilizar o valor de nitrogênio excretado pelas fezes de um grupo de animais que não consumiu proteína ou que ingeriu uma dieta com quantidade suficiente de proteína para prevenir perda excessiva de proteína corporal.

1.4– Hematopoese

A presença de diferentes linhagens sanguíneas implica na existência da diferenciação celular e para tanto, faz-se necessário considerar a existência de “compartimentos” e a estrutura de cada um deles (Dexter *et al.*, 1988; Metcalf, 1984). Assim, a medula óssea apresenta compartimento de proliferação, de diferenciação e de maturação celular. Em situações de equilíbrio a proporção entre os diferentes compartimentos permanece constante embora, o influxo e o efluxo de células possa não ser igual. A expansão de uma determinada população celular é determinada tanto pelo aumento do número de células resultante da proliferação como pela redução do processo de apoptose celular ou por ambos (Dexter *et al.*, 1988; Metcalf, 1984).

As células hematopoéticas presentes na medula óssea em diferentes fases de diferenciação podem ser classificadas quanto a sua capacidade proliferativa em três compartimentos (Morrison *et al.*, 1997):

- (a) das células tronco ou células hematopoéticas pluripotenciais;
- (b) de diferenciação ou de células progenitoras,
- (c) de células comprometidas, unipotenciais (Morrison *et al.*, 1997).

O compartimento proliferativo é constituído por células primitivas, pluripotentes. O compartimento de diferenciação envolve células primitivas com potencial limitado de gerar células de diferentes linhagens celulares e com limitada capacidade de auto-renovação e já comprometidas com determinadas linhagens celulares, chamadas de células progenitoras. As células deste compartimento apresentam ainda certa capacidade proliferativa. O compartimento de células

comprometidas ou de maturação é constituído por células unipotenciais, morfológicamente reconhecíveis, e que praticamente não apresentam capacidade de auto-renovação e amadurecem. Dessa forma, o influxo é determinado pelo movimento de células do compartimento de proliferação.

Cronkite & Flidner já em 1964 consideravam que, em função do quadro global da hematopoese e da granulopoese em particular, dever-se-ia considerar cada fase da proliferação celular dentro de um sistema de equilíbrio, controlado, fisiologicamente, pelo influxo e efluxo do sangue. O termo equilíbrio, em referência à proliferação celular, não é aqui empregado no sentido de ser continuamente igual visto existirem variações fisiológicas no fluxo de células da medula óssea (e outros órgãos hematopoéticos em outras espécies animais - George *et al.*, 1985) para o sangue em função de ciclo circadiano, alimentação; atividade física; menstruação, gestação, idade e, ainda, dependente do estado emocional. Porém, ao longo de períodos amplos de tempo, o termo equilíbrio é bastante aceitável (Beutler&Williams, 2001; Lee *et. al.*, 1999).

No compartimento de maturação há proliferação intra-compartimental e o influxo pode ser determinado pelo movimento de células do compartimento de diferenciação de células morfológicamente identificáveis como mieloblastos, promielócitos e mielócitos, processo este que leva cerca de 7 dias, em condições fisiológicas. O curso subsequente da cinética ocorre pela passagem, sucessiva de metamielócitos para bastonete e a seguir, segmentado, etapa que leva em cerca de 6 a 7 dias (Beutler&Williams, 2001; Lee *et. al.*, 1999).

A entrada no sangue, fisiologicamente, só ocorre após a célula atingir certo grau de maturação, quando perde determinadas proteínas de adesão, as integrinas, o que permite então no caso dos leucócitos a migração pelo parênquima medular, penetração no sinusóide, atingindo assim, a luz do vaso (Cronkite & Flidner, 1964; Beutler&Williams, 2001).

As células saem da medula óssea ao acaso, em um fluxo unidirecional (Cronkite & Flidner, 1964; Beutler&Williams, 2001). Uma vez na circulação, os leucócitos, distribuem-se axialmente na corrente circulatória. Utilizando-se marcação isotópica com diisofluorofosfato (DFP³²), verifica-se que os granulócitos distribuem-se em um *pool* de células que, é aproximadamente, o dobro daquele calculado a

partir do volume sanguíneo e da concentração de granulócitos no sangue circulante. O *pool* de granulócitos sanguíneos totais compreende o *pool* de granulócitos "circulantes" e o *pool* de granulócitos "marginais". O estabelecimento do equilíbrio entre estes dois compartimentos ocorre rapidamente, estando sob a influência das moléculas de adesão presentes na célula endotelial, selectinas e integrinas, e ainda, dos respectivos receptores expressos nos diferentes tipos de leucócitos. As células são removidas exponencialmente do *pool* total, tendo uma vida média de 6,6 horas em situações basais (Athens *et al.*, 1961; Cronkite & Flidner, 1964; Mechanic *et al.*, 1962).

A mobilização entre os diversos compartimentos dos órgãos hematopoéticos e entre os compartimentos "marginal" e circulante do sangue periférico e a saída para o meio extravascular é um processo dinâmico, modificando-se em situações fisiológicas, patológicas e farmacológica, dependendo da natureza do estímulo e dos mecanismos envolvidos na liberação medular (Beutler&Williams, 2001). Não tem sido observado retorno, quantitativamente importante, de células grânulo-monocíticas para a circulação sanguínea após a saída para espaços extravasculares (Aschkenasy, 1975; Craddock, *et al.*, 1960; Cronkite *et al.*, 1964; Mechanic *et al.*, 1962). Por outro lado, os linfócitos retornam à circulação via sistema linfático, lembrando que a vida média dessas células pode variar de semanas a anos.

Há três tipos de componentes celulares presentes no sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Cada uma delas exercem funções diferentes, distinguindo-se morfológicamente uma das outras e possuem características peculiares relacionadas ao tipo de atividade que exercem (Brown, 1993). No organismo, em situações fisiológicas, a destruição e a produção de células são equivalentes para que seja mantido um número constante de células no sangue (Rapaport, 1978).

1.4.1– Sistema eritrocitário

Os glóbulos vermelhos (eritrócitos) são produzidos na medula óssea e se diferenciam em várias etapas por meio da ação da eritropoietina, um hormônio que regula a proliferação e a diferenciação de acordo com a necessidade de oxigênio do

organismo. Em 5 a 7 dias, as células se diferenciam, amadurecem e entram na circulação majoritariamente como eritrócitos. Cerca de 0,5 a 1,5% das células entram na circulação como reticulócitos (Brown, 1993; Rapaport, 1978).

Os estágios que antecedem o glóbulo vermelho maturado são pró-eritroblastos, eritroblastos basófilos e policromáticos, reticulócitos e eritrócitos. O reticulócito já é anucleado, porém, ainda possui RNA mensageiro para a síntese de cerca de 20% da molécula de hemoglobina, permanecendo por 2 a 3 dias na medula óssea antes de entrar circulação. A molécula da hemoglobina corresponde a 90% do peso do eritrócito (Rapaport, 1978).

A função primária dos eritrócitos é a síntese e o transporte de hemoglobina, que por sua vez, é a responsável pelo transporte de oxigênio para os tecidos e dióxido de carbono para os pulmões (Rapaport, 1978).

Substâncias como ferro, ácido fólico, vitamina B12 e aminoácidos são essenciais para a produção de novos glóbulos vermelhos, pois participam ativamente da replicação, diferenciação, maturação celular e da síntese de hemoglobina (Brown, 1993).

1.4.2- Sistema imunológico

O sistema imune é composto por uma vasta e complexa rede de elementos responsáveis pelo reconhecimento de partículas impróprias e pela defesa do organismo contra agentes nocivos. Os mecanismos de defesa podem ser do tipo natural e/ou adaptativo (Chandra&Sarchielli, 1996). A resistência natural ao antígeno é um dos caminhos mais comuns pelo qual o corpo resiste a infecções, promovendo proteção contra aproximadamente 98% dos patógenos encontrados (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Pode ser caracterizada como mecanismo não-específico e é desencadeada quando há penetração de um microorganismo na pele ou na membrana mucosa. Este mecanismo desenvolve um processo celular de resposta que faz uso de células maduras, neutrófilos, macrófagos e/ou um mecanismo humoral que envolve células linfóides (Anstead *et. al.* , 2001).

A imunidade adaptativa é um mecanismo de defesa que permite reconhecer, lembrar e responder a um antígeno específico. Esta resposta pode

eliminar o microrganismo ou células lesadas e, ainda produzir as células responsáveis pela memória imunológica no hospedeiro. Os principais componentes celulares desta resposta são os linfócitos T e B e as células plasmáticas, responsáveis pela produção das moléculas efetoras, citocinas e anticorpos (Chandra, 1996). As respostas adaptativas mediadas por imunidade humoral ou celular são exercidas por interações de anticorpos com células complementares e células fagocitárias de imunidade natural e células T com macrófagos.

Os leucócitos são células formadas na medula óssea a partir de células pluripotenciais, que sobre estimulação hormonal específica, proliferam e se diferenciam para vários tipos: granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos e linfócitos (Beisel, 1982).

Em seres humanos, os neutrófilos representam cerca de 50-60% do total de leucócitos circulantes. Estas células são parte do sistema imune inato e são essenciais na defesa do hospedeiro, pois participam da resposta inflamatória. A resposta do neutrófilo à infecção inclui aderência, quimiotaxia, fagocitose, degranulação e morte microbiana (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000).

Os monócitos têm propriedades fagocíticas e secretam uma variedade de substâncias que afetam as funções de outras células, especialmente linfócitos, que por sua vez, secretam produtos solúveis (citocinas) que modulam funções tanto de monócitos como de outras células. Juntamente com os macrófagos, os monócitos ingerem os microorganismos e são especialmente importantes na inibição do crescimento de microorganismos intracelulares (Chandra, 1991).

Os linfócitos são elementos específicos do sistema imunológico que possuem como características principais o desenvolvimento da especificidade de elementos e a memória em resposta a um agente agressor (Beisel, 1982). Para funcionar como imunidade adaptativa, linfócitos antígeno-específicos devem proliferar extensivamente antes de sua diferenciação em células efetoras funcionais de uma especificidade imunogênica particular (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Os linfócitos T conferem proteção contra antígenos que possuem habilidade para evitar contato com anticorpo por residir e se replicar dentro de células de hospedeiros, como parasitas intracelulares, bactérias, fungos e vírus. Os linfócitos B

formam e secretam as imunoglobulinas que são receptoras para antígenos (Beisel, 1982).

Os eosinófilos compreendem 1 a 3 % dos leucócitos e são importantes na defesa contra infecções parasitárias e modulação de reações de hipersensibilidade, como as alergias (Kuender&Hill, 1992).

1.4.2.1– A Relação entre Dieta e Sistema Imunológico

A desnutrição protéico-energética é uma depleção patológica de massa magra corporal causada por períodos de fome, muitas vezes acompanhada por estresse catabólico. Ela pode ocorrer também em casos de deficiência crônica de proteína na dieta sem deficiência de energia e/ou em situações de catabolismo protéico elevado (Hoffer, 2001). O termo massa magra engloba todos os tecidos livres de gordura metabolicamente ativos no organismo como músculos esqueléticos, vísceras, células sanguíneas e do sistema imunológico. A mínima depleção desses tecidos induz a anormalidades bioquímicas e funcionais importantes, as quais juntamente com a disfunção do sistema imunológico, são evidentes após perdas involuntárias de 10% ou mais de peso corporal e podem ser caracterizadas com o desenvolvimento de atrofia e fraqueza dos músculos esqueléticos, com a redução da massa muscular do coração, com o prejuízo na cicatrização de feridas, deficiência imunológica, fadiga, apatia e hipotermia (Hoffer, 2001).

A desnutrição é um dos fatores principais da ocorrência de alterações do sistema imunológico (Scrimshaw & SanGiovanni, 1997), e é comumente associada com prejuízo da resposta imune, particularmente com a diminuição da atividade mediadora celular, da função fagocitária, da produção de citocinas, da resposta secretória de anticorpos, da afinidade de anticorpos e do Sistema do Complemento (Chandra, 2002). Com relação à desnutrição tipicamente deficiente em proteína e energia, o suprimento de outros nutrientes como zinco, selênio, vitamina A, piridoxina e vitamina E estão restringidos na dieta (Anstead, *et. al.*, 2001).

Keusch (2003) estabeleceu impactos adversos significativos nas interações da desnutrição e da infecção, onde o sistema de defesa natural do organismo, exercido pelo Sistema do Complemento, pelas células fagocíticas e por

reações inflamatórias, pode ser prejudicado em situações de desnutrição em decorrência da deficiência funcional significativa e a incapacidade de manter a síntese de novos complementos protéicos. Além disso, pessoas mal nutridas possuem dificuldade em maturar as células T, resultando num número reduzido de células T funcionais e um excesso de células imaturas.

Wissler *et. al.* (1946) observou por meio de ensaios com animais de laboratório que a deficiência severa de proteína causa uma resposta diminuída de anticorpos. Em 1959, Scrimshaw *et. al.* (1959) documentaram as interações extensivas e cíclicas entre a desnutrição e a infecção, de forma que, em ensaio biológico com humanos, presenciaram um aumento da susceptibilidade às infecções em indivíduos mal nutridos acompanhada de deterioração do estado nutricional, conduzindo a um ciclo de desnutrição e infecção que resultou no desenvolvimento do *Kwashiokor*.

Segundo Scrimshaw & SanGiovanni (1997), a deficiência de proteína interfere negativamente no processo de defesa do organismo, porque a maior parte dos mecanismos imunológicos são dependentes da replicação celular ou síntese de compostos protéicos ativos, que por sua vez dependem dos aminoácidos indispensáveis provenientes da dieta.

Com relação ao período de crescimento, Chandra (1981) assegura que, com deficiências nutricionais em nível moderado a leve, os animais se desenvolvem, mas com resposta imunológica debilitada.

2 - Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade protéica da soja geneticamente modificada em relação à sua parental, através de análises de parâmetros fisiológicos e bioquímicos provenientes de ensaio com animais.

Para se atingir esse objetivo foram realizados ensaios nutricionais com ratos alimentados com rações contendo cerca de 10% de proteína de soja de uma amostra de grãos comerciais, de sementes GM e de sua parental não modificada. Os grupos experimentais foram formados com animais que receberam uma dieta controle de caseína, grupo aprotéico e três grupos com soja, comercial, parental e soja GM.

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Materiais

3.1.1– Soja

A soja comercial, como foi denominada neste estudo, é uma semente comum adquirida no comércio local, registrada sob o número SP-06381-9 no Ministério da Agricultura.

As sementes de soja parental e GM são da linhagem BR00-69525, semeada em novembro de 2001 e colhida no início de abril de 2002, na região Central do Brasil, onde foram beneficiadas, ensacadas e trituradas. Este último processo ocorreu na origem para evitar o extravio de sementes GMs. A manipulação da amostra GM foi realizada conforme as recomendações da CTNBio, em observância especial da Instrução Normativa nº7 (IN-7), que estabelece o nível de biossegurança 1 (NB 1), para esse tipo de experimento.

O Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e o Biotério de Experimentação da FCF/USP estão credenciados e autorizados a desenvolver tais ensaios, conforme o certificado CQB 0090/98 e pelas comissões de Biossegurança e de Ética em Experimentos com Animais da FCF (Faculdades de Ciências Farmacêuticas).

3.1.2 - Ingredientes das Rações

Os ingredientes das rações amido, caseína, celulose e mistura de minerais foram provenientes da Rhoster – Indústria e Comércio Ltda. A mistura vitamínica foi fornecida pela Roche Vitaminas, enquanto que o óleo de milho e o açúcar refinado foram obtidos no comércio local.

3.1.3 – Reagentes

Os reagentes empregados nas análises químicas foram todos de grau analítico.

3.2- Métodos

3.2.1– Preparação das amostras de soja

A soja comercial foi triturada em moinho de facas para ser reduzida a pó, de modo semelhante às amostras de soja parental e GM.

Amostras de soja em pó foram desengorduradas pelo método de Soxhlet (Association of Official Analytical Chemistry - AOAC, 1995) em um período de 12 horas, sendo que, durante a noite, permaneceram imersas em éter etílico. Este processo foi essencial para melhor controle da quantidade de adição deste nutriente, além de possibilitar a formação de compostos prejudiciais à biodisponibilidade das proteínas da soja.

Em seguida, foram autoclavadas a 119 kg/cm^3 (121°C) por 15 minutos na proporção de 1 parte de soja/ 5 partes de água e secas em estufa ventilada a 60°C por 24 horas (Armour *et. al.*, 1998).

3.2.2 – Elaboração das rações experimentais

As rações foram elaboradas segundo Reeves *et. al.* (1993) para animais em crescimento, de forma a proporcionar um nível de 10% de proteína. Foram preparados 3 kg de ração de cada dieta e mantidos sob refrigeração (10°C) por todo o ensaio.

Os ingredientes utilizados nas rações estão exemplificados na Tabela 2, os teores de vitaminas na Tabela 3 e minerais na Tabela 4.

Estes nutrientes foram acrescentados à ração sem considerar os teores presentes nas amostras de soja.

Foi elaborada uma ração isenta de proteína para obtenção dos valores de nitrogênio metabólico fecal. Às rações que continham soja não foi acrescentada fibra alimentar porque a quantidade da leguminosa utilizada supriu as recomendações da AIN 93 (Reeves *et. al.*, 1993).

A quantidade de soja utilizada em cada dieta foi baseada nos seus teores de umidade, proteínas e lipídios determinados em análise química pelos métodos da AOAC (1995).

A caseína e as amostras de soja em teste foram as únicas fontes de proteína utilizadas nas rações experimentais e não foram complementadas com outros aminoácidos.

Tabela 2: Formulação das dietas (AIN/93 G)¹

Ingredientes (g)	%	Control e	Sem proteína	Soja comercial	Soja parental	Soja GM
Sacarose	10	315	315	315	315	315
Amido de milho	q.s.p	1960	2275	1828	1682	1691
Óleo de milho	7	221	221	221	221	221
Caseína	10	315	-	-	-	-
Soja	10	-	-	605	751	742
Celulose	5	158	158	-	-	-
Mistura mineral	3.5	110	110	110	110	110
Mistura vitamínica	2	63	63	63	63	63
Bitartarato colina	0.25	8	8	8	8	8
Total	100	3150	3150	3150	3150	3150

¹ Reeves *et. al.* (1993)

Tabela 3: Vitaminas utilizadas nas rações (AIN/93 G)¹

Mistura de vitaminas:	g/kg mix
Ácido nicotínico	3.0
Piridoxina	1.60
Riboflavina	0.60
D-Biotina	0.020
E (acetato alfa-tocoferol 500 UI/g)	15.00
D3 (colecalfiferol – 400 UI/g)	0.250
Pantotenato de cálcio	1.60
Tiamina	0.60
Ácido fólico	0.20
B12 (cianocobalamina – em manitol 0,1%)	2.50
A (palmitato de trans-retinila 500 UI/g)	0.80
K (filoquinona)	0.075

¹ Reeves *et. al.* (1993)

3.2.3– Ensaio com Animais

3.2.3.1 – Modelo Animal

Foram utilizados *Ratus norvegicus*, da linhagem Wistar machos heterogênicos livres de patógenos específicos (SPF). Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Experimentação da FCF/USP.

3.2.3.2 – Ensaio

Foram utilizados 40 ratos recém-desmamados com peso inicial médio de $56,50 \pm 3,09$ gramas em ensaio de 14 dias de duração. Foram distribuídos em 5 grupos de 8 animais: controle, aprotéico, soja comercial, soja parental e soja GM. Os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais com alimentação e água *ad libitum*.

Tabela 4: Minerais utilizados nas rações (AIN/93 G)¹

Mistura de minerais	g/kg mix
Fosfato de potássio	196.00
Cloreto de sódio	74.00
Óxido de magnésio	24.00
Carbonato de zinco	1.65
Carbonato de cálcio	357.00
Citrato de potássio	70.78
Sulfato de potássio	46.60
Citrato férrico	6.06
Carbonato de manganês	0.63
Carbonato de cobre	0.30
Iodeto de potássio	0.01
Paramolibdato de amônio	0.00795
sulfato potássio de cromo	0.275
Ácido bórico	0.0815
Carbonato de níquel	0.0318
selenato de sódio, anidro	0.01025
meta-silicato de sódio	1.45
Cloreto de lítio	0.0174
Fluoreto de sódio	0.0635
Vanadato de amônio	0.0066

¹ Reeves *et. al.* (1993)

O ambiente manteve-se climatizado a 22°C, com umidade controlada em torno de 55% e iluminação artificial de 12h/dia.

O comportamento dos animais foi observado diariamente e os mesmos foram pesados duas vezes por semana.

3.2.3.3 – Coleta e manipulação de amostras dos animais

As fezes foram coletadas individualmente durante os 14 dias de experimentação, mantidas em refrigeração a - 18°C e, ao final, o total de cada animal foi pesado, seco em estufa ventilada 60°C por 24 horas e moído em moinho. O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de micro-Kjeldhal e o fator de conversão para proteína utilizado foi o de 6,25 (AOAC, 1995).

Ao término do ensaio, os animais foram sacrificados com aplicação prévia de anestésico (quetamina e xilazina) e alguns órgãos como estômago, intestino delgado, fígado, baço, pâncreas, rins direito e esquerdo foram avaliados, pesados e armazenados em temperatura -18°C.

As carcaças dos animais foram armazenadas em temperatura -18°C e após 20 dias, foram secas em estufa ventilada a 60°C por 6 dias e desengorduradas de acordo com o método de Soxhlet por 12 horas, sendo que permaneceram imersas em éter etílico durante a noite (Cozzolino, 1982). Após este processo, foram moídas e analisadas para obtenção do teor de nitrogênio pelo método de micro-Kjeldhal, fazendo-se uso do fator 6,25 para cálculo de proteína (AOAC, 1995).

As amostras sanguíneas para a realização do hemograma foram colhidas através de punção cardíaca utilizando-se 50µL EDTA (sal do ácido etilenodiaminotetracético, Merck®) a 10% como anticoagulante, tendo sido os animais previamente anestesiados em câmara saturada com éter etílico. Todas as análises necessárias para a execução do hemograma foram realizadas no prazo máximo de três horas após a coleta.

Para a determinação do volume hematócrito utilizou-se o método de Strumia enquanto que a concentração de hemoglobina foi determinada através do método da cianometahemoglobina (Dacie & Lewis, 1995).

A contagem do número de eritrócitos foi realizadas em câmara de

Neubauer, utilizando sangue total diluído 1:200 em líquido de Hayen (Lima *et. al.*, 1992). As amostras foram processadas em duplicata.

O número de leucócitos foi determinado em duplicata e realizado em câmara de Neubauer utilizando-se diluição de 1:20 em líquido de Turk (Dacie & Lewis, 1995).

Os valores relativos e absolutos do número leucócitos foram determinados em extensões sangüíneas realizadas logo após a coleta de sangue e coradas pela coloração de May Grünwald-Giemsa, modificada (Rosenfeld, 1947).

3.2.4 – Análises químicas

As determinações dos teores de umidade e cinzas das amostras de soja e das rações foram realizadas segundo métodos da AOAC (1995). A dosagem de fibras totais foi obtida pelo método enzimico gravimétrico total (AOAC,1992). Para a quantificação dos lípides, foi aplicado o método de Soxhlet e para as determinações de nitrogênio das rações e dos três tipos de soja foi utilizado o método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1995). O teor protéico da ração com caseína foi obtido fazendo uso do fator 6,25, enquanto as rações a base de soja, o fator utilizado foi o de 5,70.

3.2.5 – Análise da composição dos aminoácidos dos ingredientes protéicos utilizados nas rações

Para identificação e quantificação dos aminoácidos, as amostras de soja comercial, convencional e GM foram hidrolisadas com HCl 6N em tubos de hidrólise, seladas a vácuo e mantidas a 110°C por 22 horas. Após o período de hidrólise, o ácido clorídrico foi evaporado e a amostra foi recuperada em tampão citrato pH 2,2 (diluyente pH 2,2 Pickering®). Uma alíquota de 25µl foi injetada no analisador Dionex DX 300 para separação dos aminoácidos em coluna de troca catiônica e reação colorimétrica pós-coluna com ninidrina (Pickering®) (Spackman *et. al.*, 1958) usando-se como referência solução padrão de aminoácidos Pierce.

O triptofano, que é destruído durante a hidrólise ácida, foi quantificado de acordo com o método descrito por Spies (1967), usando-se hidrólise enzimática com

pronase a 40°C por 24hs. A amostra hidrolisada foi submetida à reação colorimétrica com p-dimetilamino benzaldeído (DAB) e posterior leitura em espectrofotômetro a 590nm. A concentração de triptofano foi calculada por comparação com uma curva padrão.

A caseína foi analisada por hidrólise ácida, sendo necessário a utilização de um valor estimado de triptofano presente em literatura.

3.2.6 – Análise da digestibilidade *in vivo*

Os valores de digestibilidade *in vivo* foram calculados segundo método padronizado por McDonough *et. al.* (1990)^A conforme a equação abaixo:

Digestibilidade Real

DR (%) = $(N_i - (N_f - N_e) / N_i \times 100$, onde:

N_i = Nitrogênio ingerido

N_f = Nitrogênio fecal

N_e = Nitrogênio fecal endógeno

Digestibilidade Aparente

DA(%) = $(N_i - N_f) / N_i \times 100$

3.2.7 - Cálculo do PDCAAS

O PDCAAS foi calculado de acordo com a equação a seguir:

PDCAAS = escore aminoacídico x digestibilidade real, onde:

Escore aminoacídico = AAE mg em 1 g proteína testada/ mg AAE em 1 g proteína de referência

Sendo: AAE = aminoácidos essenciais.

O cálculo é realizado para 9 aminoácidos essenciais: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina + cistina, fenilalanina + tirosina, triptofano, treonina e valina. Foi usado o padrão de necessidade de aminoácidos para crianças de 2 a 5 anos FAO/WHO (1989) como proteína de referência.

Foi também utilizado o padrão de necessidade de aminoácidos para ratos (NRC, 1995 *in* Sarwar, 1996).

3.2.8 – Análise da Retenção Protéica Líquida (NPR)

O valor da taxa de retenção protéica líquida foi calculado segundo proposto por Sarwar *et. al.* (1984):

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

3.2.9 – Análise da Utilização Protéica Líquida (NPU)

O valor da taxa de utilização de proteína líquida foi calculado segundo proposto por Miller & Bender (1953):

$\text{NPU} = \text{Nitrogênio retido} / \text{Nitrogênio consumido} * 100$, ou:

$\text{NPU} = 100 * (N_c - (N_{cap} - I_{ap})) / I$, onde:

N_c = Nitrogênio presente na carcaça do animal do grupo experimental

N_{cap} = Nitrogênio presente na carcaça do animal do grupo aprotéico

I_{ap} = Nitrogênio ingerido pelo grupo aprotéico

I = Nitrogênio ingerido pelo animal do grupo experimental

3.2.10 – Análises Estatísticas

Os teores de ração, proteína e nitrogênio consumidos; os pesos inicial/final e ganho de peso dos animais de todos os grupos, exceto do grupo aprotéico; os valores obtidos no hemograma, os valores de NPR, NPU e PDCAAS de cada grupo experimental e controle e, por fim, os pesos dos órgãos e fezes dos animais de cada grupo experimental e do controle foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey HSD. Os testes de normalidade foram realizados de acordo com o teste Shapiro/Wilk's W. Diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

Para a comparação dos parâmetros sanguíneos dos diferentes grupos foi feita a análise estatística não-paramétrica de Teste U de Man-Whitney, utilizando-se o Programa Estatístico Prisma.

4 - Resultados e Discussão

4.1 – Processamento das leguminosas

Segundo Armour *et. al.* (1998), a completa inativação das lectinas e inibidores de proteases se dá por aquecimento das sementes a 100°C por 10 minutos.

Como as amostras de soja estavam trituradas com casca, foi necessário acrescentar água para o aquecimento e, para não retirar os nutrientes presentes no líquido restante do cozimento, a água de remolho foi mantida e a mistura seca em estufa ventilada a 60°C por 24 horas. As amostras de soja foram então pulverizadas novamente em moinho de facas, desengorduradas e incorporadas à ração.

Liener (1994) sugere que a melhor forma de retirar os taninos presentes na soja é trocar a água do remolho. Como citado acima, a água não foi trocada e os taninos presentes na soja não foram retirados. Estas substâncias podem influenciar negativamente no crescimento e desenvolvimento dos animais.

4.2 - Elaboração das rações experimentais

De acordo com Reeves *et. al.* (1993), o teor protéico necessário para o crescimento dos animais é 20%, porém, FAO/WHO (1989) propõe que entre 7-10% a proteína será mais aproveitada por estar em teor limitante e, portanto, será direcionada principalmente para síntese de proteínas corporais.

O nitrogênio presente nas fezes contém, pelo menos, 50% de nitrogênio secretado pelo lúmen intestinal, proveniente da escamação de células intestinais, da destruição de células teciduais, do metabolismo de bactérias que o habitam e proteínas alimentares não digeríveis (Reeds & Garlick, 2003). Desta forma, pode não ser um parâmetro seguro para avaliar a digestibilidade da proteína dietética, porém, é possível corrigir esta inadequação utilizando o teor de nitrogênio fecal excretado por fontes não-alimentares, obtido pelo uso de um grupo de animais cuja ração esteja isenta de proteína (McDonough *et. al.*, 1990^A).

A quantidade de soja utilizada nos ensaios foi calculada a partir dos valores de sua composição centesimal determinada antes do processamento (cozimento, secagem e desengorduramento). Com o resultado das análises de fibra alimentar das amostras de soja, concluiu-se que a inclusão desta fração nas dietas seria desnecessária, pois o teor de fibra dos grãos triturados e desengordurados supriria as necessidades dos animais (Tabela 5).

Tabela 5: Composição centesimal dos três tipos de soja (%) ¹

Nutrientes	Soja Comercial	Soja Parental	Soja GM
Proteínas	42,01 ± 1,06	35,15 ± 0,64	35,55 ± 0,20
Lipídios	15,29 ± 0,42	12,06 ± 0,65	12,13 ± 0,65
Carboidratos Totais ²	36,85	47,53	47,68
Carboidratos Solúveis	(12,71)	(19,24)	(19,31)
Fibras solúveis	(3,49 ± 0,23)	(4,19 ± 0,19)	(4,46 ± 0,13)
Fibras insolúveis	(24,14 ± 0,21)	(28,29 ± 0,16)	(28,37 ± 0,33)
Cinzas	5,85 ± 0,19	5,26 ± 0,08	4,64 ± 0,12
Matéria seca	100,00	100,00	100,00

¹ – Métodos AOAC (1995)

² – Determinados por diferença.

n = 3

Na Tabela 6 estão apresentados os valores da composição centesimal das rações elaboradas. Os valores calculados de proteína para elaboração das dietas (10%) tiveram desvios nas rações de soja parental e GM, 11,11 e 11,68 respectivamente, enquanto os valores das demais dietas situaram-se em 9,5% para a caseína, 0,47 % para a aprotéica e 9,87% para a ração a base de soja comercial.

4.3– Ensaio nutricional

Este estudo biológico foi conduzido para determinar a digestibilidade protéica e a qualidade das amostras de soja em função do crescimento dos animais, fornecendo indiretamente dados para avaliação da segurança alimentar da soja geneticamente modificada.

Com relação ao consumo alimentar, todos os animais se alimentaram conforme o previsto no planejamento do projeto, apresentando fezes com consistência e cor normais (Tabela 7).

Tabela 6: Composição centesimal das rações (%)¹

Nutrientes	Controle	Aprotéica	Soja Comercial	Soja Parental	Soja GM
Proteínas	9,50 ± 0,14	0,47 ± 0,00	9,87 ± 0,8	11,11 ± 0,16	11,68 ± 0,13
Nitrogênio	1,52 ± 0,03	0,07 ± 0,01	1,73 ± 0,14	1,95 ± 0,03	2,05 ± 0,03
Lípidios	6,13 ± 0,12	6,49 ± 0,15	6,98 ± 0,11	6,54 ± 0,17	6,60 ± 0,07
Carboidratos					
totais ²	74,07	81,78	71,72	72,88	71,39
Fibras totais	(5,15) ± 0,19	(5,84) ± 0,35	(6,08) ± 0,33	(7,74) ± 0,16	(5,40) ± 0,17
Cinzas	2,51 ± 0,05	2,30 ± 0,11	3,67 ± 0,01	3,79 ± 0,02	3,56 ± 0,30
Matéria seca	91,4	91,04	92,25	94,34	93,24
Umidade	8,6 ± 0,39	8,96 ± 0,44	7,76 ± 0,11	5,66 ± 0,19	6,76 ± 0,14
Total	100	100	100	100	100

¹ – Métodos AOAC (1995)

² – Determinados por diferença.

n = 3

Todos os animais do grupo da soja GM apresentaram comportamento e hábitos normais, se comparados aos dos outros grupos. Os animais com dieta aprotéica apresentaram comportamento característico, ou seja, diminuição do apetite, aparência debilitada e comportamento arisco.

No entanto, em função das diferenças de composição das rações quanto ao parâmetro proteína apontadas na Tabela 6, os teores de nitrogênio ingeridos pelos animais cujas rações continham soja parental e soja GM foram estatisticamente diferentes dos grupos a base de caseína e de soja comercial, inviabilizando a comparação entre os grupos. Já o teor de nitrogênio ingerido pelos grupos alimentados a base de soja comercial e caseína não representaram diferença significativa, sugerindo possibilidade de comparação dos resultados obtidos.

A excreção de nitrogênio nas fezes dos animais não demonstrou diferença estatística entre os grupos alimentados com soja, porém, a excreção de nitrogênio foi significativamente menor no grupo que recebeu ração controle, indicando que houve maior aproveitamento do nitrogênio ingerido. Esta perda de nitrogênio ocorre devido

à desproporcionalidade dos aminoácidos presentes nas frações protéicas da soja em relação à caseína, ou seja, as proteínas da soja possuem menor teor de aminoácidos não-essenciais que a caseína, diminuindo a biodisponibilidade da proteína e causando uma excreção maior de nitrogênio (Pusztai *et. al.* , 1999). Acrescenta-se também a presença de resíduos de inibidores de proteases, em especial os de tripsina que, como citado anteriormente, não podem ser inativados por completo (Friedman *et. al.*, 1991), ou também, o aquecimento inativa, mas não disponibiliza os aminoácidos desses inibidores para o processo de digestão (Márquez&Lajolo,1991; Márquez *et. al.*,1996), prejudicando em ambos a absorção de nitrogênio.

Tabela 7: Ração total ingerida, nitrogênio total ingerido, peso das fezes, nitrogênio total excretado e ganho de peso em 14 dias.

Grupos	Ração total ingerida (g)	Proteína total ingerida (g)	N total ingerido (g)	Peso fezes úmidas(g)	N total fezes (g)	Ganho de peso (g)
Controle	153,32 ^b ± 6,17	12,17 ^a ±0,49	2,13 ^a ±0,08	13,07±1,27	0,21 ^a ±0,04	44,01 ^a ±4,79
Aprotéico	82,13± 13,51	0,35 ±0,06	0,06 ± 0,01	6,33± 0,94	0,07±0,014	-10,00 ± 1,85
Comercial	131,19 ^a ± 9,20	11,95 ^b ±0,84	2,09 ^a ± 0,14	10,47 ^b ±1,75	0,42 ^b ±0,05	34,47 ^a ±9,20
Parental	138,66 ^{a,b} ±18,53	14,56 ^c ±1,95	2,41 ^b ± 0,16	13,48 ^a ±2,13	0,50 ^b ±0,08	40,57 ^a ±12,00
GM	152,18 ^b ± 18,86	16,58 ^d ±2,05	2,72 ^c ± 0,31	16,44 ^d ±2,41	0,56 ^b ±0,10	43,75 ^a ±13,00

N = 8

As letras diferentes numa mesma variável significam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

O peso das fezes foi significativamente menor no grupo alimentado com soja comercial, provavelmente, por causa do menor teor de soja utilizada na ração e também pelo menor volume de ração ingerida se comparado aos grupos com soja parental e GM (Tabela 7).

A porção insolúvel da fibra dietética não é fermentescível e por isso, imobiliza a água em sua matriz, aumentando o bolo fecal (Kay, 1982). Este fato justifica os pesos elevados de fezes provenientes de animais alimentados com soja, se comparado àqueles que receberam ração com caseína.

Em relação ao peso corporal (Figura 2), conforme esperado para este tipo de experimento, os animais dos grupos experimentais apresentaram ganho de peso adequado, enquanto que os do grupo aprotéico apresentaram perda de peso.

Após a avaliação do crescimento dos animais, considerando o teor protéico estatisticamente diferente entre os grupos, foi possível observar que o grupo alimentado com ração à base de soja GM consumiu quantidades maiores de ração se comparado aos outros grupos alimentados com soja no mesmo período (Tabela 7), e, conseqüentemente, foi aquele que apresentou maior ganho de peso, enquanto que o grupo alimentado com ração a base de soja comercial apresentou consumo de menor quantidade de ração e, portanto, menor ganho de peso. Apesar dos valores médios em ganho de peso comentados acima, os grupos não apresentam diferenças estatisticamente significativas devido à variabilidade interna, expressa pelo desvio padrão.

Figura 2: Variação de peso corporal dos animais em 14 dias expresso pelo valor médio do grupo.

No final do ensaio, os animais permaneceram em jejum por 12 horas e então foram sacrificados. Foram realizadas necrópsias e não foram observadas alterações macroscópicas ou de peso de cada órgão (fígado, rins, baço, estômago, pâncreas e intestino). Os pesos médios dos órgãos dos grupos de animais estão

demonstrados na Tabela 8 e os pesos dos órgãos de cada animal estão nas Tabelas 15, 16, 17 e 18 em anexo.

Tabela 8: Massa dos órgãos dos animais após ensaio expressos pela média e desvio padrão (g).

Grupo	Caseína	Soja comercial	Soja parental	Soja GM
Baço	0,212 ± 0,043	0,186 ± 0,03	0,187 ± 0,021	0,193 ± 0,060
Fígado	3,686 ± 0,507	3,205 ± 0,543	3,171 ± 0,439	3,300 ± 0,794
Rim direito	0,482 ± 0,027	0,515 ± 0,071	0,462 ± 0,031	0,503 ± 0,096
Rim esquerdo	0,464 ± 0,044	0,470 ± 0,051	0,433 ± 0,032	0,470 ± 0,066
Intestino delg.	3,251 ^a ± 0,384	2,707 ^b ± 0,333	3,081 ^{ab} ± 0,424	3,138 ^a ± 0,689
Pâncreas	0,328 ± 0,052	0,304 ± 0,042	0,336 ± 0,100	0,311 ± 0,099
Estômago	1,114 ± 0,243	0,796 ± 0,089	1,045 ± 0,355	1,023 ± 0,314

n =8, exceto grupo GM n= 7.

As letras diferentes significam órgãos estatisticamente diferentes, considerando $p \leq 0,05$.

Com a análise dos dados, não foi observada diferença significativa entre os pesos dos órgãos, exceto para o intestino delgado, onde o grupo alimentado com soja comercial apresentou valores significativamente menores em relação aos outros grupos. Deve-se considerar que estes órgãos foram retirados dos animais com os resíduos alimentares e bolo fecal, o que pode ter causado este tipo de diferença.

4.4– Avaliação da Qualidade Protéica

4.4.1– Análise da composição de aminoácidos dos ingredientes protéicos utilizados

De acordo com McDonough *et. al.*(1990)^B, o escore aminoacídico é um método rápido e confiável para avaliar a qualidade protéica, mas o sucesso do seu uso depende de técnicas adequadas para determinar o conteúdo de aminoácidos presentes nas amostras.

Existem vários métodos para análise da composição de aminoácidos, mas os principais envolvem hidrólise ácida ou alcalina da proteína (Sarwar *et. al*, 1984) seguida por separação e quantificação de aminoácidos liberados por troca iônica (IEC), gás líquido (GLC) ou alta performance líquida cromatográfica (HPLC) (FAO/WHO, 1989).

Sob a condição de hidrólise ácida, os aminoácidos sulfurados são parcialmente destruídos e por isso, a análise deve ser feita separadamente (Cromwell *et. al.*, 1999). Os valores de metionina e cisteína são mais exatos quando determinados após oxidação para sua forma estável, ácido cistéico e sulfóxido de metionina (Sarwar *et. al.*, 1984). A treonina e a serina também sofrem destruição parcial, enquanto que a valina e a isoleucina não são completamente liberadas depois de 22-24 horas (FAO/WHO, 1989).

Neste trabalho, o perfil aminoacídico de todos os ingredientes protéicos foi determinado por hidrólise ácida à vácuo em temperatura de 110°C por 22 horas, o uso desta metodologia pode ter possibilitado a perda de parte dos aminoácidos sulfurados tanto das amostras de soja quanto da caseína.

Apesar de saber que a caseína possui menores teores de aminoácidos sulfurados do que o necessário para ratos (Reeves *et. al.*, 1993), ela não foi suplementada com o intuito de comparar o crescimento dos animais alimentados com ração a base de caseína com aqueles alimentados com ração a base de soja sem ter sido suplementada com qualquer outro aminoácido.

O perfil de aminoácidos indispensáveis das amostras de soja comercial, parental e GM comparadas ao padrão de necessidades para crianças de 2 a 5 anos (FAO/WHO, 1989) e de ratos segundo a NRC (1995 *in* Sarwar, 1996) estão apresentados na Tabela 9.

De acordo com Proll *et. al.* (1998), a soja é uma leguminosa que contém quantidades limitadas de aminoácidos sulfurados como a metionina e cistina. Com a análise, foi possível comprovar este fato e perceber que as amostras de soja não continham os teores de aminoácidos essenciais suficientes para o crescimento adequado de ratos ou mesmo de crianças, causando uma queda no valor de PDCAAS obtido.

Tabela 9: Composição de aminoácidos essenciais (mg aa/g proteína) dos ingredientes protéicos utilizados nas rações comparados às necessidades de crianças de 2 a 5 anos (FAO/WHO/UNU, 1989) e necessidades de ratos (NRC, 1995).

Aminoácidos essenciais	Caseína ⁴	Soja comercial ¹	Soja parental ¹	Soja GM ¹	FAO/WHO ²	NRC ³
Arg	29,66	-	82,66	67,52	-	28,7
His	22,51	26,00	27,20	25,90	19	18,7
Ile	42,51	41,70	40,40	41,30	28	41,3
Leu	84,42	73,00	73,30	70,90	66	71,3
Lys	69,01	58,10	59,00	57,90	58	61,3
Met + Cys	26,78	17,90	13,60	17,20	25	65,3
Phe + Tyr	91,32	83,50	83,90	81,60	63	68,0
Thr	37,17	35,60	36,80	38,30	34	41,3
Trp	-	11,60	12,50	10,40	11	13,3
Val	55,11	40,40	40,40	39,60	35	49,3

¹ - Valores resultantes de análise por hidrólise ácida e básica - n= 3 (ITAL, 12/2003).

² - FAO/WHO/UNU, 1989.

³ - NRC (1995). National Research Council. Nutrient Requirements of Laboratory Animals, 3rd Ed. NRC, National Academy of Sciences, Washington, DC. In: Sarwar, 1996.

⁴ - Valores resultantes de análise por hidrólise ácida - (Ajinomoto, 2004).

De acordo com a publicação da FAO/WHO (1989), a presença de grande quantidade de íons cloreto na amostra a ser analisada, reduz significativamente a recuperação da metionina para a determinação de aminoácidos.

Sarwar *et. al.* (1984) e Crowmell *et. al.* (1999) avaliaram os resultados de aminogramas realizados em vários laboratórios e encontraram uma grande variabilidade. Sarwar *et. al.* (1984) encontraram variação de 16,3%, para determinação da metionina, 27,7% para a cisteína e 53% para o triptofano. De acordo com Cromwell *et. al.* (1999) as metodologias utilizadas pela maioria dos laboratórios para determinação de metionina/cistina e triptofano foram oxidação da metionina para sulfóxido de metionina e ácido cistéico por tratamento com ácido perfórmico antes da hidrólise e fluorometria ou troca iônica cromatográfica após a hidrólise básica, respectivamente. Os resultados demonstraram uma variação de 5% para treonina, 0,3% para o triptofano, 6% para a isoleucina, 8% para a valina e 5% para a metionina.

Diante destes fatos, deve-se analisar cautelosamente o resultado dos aminoácidos acima citados, principalmente para a metionina, pois foi o aminoácido limitante nas três amostras de soja.

Ao observar o escore de aminoácidos resultante da relação padrão para os animais de laboratório e aminoácidos presentes nos ingredientes protéicos utilizados, vários aminoácidos estavam abaixo do exigido pela NRC (1995 *in* Sarwar, 1996) sugerindo disponibilidade muito baixa para os aminoácidos metionina+cistina em todas as dietas. Esta limitação inibiu, mas não totalmente, o crescimento e desenvolvimento dos animais e levou a alterações no seu perfil hematológico (Tabela 10).

Tabela 10: Composição de aminoácidos (mg aa/g proteína) dos ingredientes protéicos utilizados nas rações comparada às necessidades de aminoácidos essenciais para ratos de laboratório (NRC, 1995 *in* Sarwar, 1996) e escore calculado.

Aas	*Padrão NRC	Caseína	² escore	Soja	¹ escore	Soja Parental	¹ escore	Soja GM ¹	Escore
Hist	18,70	22,51	1,20	26,00	1,39	27,20	1,45	25,90	1,39
Ile	41,30	42,51	1,03	41,70	1,01	40,40	0,98	41,30	1,00
Leu	71,30	84,42	1,18	73,00	1,02	73,30	1,03	70,90	0,99
Lys	61,30	69,01	1,13	58,10	0,95	59,00	0,96	57,90	0,94
Met + Cys	65,30	26,78	0,41	17,90	0,27	13,60	0,21	17,20	0,26
Phe + Tyr	68,00	91,32	1,34	83,50	1,23	83,90	1,23	81,60	1,20
Thr	41,30	37,17	0,90	35,60	0,86	36,80	0,89	38,30	0,93
Trp ³	13,30	14,00	1,05	11,60	0,87	12,50	0,94	10,40	0,78
Val	49,30	55,11	1,12	40,40	0,82	40,40	0,82	39,60	0,80

* : Valores de referência para ratos (NRC, 1995 *in* Sarwar, 1996)

¹ - Valores resultantes de análise por hidrólise ácida e básica (ITAL, 12/2003)

² - Valores resultantes de análise por hidrólise ácida (Ajinomoto, 2004).

³ - Valor estimado de aminoácido na caseína, proveniente de FAO/WHO/UNU (1989).

Segundo Young & Pellet (1994), ratos necessitam de maiores teores de aminoácidos sulfurados que humanos, o que explica os resultados negativos originados de ensaios *in vivo*, desqualificando proteínas de várias cultivares vegetais erroneamente. Neste ensaio foi utilizada soja em estado natural, contendo, entre

outros nutrientes, fatores antinutricionais incapazes de serem inativados por completo, minimizando o aproveitamento da proteína desta leguminosa.

A composição de aminoácidos das amostras de soja apresentaram teores insuficientes de metionina para suprir as necessidades de aminoácidos para manutenção do crescimento e do desenvolvimento normais de crianças de 2 a 5 anos (Tabela 11).

Tabela 11: Composição de aminoácidos (mg aa/g proteína) dos ingredientes protéicos utilizados nas rações comparada às necessidades de aminoácidos essenciais para crianças de 2-5 anos (FAO/WHO, 1991) e escore calculado.

Aas	Padrão	Caseína ²	Escore	Soja ¹	Escore	Soja parental ¹	Escore	Soja GM ¹	Escore
His	19	22,51	1,18	26,00	1,37	27,20	1,43	25,90	1,36
Ile	28	42,51	1,52	41,70	1,49	40,40	1,44	41,30	1,48
Leu	66	84,42	1,28	73,00	1,11	73,30	1,11	70,90	1,07
Lys	58	69,01	1,19	58,10	1,00	59,00	1,02	57,90	1,00
Met + Cys	25	26,78	1,07	17,90	0,72	13,60	0,54	17,20	0,69
Phe + Tyr	63	91,32	1,45	83,50	1,33	83,90	1,33	81,60	1,30
Thr	34	37,17	1,09	35,60	1,05	36,80	1,08	38,30	1,13
Trp ³	11	14,00	1,27	11,60	1,05	12,50	1,14	10,40	0,95
Val	35	55,11	1,57	40,40	1,15	40,40	1,15	39,60	1,13

* : Valores de referência para crianças de 2 a 5 anos (1989)

¹ - Valores resultantes de análise por hidrólise ácida e básica (ITAL, 12/2003)

² - Valores resultantes de análise por hidrólise ácida (Ajinomoto, 2004).

³ - Valor estimado de aminoácido na caseína, proveniente de FAO/WHO/UNU (1989).

Este resultado demonstrou baixa disponibilidade dos aminoácidos essenciais, ou seja, em quantidades consideradas insuficientes para a boa manutenção da saúde corporal. Este fato mostra que a soja necessita de suplementação de aminoácidos sulfurados, para melhor aproveitamento de sua proteína tanto para ratos quanto para crianças.

Young *et al.* (1990) sugerem que quando o consumo dietético de proteína é menor que o suficiente para as necessidades usuais (deficiência primária) ou é inadequado para suprir demanda metabólica aumentada no hospedeiro devido a infecções ou estresse (deficiência secundária), poderão ocorrer alterações

metabólicas que, a princípio, favoreceriam a diminuição da demanda por nutrientes e auxiliariam na reorganização das várias rotas e funções metabólicas do nutriente envolvido. Se o suprimento inadequado é mantido, o metabolismo protéico sofre transformações bioquímicas para alterar as concentrações deste nutriente nos tecidos e em compostos e/ou metabólitos que contenham nitrogênio fisiologicamente importante.

4.4.2– Análise da digestibilidade *in vivo* e cálculo do PDCAAS

Embora o cálculo do escore aminoacídico baseado nas necessidades do ser humano seja a forma mais direta de avaliação da qualidade de uma proteína, este método tem limitações, pois não considera a digestibilidade e disponibilidade dos aminoácidos que podem variar de um alimento a outro (McDonough *et. al.*, 1990)^A. Foi sugerido, então, determinar a correção para digestibilidade real ou disponibilidade biológica por meio do uso da quantidade de nitrogênio de origem não alimentar numa dieta livre de proteínas (Friedman *et. al.*, 1991).

Os valores de ingestão de nitrogênio significativamente diferentes entre os grupos inviabilizaram a comparação direta dos valores de digestibilidade aparente entre os grupos alimentados com soja parental e GM e destes dois grupos com os outros.

De acordo com a FAO/WHO (1989), valores de digestibilidade real são independentes do consumo protéico, uma vez que consideram o nitrogênio fecal metabólico, enquanto que na digestibilidade aparente, os valores se tornam maiores à medida que aumenta o consumo de proteínas. Desta forma, considera-se que a digestibilidade real é um resultado mais fidedigno.

Os valores das digestibilidades real e aparente encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12: Valores obtidos de digestibilidade real e aparente com os ensaios *in vivo*

Grupos de animais	Digestibilidade real	Digestibilidade aparente
Controle	93,07 ± 2,06	89,92 ± 2,04
C/ soja comercial	83,27 ± 2,36	80,04 ± 2,38
C/ soja parental	81,74 ± 0,28	78,95 ± 0,41
C/ soja GM	81,85 ± 4,05	79,36 ± 4,13

Os valores de digestibilidade real e aparente se mostraram maiores no grupo alimentado com caseína e valores próximos entre os grupos alimentados com soja. Com relação aos valores encontrados com o consumo das sojas parental e GM, foram menores se comparados aos do grupo da soja comercial, demonstrando, a princípio, melhor qualidade que as outras

Na verdade, os valores de digestibilidade real obtidos das três amostras de soja pelos ensaios *in vivo* foram baixos. Isto pode ter ocorrido devido a inativação inadequada de lectinas e/ou fatores anti-nutricionais presentes na soja ou mesmo ter sido analisada por métodos que subestimaram seu perfil aminoacídico.

De acordo com Lajolo e Genovese (2002), a destruição destes compostos antinutricionais ocorre, embora alguma atividade residual possa ser encontrada quando a temperatura do aquecimento não for suficiente para inativá-los ou, mesmo quando o aquecimento for muito alto, prejudicando a qualidade da proteína. O mesmo se deve aos fitatos presentes na soja, pois são resistentes a altas temperaturas e podem prejudicar o crescimento e desenvolvimento dos animais (Liemer, 1994).

O cálculo do PDCAAS representa a qualidade nutricional de proteínas destinadas ao consumo humano, e é dado pelo escore químico corrigido pela digestibilidade real ou verdadeira. Os valores de PDCAAS (expostos na Figura 3) encontrados foram 1,01 para o grupo controle, 0,60 para o grupo alimentado com ração a base de soja comercial, 0,445 para os grupos alimentados a base de sojas parental e GM.

Figura 3: Escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade real (PDCAAS) dos ingredientes protéicos

Os valores de PDCAAS encontrados são baixos se comparados aos encontrados em literatura para proteína de soja concentrada ou isolada, indicando um vegetal de menor valor biológico.

4.4.3– Análise da retenção protéica líquida (NPR) e utilização protéica líquida (NPU)

A diferença significativa entre os valores de nitrogênio ingeridos pelos grupos de animais prejudicou a análise dos resultados de NPR e NPU (Figuras 4 e 5, respectivamente), inviabilizando a comparação direta entre eles. Porém, em vista dos resultados encontrados em literatura, os valores obtidos de NPR e NPU são coerentes, demonstrando valores próximos do esperado.

Segundo Poltronieri *et. al.*(2000), é possível obter um valor estimado de ferro absorvido se utilizada uma curva padrão obtida com valores de absorção deste mineral por animais alimentados com dieta padrão contendo diferentes teores de ferro heme. Sob esta perspectiva, seria possível, então, traçar uma curva padrão com valores de NPR e gramas de nitrogênio provenientes de caseína em busca da adequação dos teores de NPR obtidos em ensaio com proteína de soja. Esta relação demonstra o comportamento dos animais perante o tipo de proteína ingerida.

Valores de nitrogênio consumidos por ratos tipo Wistar, com peso inicial em torno de 50-70g, mantidos em gaioleiros metabólicos por um período mínimo de 10 dias foram coletados de ensaios realizados em laboratório de Nutrição da FCF/USP. Foram obtidos os valores de consumos totais de caseína e nitrogênio, juntamente com valores resultantes de NPR para construir a curva padrão.

A equação proposta pelos autores ($y = 6,5645e^{-0,169x}$, onde y = valor de NPR e x = gramas de nitrogênio ingerido) foi utilizada para possibilitar um cálculo de substituição dos valores de nitrogênio da caseína pelos valores de nitrogênio ingerido pelos animais alimentados com a proteína da soja. Isto permite uma visualização de valores de NPR estimados, caso os animais tivessem ingerido aquela quantidade referida em nitrogênio proveniente de caseína e não de soja e, a partir daí, calcular uma porcentagem de adequação em relação à caseína.

Figura 4: Valores de retenção protéica líquida (NPR) **Figura 5: Valores de Utilização Protéica Líquida (NPU)**

Por meio desse processo, obteve-se uma porcentagem de adequação de 80, 79 e 77 % para os grupos alimentados com soja comercial, parental e GM, respectivamente, valores bem acima daqueles obtidos no cálculo do PDCAAS.

4.5 – Análises hematológicas

Foram realizados análises hematológicas dos animais e os resultados da concentração de hemoglobina, do volume hematócrito e de reticulócitos presentes no sangue periférico dos animais que receberam as diferentes dietas estão expressos na Tabela 13.

Tabela 13: Concentração de hemoglobina, do volume hematócrito e do percentual de reticulócitos presentes no sangue periférico de ratos alimentados com diferentes tipos de soja.

	Controle	Aprotéico	Soja Comercial	Soja Parental	Soja GM
	n= 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 7
Hemoglobina g/dl	13,88 ± 1,06	12,2 ^{c,d} ± 1,83	13,21 ± 1,45	14,38 ± 1,64	14,64 ^b ± 0,5
Hematócrito %	42,13 ± 4,9	32,38 ^{a,b,c,d} ± 3,6	37,86 ± 5,5	43,25 ^b ± 3,5	41,14 ± 1,8
Reticulócitos %	4,97 ± 1,36	0,13 ^{a,b,d} ± 0,12	2,42 ^a ± 0,69	3,18 ^a ± 1,10	2,52 ^a ± 0,93

a – diferença significativa ($P \leq 0,05$) quando se compara o grupo controle com o grupo comercial, grupo convencional, grupo GM e grupo aprotéico.

b – diferença significativa ($P \leq 0,05$) quando se compara o grupo comercial com o grupo convencional, grupo GM e grupo aprotéico.

c – diferença significativa ($P \leq 0,05$) quando se compara o grupo convencional com o grupo GM e grupo aprotéico.

d – diferença significativa ($P \leq 0,05$) quando se compara o grupo GM com o grupo aprotéico.

Os resultados das análises hematológicas de cada animal estão demonstrados nas Tabelas 19, 20 e 21, dispostas em anexo.

A concentração de hemoglobina de todos os grupos, exceto o grupo que recebeu ração à base de soja comercial, diferiu em relação ao grupo aprotéico. ($p \leq 0,08$ do grupo controle x aprotéico). Comparando-se entre si os grupos que receberam ração à base de soja comercial, convencional e GM, verifica-se que os mesmos não diferem entre si no parâmetro hemoglobina, exceto grupo que recebeu ração a base de soja comercial em relação ao que recebeu com soja GM.

Quanto à porcentagem de hematócrito, todos os grupos apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo aprotéico. Apenas o grupo de animais que recebeu a ração à base de soja comercial apresentou valor distinto em relação ao grupo alimentado com ração à base de soja convencional.

O número de reticulócitos foi significativamente menor em todos os grupos quando comparados ao grupo controle e significativamente maior quando comparados ao grupo aprotéico. No entanto, entre os grupos alimentados com ração à base de soja não houve diferença estatística.

O baço e a medula óssea permanecem como órgãos hematopoéticos em roedores após o nascimento, diferentemente dos humanos. Além dessa, há diferenças com relação à cinética de mobilização das células entre os diferentes compartimentos anatômicos, ou seja, órgãos hematopoéticos, sangue periférico e compartimentos extravasculares (Lee *et. al.*, 1999; Bannermann, 1983).

Com relação a série eritróide deve-se lembrar que, em ratos, a vida média da hemácia na circulação é em média, de 80 a 90 dias. Portanto, como este experimento foi de 14 dias, a maior parte da população de eritrócitos e, portanto, de hemoglobina, já havia sido produzida, não tendo sido influenciada pela dieta.. Os dados de hemoglobina e hematócrito encontrados evidenciam que o tratamento com diferentes tipos de rações não induziu processo hemolítico e, ou hemorrágico, que causaria a anemia. Para verificar eventuais efeitos dos diferentes tipos de rações sobre a eritropoese, os reticulócitos devem ser avaliados. Na fase final da eritropoese, os eritroblastos ortocromáticos expulsam o núcleo, originando os reticulócitos, que permanecem ainda na medula óssea por cerca de 2 a 3 dias, quando, então já na etapa de eritrócitos, ganham a circulação. Contudo, fisiologicamente, em humanos, cerca de 1% de reticulócitos entram na circulação, diariamente. Desta forma, a determinação deste parâmetro na circulação é um indicador da atividade eritropoética. Em ratos adultos, os valores de reticulócitos variam em torno de 4% (Stromberg, 1992), apesar dos ratos do biotério de experimentação da FCF/USP apresentarem valores entre 4 e 9% . Portanto, frente aos resultados obtidos, podemos afirmar, que a eritropoese está sendo modificada pelas diferentes rações experimentais utilizadas. O valor de reticulócitos do grupo aprotéico evidencia severo comprometimento da eritropoese.

Borelli et al, 1995 relata que camundongos submetidos dieta hipoprotéica apresentam comprometimento de órgãos hematopoéticos, especialmente do setor mielóide e mais recentemente (Borelli et al, 2004 - comunicação pessoal), caracterizou que a anemia presente no modelo de desnutrição utilizado não é de natureza ferropriva e, sim devida a depleção de células primitivas dos órgãos hematopoéticos. De acordo com Cook (1980), há uma clara distinção entre a anemia causada pela falta de proteínas, como no caso de crianças que desenvolveram o Kwashiorkor, e aquela conhecida como ferropriva, onde ocorre deficiência de ferro.

Com relação ao número de leucócitos presentes no sangue circulante (Tabela 14), observou-se que em relação ao grupo controle, apenas o grupo alimentado com ração sem proteína e o grupo tratado com soja comercial, apresentaram redução significativa. O grupo que recebeu ração à base de soja comercial apresentou valores significativamente menores que o grupo alimentado com ração à base de soja convencional e, com relação ao grupo que recebeu ração à base de soja GM, diferiu apenas em relação ao aprotéico, sendo semelhante aos outros grupos.

Ao analisar os diferentes tipos de leucócitos presentes na circulação observa-se que todos os grupos apresentaram significativa redução do número de monócitos circulantes em relação ao grupo controle. Quase todos os grupos experimentais, exceto o alimentado com ração à base de soja convencional parental, apresentaram valores de neutrófilos levemente reduzidos em relação ao grupo controle, no entanto a análise estatística não apresentou essa diferença como significativa. Porém, este fato pode ser creditado ao grande desvio padrão observado e, talvez, se o número de animais for ampliado, estes valores podem assumir significado estatístico. Deve-se lembrar que a distribuição entre o compartimento “marginal” e circulante dos leucócitos na circulação é modificado por várias situações fisiológicas e patológicas, incluindo-se aqui os níveis de glicocorticóides. Portanto, é possível que o desvio ora observado seja decorrente do estresse envolvido na manipulação dos animais no momento da anestesia e coleta.

Com relação aos eosinófilos, o resultado apresentado sugere ausência de resposta alérgica ao alimento geneticamente modificado em questão, o qual, segundo Metcalfe *et. al.* (1996), estes alimentos, apesar do novo gene expressar-se

em baixo nível e seu produto representar uma pequena porcentagem do total de proteínas do vegetal, são capazes de desenvolver processo alergênico.

Nota-se que o grupo alimentado com soja comercial apresentou resultados significativamente inferiores na maioria dos índices, se comparado ao grupo controle.

Uma vez que as células não apresentam capacidade de auto-regeneração, o influxo no sangue periférico é determinado pelo movimento de células do compartimento de proliferação, sendo, então, dependentes da síntese de novas

Tabela 14: Número total de leucócitos, monócitos, segmentados e linfócitos presentes no sangue periférico de ratos alimentados com diferentes tipos de soja.

	Controle	Aprotéico	Soja Comercial	Soja Parental	Soja GM
	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 7
Leucócitos tt/mm³	3819 ± 1186	2769 ^{a,c,d} ± 996	2443 ^a ± 823	4219 ^b ± 1085	3836 ± 1546
Eosinófilos/mm³	0	0	0	0	0
Monócitos/mm³	108,4 ± 55,3	26,38 ^a ± 45,83	19,21 ^a ± 14,65	57,56 ^{a,b} ± 57,84	55,21 ^a ± 55,75
Segmentados/mm³	150,8 ± 100,29	86,25 ± 51,59	80,57 ± 72,12	172,6 ± 135	89,93 ± 61,28
Linfócitos/mm³	3577 ± 1142	2656 ^c ± 946	2343 ^a ± 764	3989 ^b ± 1069	3717 ± 1471

a – diferença significativa (P (0,05) quando se compara o grupo controle com o grupo comercial, grupo convencional, grupo GM e grupo aprotéico.

b – diferença significativa (P (0,05) quando se compara o grupo comercial com o grupo convencional, grupo GM e grupo aprotéico.

c – diferença significativa (P (0,05) quando se compara o grupo convencional com o grupo GM e grupo aprotéico.

d – diferença significativa (P (0,05) quando se compara o grupo GM com o grupo aprotéico.

proteínas. A síntese de novos polipeptídeos ocorre a partir da participação de vários nutrientes como aminoácidos, vitaminas, minerais, além daqueles que fornecem energia. Sem eles, a síntese se torna comprometida, prejudicando a qualidade e quantidade de células imunocompetentes produzidas.

As alterações na resposta imune ocorrem rapidamente no curso da deficiência nutricional como um fator sensitivo indicador do estado de saúde, além disso, podem, ainda, indicar a segurança ou os limites muito baixos de ingestão de um determinado alimento (Chandra, 1999). Deficiências dietéticas de certos aminoácidos diminuem as respostas aos anticorpos (Chandra, 1981). De acordo com Taylor *et. al.* (1997), a glutathione (L-γ-glutamyl-L-cisteinylglycine) é uma enzima de

grande importância para a proliferação e ativação dos linfócitos T e é primariamente dependente da disponibilidade de cistina e metionina da dieta.

De acordo com Jennings *et. al.* (1992), a restrição de proteínas pode prejudicar a síntese de polipetídeos responsáveis pelas proteínas circulantes de defesa, através da alteração da magnitude da resposta inflamatória e hormônio-neural envolvida na regulação desta síntese. Keusch (2003) confirma que, sem a habilidade de construir novos DNAs e RNAs para divisão celular e síntese protéica, a resposta defensiva pode ficar comprometida.

5 - Conclusões

A elaboração deste trabalho forneceu subsídios para o argumento sobre a segurança da soja para o consumo humano e animal e permitiu a obtenção das seguintes conclusões:

1. animais que receberam dietas contendo em torno de 10 % de proteínas de soja demonstraram desenvolvimento normal;
2. a inspeção macroscópica e a massa dos órgãos internos dos animais não evidenciaram diferenças significativas entre os grupos experimentais, mesmo se comparados ao grupo controle;
3. os animais alimentados com rações contendo as amostras de soja não apresentaram diferenças significativas quanto ao teor de nitrogênio excretado, indicando um aproveitamento protéico aparentemente semelhante.
4. os valores de PDCAAS dos grupos alimentados com as amostras de soja indicaram baixo aproveitamento do nitrogênio protéico se comparado ao controle à base de caseína;
5. os parâmetros eritrocitários encontrados permitiram concluir que os animais apresentaram baixa produção de células, se comparado ao controle;
6. os parâmetros imunológicos demonstraram que os animais estavam com número de células abaixo do normal, se comparado ao grupo controle, demonstrando fragilidade do sistema de defesa.

Estas conclusões geram evidências de que a qualidade nutricional da proteína de soja GM não apresentou alterações significativas entre as amostras comercial e parental.

6 - Referências Bibliográficas

- ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS. Relatório assinado por cientistas de sete academias: Academia Brasileira de Ciências, Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos, Royal Society de Londres, Academia de Ciências da China, Academia de Ciências da Índia, Academia de Ciências do México e Academia de Ciências do Terceiro Mundo. **Plantas Transgênicas na Agricultura**. Londres, 2000, p.1-44. Disponível em: <http://www.abc.org.br>
- ANSTEAD, G.M.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; YANG, J.; PEREZ, L.E.; MELBY, P.C. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infect. Immun.**, v.69, n.8, p 4709-4718,2001
- ARMOUR, J.C.; PERERA, R.L.C.; BUCHAN, W.C.; GRANT, G. Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. **J. Sci. Food Agric.**, v. 78, p. 225-231, 1998.
- ASCHKENASY, A. Effect of a protein-free diet on lymph node and spleen cell response in vivo to blastogenic stimulantes. **Nature**, v. 254, p.63-65, 1975.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC**. 13. ed. Washington, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC**. 13. ed. Washington, 1992.
- ATHENS, J.W.; RAAB, S.O.; HAAB,O.P.; MAUER,A.M.; ASHENBRUCKER,H.; CARTWRIGHT, G.E.; WINTROBE, M.M. Leukokinetic studies III. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. **J.Clin. Invest.**, v.40, p. 159-164, 1961.
- AULRICH, K.; BOHME,H.; DAENICKE, R.; HALLE, I.; FLACHOWSKY, G. Novel feeds – a review of experiments at our Institute. **Food Research Int.**, v. 35, p. 285-293, 2002.
- EVERY, Dennis T. Why we need food biotechnology. **Food Technology**, v.54, p. 132, 2000.
- BANNERMAN, R.M. Hematology In: Mouse in Biomedical Research, vol. III, p.301-304, 1983.

- BEISEL, W.R. Single nutrients and immunity. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 35 (suppl.), p.417-468, 1982.
- ^ABELÉM, M. A F.; FELBERG, E.W.I.; GONÇALVES, E.B.; CABRAL, L.C.; CARVALHO, J.L.V. de; SUNDFELD, E.; NUTTI; M.R. Equivalência substancial da composição de alimentos derivados de plantas geneticamente modificadas (PGM) – Procedimentos propostos para o Brasil. **Biotec. Ciên. Desenv.**, n.14, p.140-150, 2000.
- ^BBELÉM, M. A F.; FELBERG, E.W.I.; SAMPAIO, ; NUTTI; M.R. Biossegurança de alimentos derivados da biotecnologia rDNA. **Biotec. Ciên. Desenv.** , v.18, p.34-40, 2000.
- BEUTLER, E.; WILLIAMS, W. J. **Williams Hematology**, 6 ed., EUA, Mc-Graw: Hill, 2001, 1668 p.
- BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and cell mobilization into inflammatory reactions in mice. **Nutr. Res.** , v. 15, p.1477-1485, 1995.
- BORLAUG, Norman; WATSON, James; KHUSH, Gurdev. Declaração - AgBioWorld Foundation. Disponível em : <http://www.agbioworld.org> Acesso em 16/02/2000.
- BROWN, B.A. **Principles and procedures**. 6 ed., Londres, ed.Lea & Febiger, 1993.
- CHANDRA, R.K. Immunodeficiency in Undernutrition and Overnutrition. **Nutr Reviews.**, v. 39, n. 6, p. 255-231, 1981.
- CHANDRA, R.K. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. **Am. J. Clin. Nutr.**, Newfoundland, v. 53, p. 1087-1101, 1991.
- CHANDRA, R.K. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Newfoundland, v. 93, p. 14304-14307, 1996.
- CHANDRA,R.K. Nutrition Immunology: from the Clinic to Cellular Biology and Back Again. **Proceed. Nutr. Soc.**, 58, 681-683, 1999.
- CHANDRA, R.K. Nutrition and the Immune System from Birth to Old Age. **European J. Clin. Nutr.**, 56, (3), S73-S76, 2002.

- CHANDRA, R.K; SARCHIELLI, P. Body size and immune responses. **Nutrition research**, v. 16, n.11/12, p. 1813-1819, 1996.
- CHASSY, B.M. Food safety evaluation of crops produced through biotechnology. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 21 (suppl.), n. 3, p.166-173, 2002.
- CLUGSTON, G & SMITH, T.E. Global nutrition problems and novel foods. **Asia Pacific J Clin Nutr**, v.11, n. 6(suppl.), p. 100-111, 2002.
- COCKBURN, A. Assuring the safety of genetically modified (GM) foods: the importance of an holistic, integrative approach. **J. Biotech.**, v. 98, p. 79-106, 2002.
- COOK, J.D. Iron. Ed. Churchill Livingstone, p 180, 1980.
- COSTA, Sérgio O P. da. Alimentos Transgênicos em Saúde Pública. **CADERNOS POSGRAD – Cadernos de Pós-graduação da Universidade Católica de Santos**, Santos, n.4, n.p., 2000.
- COSTA, João. **Dicionário Rural do Brasil**. Editora Campus, Rio de Janeiro, p. 427, 2003.
- COZZOLINO, S.M.F. **Valor nutricional da biomassa de *saccharomyces cerevisiae* – Estudo em gerações sucessivas de ratos**, São Paulo, 1982, Tese de doutorado, Faculdades de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- CRADDOCK, C.G.; PERRY, S.; VENTZKE, L.E.; LAWRENCE, J.S. Evaluation of marrow granulocyte reserves in normal and disease states. **Blood** , v.15, p.840-852, 1959.
- CROMWELL, G.L.; CALVERT, C.C.; CLINE, T.R.; CRENSHAW, J.D.; EASTER, R.A.; EWAN, R.C.; HAMILTON, C.R.; HILL, G.M.; LEWIS, A J.; MAHAN, D.C.; MILLER, E.R.; NELSEN, J.L.; PETTIGREW, J.E; TRIBBLE, L.F; VEUM, T.L.; YEN, J.T. Variability among sources and laboratories in nutrient analyses of corn and soybean meal. **J. Anim. Sci.**, v. 77, p.3262-3273, 1999.
- CROMWELL, G.L; LINDEMANN, M.D.; RANDOLPH, J.H.; PARKER, G.R.; COFFEY, R.D.; LAURENT, K.M.; ARMSTRONG, C.L.; MIKEL, W.B.; STANISIEWSKI, E.P.; HARTNELL, G.F. Soybean meal from Roundup Ready or conventional soybeans in diets for growing-finishing swine. **J. Anim. Sci.** , v.80, p.708-715, 2002.

- CRONKITE, E.P.; FLIEDNER, T.M. Granulocytopoiesis. **N.Eng. J. Med.**, v.270, 1347-1352, 1964.
- CSA Report. Council on Scientific Affairs/ American Medical Association. **Genetically Modified Crops and Foods (I-00)**, 2000. Disponível em: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/article/2036-4030.html>
- CTNBio (s/d) **Transgênicos**. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília.
- DARRAGH, A .J.; HODGKINSON, S.M. Quantifying the digestibility of dietary protein. **J. Nutr.**130:1850S-1856S, 2000.
- DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical haematology**. 8ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995. p. 57-58.
- DEXTER, T.M.; PONTING, I.L.O; ROBERTS, R.A.; SPOONCER, E.; HEYWORTH, C.; GALLAGHER, J.T. Growth and differentiation of hematopoietic stem cells. In: **Cell Physiology of Blood** , GUNN, R.B.& PARKER, J.C., ed. Rockefeller University Press, 1988.
- FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein quality evaluation. Paper 51, EUA, 1989.
- FAO/WHO – FOOD, NUTRITION AND AGRICULTURE. **Nutrients requirements nº 2/3 – Recent developments in protein quality evaluation**, Roma, 1991.
- FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Consultation - Biotechnology and food safety. Food Nutrition Paper, 61. Roma, 1996.
- FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Allergenicity. Geneva, 2000.
- FRIEDMAN, Mendel. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 6- 29, 1996.
- FRIEDMAN, M; BRANDON, D.L.; BATES, A.H.; HYMOWITZ, T. Comparison of a commercial soybean cultivar and an isoline lacking the Kunitz trypsin inhibitor:composition, nutritional value, and effects of heating. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 327-335, 1991.
- GARCIA,M.C.; TORRE, M.; MARINA, M.L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**, v. 37, n. 4, p. 361-391, 1997.

- GEORGE, L.L.; ALVES, C.E.R; CASTRO, R.R.L. **Histologia Comparada**, 1^a, Roca, 1985.
- HAMMOND, B. G.; VICINI, J.L.; HARTNELL, G.F; NAYLOR, M.W.; KNIGHT, C.D.; ROBINSON, E.H.; FUCHS, R.L.; PADGETTE, S.R. The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. **J. Nutr.**, v. 126, p. 717-727, 1996.
- HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. **Food Technol.**, 74-77, 1994.
- HERMAN, E.M.; HELM, R.M.; JUNG, R.; KINNEY, A.J. Genetic Modification Removes an Immuno dominant Allergy from Soybean. **Plant Physiol.** 132, 36-43, 2003
- HOFFER, L. Clinical nutrition: protein-energy malnutrition in the inpatient. **Canad. Med. Assoc.**, v.165, n.10, p.1345-9, 2001.
- HOLT, J.S.; POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.44, p. 203-229, 1993.
- HORAN, F.E. Soy protein products and their production. **J. Am. Oil Chemists's Soc.**, v.51, p.67A-73A, 1974.
- JENNINGS, G. BOURGEOIS, C.; ELIA, M. The Magnitude of the Acute Phase Protein Response is Attenuated by Protein Deficiency in Rats. **J. Nutr**, v. 122, p.1325-1331, 1992.
- JONES, J.L. Genetic engineering of crops: its relevance to the food industry. **Trends Food Sci Technol.**, v.3, p. 54-9, 1992.
- KAY, M. R. Dietary fiber. **Journal of lipid research**, 23: 221-242, 1982.
- KEUSCH, G.T. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. **J. Nutr.**, v. 133 (suppl.), p. 336-340, 2003.
- KHUSH, G.S. Challenges for meeting the global food and nutrient needs in the new millennium. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 60, p.15-26, 2001.
- KUENDER, D Y & HILL, H.R. Functional biology of the granulocyte-monocyte series. In: Hematology- Clinical and Laboratory Practice, vol. II, p. 1077-1092, 1993.

- KUIPER, H.A; KLETER, G.A; NOTEBORN, H.P.J.M.; KOK, E.J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant J.** , v.27, n. 6, p.503-532, 2001.
- KUIPER, H.A; KLETER, G.A; NOTEBORN, H.P.J.M.; KOK, E.J. Substantial equivalence – an appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods? **Toxicology** , v. 181-182, p. 427-431, 2002.
- KOK, E.J.; KUIPER, H.A. Comparative safety assessment for biotech crops. **Trends Biotech.**, v.21, n. 10, p.439-444, 2003.
- LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Nutricional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.6592-6598, 2002.
- LEE, G.; FORESTER, J.; LUKENS, J.; GREER, J.P.; RODGERS, G.M. **Wintrobe's clinical hematology**. 10^a ed., Pliladelphia, ed. Lippinot Willians & Wilkins, 1999, 1291 p.
- LIENER, I.E. Implications of Antinutritional Components in Soybeans Foods. **Crit. Rev. Food Sci. Nut**, v. 34, n.1, p. 31-67, 1994.
- LIMA,A.O.; SOARES, J.B., CALIZZI, J. CANÇADO, J.R. **Métodos de Laboratório Aplicado a Clínica:Técnica e interpretação**. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
- LIPTON, M. Challenges to meet: food and nutrition security in the new millennium. **Proc. Nutr. Soc.** , v. 60, p.203-214, 2001.
- MADDEN, D. **Food biotechnology and introduction**. International Life Institute and ILSI Europe, Bélgica, p.38, 1995.
- MAO, L.; LEE, K.; ERBERSDOBLER, H.F. Effects of heat treatment on lysine in soya protein. **J. Sci. Food Agric.**, v. 62, p. 307-309, 1993.
- MARQUEZ, U.M.L;LAJOLO, F.M. *In vivo* digestibility of bean (phaseolus-vulgaris-l) proteins-the role of endogenous protein. **J. Agr. Food Chem.**, v.39, n.7, p.1211-1215 , 1991.
- MARQUEZ, U.M.L., BARROS, R.M.C., LAJOLO, F.M.Chemically determined total and available methionine in beans (*Phaseolus vulgaris L*) and isolated protein fractions. **Food Chemistry**, v.55, n. 2, p. 179-184, 1996.
- ^AMCDONOUGH, F.; STEINKE, F.H.; SARWAR, G.; EGGUM, B.O.; BRESSANI, R.; HUTH, P.J.; BARBEAU, W.E.; MITCHELL, G.V.; PHILLIPS, J.G. *In vivo*

- rat assay for true protein digestibility: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 73 (5), 801-805, 1990.
- ^BMCDONOUGH, F.; SARWAR, G.; STEINKE, F.H.; SLUMP, P.; GARCIA, S.; BOISEN, S. In Vitro assay for protein digestibility: interlaboratory study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 73 (4), 622-625, 1990.
- MECHANIC, R.C.; FREI, E.; LANDY, M.; SMITH, W.W. Quantitative studies of human leukocytic and febrile response to single and repeated doses of purified bacterial endotoxin., **J. Clin. Invest.**, v.41, p.162-172, 1962.
- MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70 (suppl.), p. 439-450, 1999.
- METCALF, D. **Clonal culture of hemopoietic cell, techniques and applications**, Elsevier, 1984.
- METCALFE, D.D.; ASTWOOD, J.D.; TOWNSEND, R.; SAMPSON, H.Á.; TAYLOR, S.L.; FUCHS, R.L.. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. **Crit. Rev Food Sci Nutr**, v.36 (suppl.), 5165-5186, 1996.
- MILLER, D.S.; BENDER, A.E. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. **Brit. J. Nutr.** , v. 9, p.382-388, 1953.
- MIURA, E.M.Y.; BINOTTI, M.A.R.; CAMARGO, D.S.; MIZUBUTI, I.Y.; IDA, E.I. Avaliação biológica de linhagem de soja com baixa atividade de inibidores de tripsina. **Ver. Bras. Zootec.** , Viçosa, v.29, n.6, p.2000.
- MOFFAT, A. S. Finding New ways to Protect Drought-Stricken Plants. **Science**, v. 296, p. 1226-1229, 2002.
- MORRISON, S.J.; SHAH, N.M.; ANDERSON, D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. **Cell**, v. 88, 287 -298, 1997.
- NORDLEE, Julie; et al. Identification of a Brazil-Nut Allergen in transgenic soybeans. **N Engl J Med**, vol.334, n.11,p.688-692, 1996.
- NOVAK, W.K.; HASLBERGER, A. G. Substantial Equivalence of Antinutrients and Inherent Plant Toxins in Genetically Modified Novel Foods. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, p.473-483, 2000.
- OECD – ORGANISATION ECONOMIC CO-OPERATION OF DEVELOPMENT.
Safety evaluation of foods derived from modern biotechnology, concepts and

- principles.** Paris, p. 74, 1992. Disponível em : <http://www.oecd.org/subject/biotech/>. Consultado em 11/01/2004.
- PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LaVALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A.; PESCHKE, V.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B.; KISHORE, G.M. development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Sci.**, v. 35, p.1451-1461, 1995.
- PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. **Physiol. Review**, v. 80, n.3, p. 1055-1081, 2000.
- PENG, J.; RICHARDS, D.E.; HARTLEY, N.M.; MURPHY, G.P.; DEVOS, K.M.; FLINTHAM, J.E.; BEALES, J.; FISH, L.J.; WORLAND, A.J.; PELICA, F.; SUDHAKART, D.; CHRISTOU, P.; SNAPE, J.W.; GALE, M.D.; HARBERD, N.P. "Green revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators. **Nature**, v. 400, p.256-261, 1999.
- POLTRONIERI, F; ARÊAS, J.A.G; COLLI, C. Extrusion and iron bioavailability en chickpea (*Cicer arietinum L.*) , **Food Chem.**, v.70, n. 2, p.175-180,2000.
- POVINELI, K.L.&FINARDI FILHO, F. As múltiplas Funções das Lectinas Vegetais. **Nutrire**, São Paulo, v.24, p. 135-156, 2002.
- PROLL, J.; PETZKE, K.J.; EZEAGU, I. E.; METGES, C.C. Low nutritional quality of unconventional tropical crop seeds in rats. **J. Nutr.** 128: 2014-2022, 1998.
- PROSKY, L.;ASP, N.G.; SCHWEIZER, T.F.; DE VRIES, J. W; FURDA, I. Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods, food products. Colaborative sutdy. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 75, n. 2, p. 360-367, 1992.
- PUSZTAI, A.; GRANT, G.; BARDOCZ, S.; ALONSO, R.; CHRISPEELS, M.J. ; SCHROEDER, H.E.O; TABE, L.M. ; HIGGINS, T.J.V. Expression of the insecticidal bean alfa-amilase inhibitor transgene has minimal detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% os the di **J. Nutr.**, v.129, n. 8, p. 1597-1603, 1999.
- QIN, G.X.; VERSTEGEN, M.W.A; POEL, A.F.B. van der. Effect of temperature and time during steam treatment on the protein quality of full-fat soybeans from

- different origins. **J. Sci. Food Agric.**, Wageningen/Changchun, v.77, p. 393-398, 1998.
- RACKIS, J.J. Biological and Physiological Factors in Soybeans. **J. Am. Oil Chemists Soc.** Illinois, v.51, p.161-174A, 1974.
- RAPAPORT, S.I. **Introdução à Hematologia**. Ed. Harper & Row do Brasil Ltda., 1978, p.331.
- REEDS, P.J.; GARLICK, P.J. Protein and amino acid requirements and the composition of complementary foods. **J. Nutr.** , v. 133 (suppl.), 2953-2961, 2003.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing comiittee on the reformulation of the AIN-76 A rodent di **American Institute of Nutrition**, USA, 1993.
- ROBINSON, S; SCOTT, N.; GACKLE, A. Gene technology and future foods. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, v.9 (suppl.), p.113-121, 2000.
- ROGERS, S.G. Biotechnology and the soybean. **Am J Clin Nutr**, v. 68 (suppl.), p.1330-2, 1998.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo sobre diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, 20, p.315-328, 1947.
- SCRIMSHAW, N.S; TAYLOR, C.E.; GORDON, J.E. Interactions of nutrition and infection. **Am. J. Med. Sci.**, v. 237, p. 367-372, 1959.
- SCRIMSHAW, N.S.&SANGIOVANNI, J.P. Synergism of nutrition, infection and immunity: an overview. **Am. J Clin. Nutr.**, v. 66 (suppl.), p.464-477, 1997.
- SARWAR, G.; BLAIR, R.; FRIEDMAN, M.; GUMBMANN, M.R.; HACKLER, L.R.; PELLET, P.L.; SMITH, T.K. Inter- and intra-laboratory variability in rat growth assays for estimating protein quality of foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.67, n.5, p.976-981, 1984.
- SARWAR, G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. **J. Nutr.**, v.127, p.758-764, 1996.

- SARWAR, G. Available amino acid score for evaluating protein quality of foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.67, n. 3, p.623-626, 1984.
- SCHAAFSMA, G. The protein digestibility-corrected amino acid score. **J. Nutr.**, v.130 (suppl.), p. 1865-1867, 2000.
- SHANER, D.L. Herbicide resistance: where are we? How did we get here? Where are we going? **Weed Techn.**, v. 9, p.850-856, 1995.
- SHARMA, H.C.; CROUCH, J.H.; SHARMA, K.K.; SEETHARAMA, N.; HASH, C.T. Applications of biotechnology for crop improvement: aspects and constraints. **Plant Sci.**, v.163, p.381-395, 2002.
- STROMBERG, P.C. **Changes in the hematologic system.** In: Pathobiology of the aging rat, ed. International Life Sciences Institute (ILSI – Press), v. I, Washington, 1992.
- TAYLOR, C.G.; POTTER, A.J.; RABINOVITCH, P.S. Splenocyte glutathione and DC3-Mediated cell Proliferation Are Reduced in Mice Fed a Protein-Deficient Diet **J.Nutr.**, Sattle, v.127, p.44-50, 1997.
- TOMÉ, D.; BOS, C. Dietary protein and nitrogen utilization. **J. Nutr.**, Paris, v. 130 (suppl.), p.1868-1873, 2000.
- YOUNG, V.R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. **J. Am. Di Assoc.**, Boston, v. 91, n. 7, p.828-835, 1991.
- YOUNG, V.R.; MARCHINI, S. J. Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 51, p. 270-89 1990.
- YOUNG, V.R.; MARCHINI, S.; CORTIELLA, J. Assessment of protein nutritional status. **J. Nutr.**, Cambridge/Ribeirão Preto, v. 120, p. 1496-1502, 1990.
- YOUNG, V.R.; PELLET, P.L. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.59 (suppl.), 1203-1212, 1994.
- YOUNG, E.; STONEHAM, M.D.; PETRUCKEVITCH, A.; BARTON, J.; RONA, R. A population study of food intolerance. **Lancet**, v. 343, p.1127, 1994.
- WETTLAUER, S.H.; LEOPOLD, A.C. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. **Plant Physiol.**, v. 97, p. 165-169, 1991.

WISSLER, R.W.; WOOLRIDGE, R.L.; STEFFEE, C.H.; CANNON, P.R. The influence of protein repletion upon the production of antibody in hypoproteinaemic adult white rats. **J. Immunol.**, v. 52, p. 267, 1946.

7 – ANEXOS

Tabela 15: Peso dos órgãos dos animais alimentados com ração à base de caseína no período de 14 dias (g)

Animal	Baço	fígado	rim D	rim E	ID	Pâncreas	Estômago
1	0.254	3.086	0.433	0.402	3.776	0.273	0.865
2	0.289	3.909	0.514	0.464	2.856	0.356	0.742
3	0.196	4.554	0.505	0.505	3.055	0.300	1.055
4	0.205	3.516	0.484	0.481	3.256	0.373	1.069
5	0.164	4.158	0.505	0.501	3.055	0.344	1.396
6	0.177	3.086	0.457	0.390	2.906	0.250	1.066
7	0.233	3.639	0.476	0.489	3.887	0.327	1.396
8	0.182	3.546	0.487	0.487	3.218	0.407	1.327
Média	0.2125	3.6868	0.4826	0.465	3.251	0.3288	1.1145
Dp	0.04	0.51	0.03	0.044	0.384	0.05	0.24
Cv	5.46	8.80	11.97	12.970	13.970	14.97	15.97

Tabela 16: Peso dos órgãos dos animais alimentados com ração à base de soja comercial no período de 14 dias (g)

Animal	Baço	fígado	rim D	rim E	ID	Pâncreas	Estômago
1	0.2110	2.6560	0.4500	0.438	2.765	0.323	0.742
2	0.2210	3.7820	0.5850	0.529	3.330	0.289	0.964
3	0.1650	3.0030	0.4370	0.440	2.623	0.333	0.858
4	0.1840	2.6570	0.4910	0.431	2.384	0.315	0.825
5	0.1740	2.9920	0.5300	0.401	2.384	0.366	0.825
6	0.2230	4.2240	0.6390	0.549	2.512	0.319	0.750
7	0.1550	3.1140	0.4560	0.482	2.605	0.247	0.704
8	0.1560	3.2130	0.5360	0.490	3.055	0.247	0.704
Média	0.1861	3.2051	0.5155	0.4700	2.7073	0.3049	0.7965
Dp	0.03	0.54	0.07	0.05	0.33	0.04	0.09
Cv	5.46	8.80	11.97	15.25	18.51	21.76	25.02

Tabela 17: Peso dos órgãos dos animais alimentados com ração à base de soja parental no período de 14 dias (g)

Animal	baço	figado	rim D	rim E	ID	Pâncreas	Estômago
1	0.2210	3.1920	0.4690	0.454	3.115	0.345	0.771
2	0.1890	3.0670	0.4530	0.445	3.305	0.295	0.855
3	0.1720	2.9990	0.4509	0.420	2.649	0.434	0.834
4	0.2050	3.4380	0.5070	0.452	3.623	0.432	1.526
5	0.1960	3.6440	0.4940	0.437	3.420	0.307	1.234
6	0.1600	2.3550	0.4230	0.411	2.392	0.184	0.823
7	0.1950	3.7220	0.4770	0.474	3.332	0.458	1.598
8	0.1620	2.9560	0.4200	0.372	2.813	0.233	0.719
Média	0.1875	3.1716	0.4617	0.4331	3.0811	0.3360	1.0450
Dp	0.02	0.44	0.03	0.03	0.42	0.10	0.36
Cv	5.46	8.80	11.97	15.25	18.51	21.76	25.02

Tabela 18: Peso dos órgãos dos animais alimentados com ração à base de soja GM no período de 14 dias (g)

Animal	baço	figado	rim D	rim E	ID	Pâncreas	Estômago
2	0.1770	3.2700	0.5290	0.464	3.747	0.378	0.964
3	0.2560	3.6960	0.5250	0.543	2.848	0.331	1.445
4	0.2120	3.4540	0.6360	0.484	3.790	0.439	0.831
5	0.2090	4.2610	0.4930	0.516	2.952	0.257	0.853
6	0.2270	3.5660	0.5230	0.456	3.225	0.405	1.517
7	0.1990	3.5750	0.5640	0.535	3.751	0.253	1.132
8	0.2100	3.0300	0.4540	0.410	3.070	0.299	0.776
Média	0.1863	3.1065	0.4655	0.4260	2.9229	0.2953	0.9398
Dp	0.02	0.38	0.06	0.05	0.41	0.07	0.30
Cv	5.46	8.80	11.97	15.25	18.51	21.76	25.02

Tabela 19: Valores da série vermelha de ratos alimentados com rações aprotéica, à base de caseína, soja comercial, soja parental e soja GM durante 14 dias

Animais	Hematócritos %	Hemoglobina g/dL	Eritrócitos x10⁶/mm³	Reticulócitos (%)
Grupo Controle				
1	42	14.4	7.86	5.11
2	44	14.6	8.96	6.62
3	36	11.7	6.9	2.18
4	43	13.79	6.96	5.62
5	40	13.2	7.4	4.18
6	52	14.66	8.14	4.96
7	37	13.7	7.45	4.98
8	43	15	8.62	6.12
Grupo Aprotéico				
1	30	10.3	6.8	0.08
2	32	12.3	7.98	0.41
3	32	11.9	6.12	0.1
4	32	11.2	6.16	0.11
5	36	13.9	8.01	0.18
6	33	12.9	6.84	0.07
7	38	15.3	8.12	0.09
8	26	9.8	6.18	0.00
Grupo Soja Comercial				
1	39	14.05	8.08	3.74
2	coagulou			
3	43	13.64	7.76	2.39
4	35	12.49	6.6	1.88
5	39	14.17	9.02	1.96
6	27	10.2	6.26	1.83
7	39	14.2	8.34	2.28
8	43	13.7	8.08	2.87
Grupo Soja Convencional				
1	37	12.16	6.88	1.86
2	43	13.9	8.02	3.12
3	45	14.9	7.56	1.96
4	41	13.64	7.56	3.18
5	42	14.1	8.06	5.09
6	49	15.8	7.56	3.18
7	44	13.1	9.04	4.34
8	45	17.4	11.8	2.68
Grupo Soja GM				
1	41	16	9.72	1.72
2	40	14.1	7.96	1.41
3	43	15.3	9.7	3.32
4	40	14.17	7.12	2.11
5	39	14.3	7.98	3.18
6	42	14.7	9.6	1.98
7	44	15.3	7.82	3.91
8	40	14.6	6.72	1.77

Tabela 20: Valores da série branca de ratos alimentados com rações aptotética e à base de caseína e soja comercial durante 14 dias

Ratos		Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Segmentados (%)	Leuc/mm³	Linfócitos/mm³	Monócitos/mm³	Segmentados/mm³
Grupo Controle								
1	90	4	6	4400	3960.0	176.0	264.0	
2	95	3	2	3250	3087.5	97.5	65.0	
3	98	2	0	2800	2744.0	56.0	0.0	
4	89	3	8	2350	2091.5	209.0	188.0	
5	93	2	5	3700	3441.0	74.0	185.0	
6	95	1	4	6200	5890.0	62.0	248.0	
7	97	2	1	4300	4171.0	86.0	43.0	
8	91	3	6	3550	3230.5	106.5	213.0	
Grupo Aprotéico								
1	99	0	1	3150	3118.5	0.0	31.5	
2	95	0	5	3400	3230.0	0.0	170.0	
3	95	1	4	2000	1900.0	20.0	80.0	
4	98	1	1	2200	2156.0	22.0	22.0	
5	94	0	6	1850	1739.0	0.0	111.0	
6	95	1	4	3400	3230.0	34.0	136.0	
7	95	3	2	4500	4275.0	135.0	90.0	
8	97	0	3	1650	1600.5	0.0	49.5	
Grupo Soja Comercial								
1	93	1	6	3750	3488.0	37.0	225.0	
2	coagulou							
3	98	1	1	2900	2842.0	29.0	29.0	
4	99	1	0	1500	1485.0	15.0	0.0	
5	97	1	2	2400	2328.0	24.0	48.0	
6	96	1	3	2900	2784.0	29.0	87.0	
7	96	0	4	2200	2112.0	0.0	88.0	
8	94	0	6	1450	1363.0	0.0	87.0	

Tabela 21: Valores da série branca de ratos alimentados com rações à base de soja convencional e GM durante 14 dias

Ratos	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Segmentados (%)	Leuc/mm ³	Linfócitos/mm ³	Monócitos/mm ³	Segmentados/mm ³
Grupo Soja Parental							
1	93	1	6	2750	2558.0	27.5	165.0
2	91	4	5	4800	4368.0	192.0	240.0
3	98	1	1	3300	3234.0	33.0	33.0
4	99	1	0	5500	5445.0	55.0	0.0
5	91	2	7	3250	2957.5	65.0	228.0
6	94	1	5	3700	3478.0	37.0	185.0
7	97	1	2	5100	4947.0	51.0	102.0
8	92	0	8	5350	4922.0	0.0	428.0
Grupo Soja GM							
1	96	0	4	700	672.0	0.0	28.0
2	99	1	0	3500	3465.0	35.0	0.0
3	95	3	2	5800	5510.0	174.0	116.0
4	96	1	3	5150	4944.0	51.5	154.5
5	97	1	2	2300	2231.0	23.0	46.0
6	96	2	2	2500	2400.0	50.0	50.0
7	99	0	1	2300	2277.0	0.0	161.0
8	98	1	1	5300	5194.0	53.0	53.0