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

**Parâmetros nutricionais e hematológicos de ratos alimentados
com soja (*Glycine Max* L.) geneticamente modificada**

Patricia Cintra

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientador:
Prof. Dr. Flávio Finardi Filho

São Paulo
2005

(Nota da BCQ: No exemplar da BCQ faltam as páginas 04, 78 e 80)

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011337

Ficha Catalográfica

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

Cintra, Patricia

C574p Parâmetros nutricionais e hematológicos de ratos alimentados
com soja (*Glycine Max* L.) geneticamente modificada. / Patricia
Cintra. -- São Paulo, 2005.
115p.

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

Orientador: Finardi Filho, Flávio

1. Bromatologia 2. Soja : Ciência dos alimentos 3. Soja:
Proteína : Ciência dos alimentos I. T. II. Finardi Filho, Flávio
orientador.

641 CDD

Patrícia Cintra

Parâmetros nutricionais e hematológicos de ratos alimentados com
soja (*Glycine Max. L.*) geneticamente modificada

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Flávio Finardi Filho
Orientador/presidente

Olga Maria Silveiro Amâncio
1º examinador

Célia Colli
2º examinador

São Paulo, 15 de dezembro de 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEP nº 06/2003

São Paulo, 11 de abril de 2003.

Ilma. Sra.
Patrícia Cintra

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP (CEEA), em reunião realizada em 07 do corrente, aprovou o projeto "Segurança alimentar da soja geneticamente modificada", apresentado por Vossa Senhoria, conforme certificado anexo.

Na mesma reunião, a Comissão deliberou que projetos que envolvam organismos geneticamente modificados deverão ser comunicados à Comissão de Biossegurança da FCF/USP, e a manifestação sobre o mesmo deverá ser anexada ao projeto encaminhado ao CEEA.

Assim, aguardamos as providências de Vossa Senhoria para finalização e arquivamento de seu processo.

Sendo o que nos cumpre, apresentamos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA/FCF/USP

Orientador: Prof. Flávio Finardi Filho
FBA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “**Segurança alimentar da soja geneticamente modificada**” (Protocolo nº07), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Patrícia Cintra** e do orientador(a) **Flávio Finardi Filho**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em **07/04/2003**.*

São Paulo, 11 de abril de 2003.

*Prof. Assoc. **Elfriede Marianne Bacchi**
Coordenadora da CEEA*

..... palavras da vovó:
Felicidade é dourado pomo,
mas nunca pomos aonde estamos,
mas sim aonde não estamos.

In memoriam:

Aos meus pais

À querida professora Lêda Aparecida Cintra.
E ao dotado escritor Octávio Garcia Cintra.

Dedico também

À vovó Davina, pela sábia maneira de viver seus 94 anos.

À minha irmã Adriana Cintra, pelo apoio, compreensão, carinho e confiança.

À querida amiga Ena Tassinari, que me ensinou que uma vez dita uma palavra a mesma nunca poderá retomar, obrigada.

Ao Alexandre Rodrigues Lobo, pela paciência, orientação, ensinamentos e carinho.

Agradecimentos

Ao programa de pós-graduação em Ciências dos Alimentos
Ao Professor Flávio Finardi Filho, por ter acreditado em mim e ter me iniciado na pesquisa;
À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;
Ao CNPQ, pelo apoio financeiro a pesquisa;
À Embrapa, em especial ao Dr. Maurício da Silva Assunção, pela concessão das amostras de soja;
À Perdigão, em especial ao Sr. Sioji, que concedeu as amostras de casca de soja;
Ao Dr. Ralph Greiner, pela realização das análises de fitatos;
Ao ITAL, pela realização das análises de aminoácidos;
À professora Primavera Borelli e sua equipe, pelo sacrifício dos animais e pelas análises hematológicas realizadas;
Ao professor Júlio Orlando Tirapegui e, em especial, a técnica Ivanir, não só pela realização das análises de proteína, albumina e IGF-1, mas também pelo apoio e ajuda emocional, você é uma lutadora;
À querida professora Célia Colli, pelas palavras, sugestões e ensinamentos;
À professora Inar Alves de Castro, pela realização das análises estatísticas;
À professora Silvia Cozzolino e aos técnicos Luís, e Alexandre Pimentel, pelos materiais emprestados e cooperação nas análises de proteína;
À Lurdinha e Joana, pelo cafezinho, afinal naqueles dias de muito sono sem ele não daria para ficar de olhos abertos;
Às técnicas Rosa e Cíntia, por me iniciarem na análise de composição centesimal;
À tia Welenice, pelos momentos difíceis e confusos;
Ao Ary de Castro Freitas pois, afinal, sem a ajuda dele, não poderia sobreviver;
Ao Marcelo Macedo Rogero, pelas sugestões, ensinamentos, e pelo exemplo de pessoa e profissional;
Ao Álvaro, pela tradução do resumo;
Às amigas de laboratório: Tatiana Pires, Cristina, Cynthia Dói, Cíntia Bezuti e, em especial, a Mariana Bonaldo, e Gerby, pelas conversas, força, paciência e risadas. Obrigada por tudo;
Ao amigo Maurício, pelas atitudes humanas e conselhos;
À amiga Vanuska, pelas palavras amigas, pela atitude extremamente humana e fiel e por me estender a mão;
À Malú Cocato, pelo cálculo de fitato, pelas conversas e apoio;
À Helena, pela leitura do método de fitato e pelas palavras sinceras;
À amiga Priscila Possik, pela correção da dissertação, amizade e confiança, você é muito especial;
À todos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, que contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

No presente trabalho foi estudado o efeito do consumo de soja geneticamente modificada e de sua parental em parâmetros nutricionais e hematológicos em ratos em crescimento. Farinha de soja, desengordurada e autoclavada, foi incorporada em rações experimentais: 12% de proteína para o 1º ensaio e 10% para 2º ensaio. As rações com soja foram suplementadas com aminoácidos essenciais (leucina, lisina, metionina e valina) no 2º ensaio, devido a menor concentração desses aminoácidos nas rações do 1º ensaio quando comparadas ao grupo controle, perfil confirmado pelo aminograma. Ratos *Wistar* (n=64) foram alimentados, *ad libitum*, com rações controle (AIN-93G) e rações com a farinha de soja por 28 (1º ensaio) e 32 dias (2º ensaio). Para avaliação do aproveitamento biológico da proteína da dieta e da qualidade protéica, foram realizadas análises de nitrogênio na carcaça dos animais, nas fezes e na urina que foram coletadas ao longo de 2 períodos de balanço de 6 dias cada ensaio. Os parâmetros nutricionais avaliados foram: Coeficiente de eficácia alimentar (CEA), Coeficiente de eficácia protéica (PER), Coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR), Valor biológico da proteína (BV), Coeficiente de utilização líquida da proteína (NPU), digestibilidade protéica e o “Escore químico corrigido pela digestibilidade real da proteína”. Para avaliação do estado nutricional foram avaliadas as concentrações de albumina, proteínas totais e IGF-1 no plasma. Como parâmetros hematológicos, foram avaliados o hemograma completo, mielograma e esplenograma. Os resultados obtidos demonstraram que animais alimentados com soja GM e sua parental apresentaram desenvolvimento semelhante ao grupo controle (caseína). Os valores de CEP e NPR encontrados nos 2 ensaios mostram que a proteína de soja é nutricionalmente adequada. A oferta protéica de 10% com suplementação com aminoácidos essenciais favoreceu no desenvolvimento dos animais, visto que foi observado aumento de peso em média de 50g, PER e NPR melhores quando comparados com a oferta protéica de 12% sem suplementação. Nos dois ensaios, os valores de digestibilidade dos grupos alimentados com soja foram inferiores aos do grupo controle, resultado evidenciado pela maior dificuldade das enzimas digestivas em digerirem a proteína vegetal, maior perda de aminoácidos endógenos e quantidade de fibra insolúvel presente na soja. O valor de PDCAA de 85% demonstra bom aproveitamento dos grupos com soja. Não houve diferença estatística nos parâmetros plasmáticos estudados, bem como nos resultados hematológicos sugerindo que o consumo de soja, convencional ou GM, não altera o estado nutricional dos animais.

ABSTRACT

In the present work, the effects of genetically modified (GM) soybean and its parental on nutritional and hematological parameters in growing rats were studied. Autoclaved, fat-free soybean flour was added to experimental diets: 12% protein in the first assay and 10% in the second assay. The soybean diets were supplemented with essential amino acids (leucine, lysine, methionine and valine) in the second assay, since such amino acids presented a lower concentration in the diets of the first experiment, as confirmed by the aminogram. Wistar rats (n= 64) were fed a control diet (AIN-93G) and diets supplemented with soybean flour (parental and GM) *ad libitum* over 28 days (1st experiment) and 32 days (2nd experiment). For evaluating the biological utilization of dietary protein and protein quality, nitrogen analyses were carried out on the animal carcasses, feces and urine. Feces and urine were collected along two 6-day periods within each assay. The following nutritional parameters were evaluated: feed efficiency ratio (FER), protein efficiency ratio (PER), net protein ratio (NPR), biological value (BV), net protein utilization (NPU), protein digestibility and protein digestibility corrected by amino acid (PDCAA) score. For evaluating the nutritional status, plasma albumin, total proteins and IGF-1 were analysed. Complete hemogram, myelogram and splenogram were used as hematological parameters. The results indicate that animals fed the GM soybean and its parental showed a similar growth rate to the control group (casein). PER and NPR values found in both assays show that soybean protein is nutritionally adequate. A diet containing 10% protein supplemented with essential amino acids favored the growth of the animals in comparison to a diet containing 12% protein without amino acid supplementation. In both assays, the protein digestibility in soybean-fed groups was lower than in the control group, a result evidenced by a greater difficulty of enzymes in digesting vegetal proteins, a greater loss of endogenous amino acids and the presence of insoluble dietary fiber in the soybean. A PDCAA value of 85% showed a good protein utilization in the soybean-fed groups. No statistically significant differences were observed in the plasmatic and hematological parameters among the groups, suggesting that consumption of soybean (either GM or parental) does not alter the nutritional status of the animals.

SUMÁRIO

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. Revisão da literatura.....	3
2.1 Histórico da soja.....	3
2.1.2 Propriedades nutricionais da soja.....	5
2.2 Alimentos geneticamente modificados.....	6
2.2.1 A biotecnologia.....	6
2.2.2 Organismos geneticamente modificados	7
2.2.3 Controvérsias sobre organismos geneticamente modificados	10
2.3 Proteínas	11
2.3.1 Aspectos nutricionais e metabólicos.....	11
2.3.2 Qualidade protéica da soja.....	17
2.4 Fitatos.....	19
2.5 Método para avaliação da qualidade protéica	20
2.5.1 Métodos biológicos.....	21
2.5.1.2 Coeficiente de eficiência protéica (PER).....	21
2.5.1.3 Coeficiente de eficácia líquida da proteína (NPR).....	22
2.5.1.4 Razão da utilização líquida da proteína (NPU).....	23
2.5.1.5 Balanço nitrogenado.....	23
2.5.1.6 Digestibilidade protéica.....	23
2.5.2 Métodos bioquímicos.....	25
2.5.2.1 Aminograma e escore químico (PDCAA).....	25
2.6 Métodos para avaliação do estado nutricional.....	26
2.6.1 Método para avaliação do estado nutricional protéico.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. OBJETIVOS.....	32
4.1 Geral.....	32
4.2 Específicos.....	32
5. MATERIAL e MÉTODOS.....	33

5.1	Material.....	33
5.1.1	Soja.....	33
5.1.2	Fibra.....	33
5.1.3	Animais.....	34
5.1.4	Reagentes.....	34
5.2	Métodos.....	36
5.2.1	Processamento da farinha de soja e casca de soja.....	36
5.2.2	Composição química da farinha de soja, casca de soja e rações.....	36
5.2.3	Elaboração das rações experimentais.....	37
5.3	Protocolo experimental.....	40
5.4	Avaliação do aproveitamento biológico da proteína.....	42
5.5	Análise de aminoácidos.....	43
5.6	Análise de fitatos.....	44
5.7	Processamento das amostras sanguíneas: sangue e plasma.....	44
5.7.1	Determinação do hemograma e reticulócitos.....	45
5.7.2	Mielograma.....	46
5.7.3	Esplenograma.....	46
5.7.4	Critério para classificação das células hematopoéticas.....	47
5.8	Determinação de PTN totais, albumina e IGF-1.....	48
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
7.	RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	50
7.1	Processamento e caracterização química das amostras	50
7.1.2	Caracterização química das rações.....	52
7.2	Crescimento dos animais durante os experimentos.....	54
7.3	Parâmetros nutricionais avaliados durante os 2 ensaios.....	57
7.3.1	Coeficiente de eficácia alimentar (CEA), coeficiente de eficácia protéica (PER) e coeficiente de eficácia líquida da proteína (NPR).....	59
7.3.2	Razão da utilização líquida da proteína (NPU) e valor biológico da proteína (BV)	61
7.3.3	Ingestão, excreção de nitrogênio e digestibilidade.....	61
7.4	Peso dos órgãos, teor de umidade e peso seco fezes.....	66
7.5	Influência do fitato nos parâmetros nutricionais	72
7.6	Utilização de nitrogênio, balanço nitrogenado, NPU e composição carcaça.....	72

7.7	Digestibilidade protéica corrigida pelo escore de aminoácidos.....	76
7.8	IGF-1, albumina e proteínas totais.....	81
7.9	Análises hematológicas.....	82
8.	CONCLUSÕES.....	89
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

Lista de Figuras

Figura 1	Digestão e absorção de proteínas	16
Figura 2	Evolução do peso dos animais 1º ensaio.....	54
Figura 3	Evolução do peso dos animais 2º ensaio	55
Figura 4	Teor de umidade (%) e peso seco (g) das fezes 1º ensaio	68
Figura 5	Teor de umidade (%) e peso seco (g) das fezes 2º ensaio	69
Figura 6	Distribuição dos aminoácidos essenciais das dietas 1º ensaio	80

Lista de Tabelas

Tabela 1	Estimativa de área plantada – principais produtos (Em 1.000ha)	4
Tabela 2	Aminoácidos indispensáveis, dispensáveis.....	14
Tabela 3	Ingestão Alimentar de referência (DRI)	15
Tabela 4	Fórmulas utilizadas para avaliação da proteína.....	26
Tabela 5	Distribuição dos componentes nas rações experimentais	39
Tabela 6	Composição química das amostras de soja 1º ensaio.....	51
Tabela 7	Composição química das amostras (soja e casca) 2º ensaio.....	52
Tabela 8	Composição químicas das rações experimentais	53
Tabela 9	Parâmetros nutricionais avaliados durante os 2 ensaios	58
Tabela 10	Ingestão e excreção de nitrogênio	63
Tabela 11	Peso relativo dos órgãos de ratos	67
Tabela 12	Peso seco e teor de umidade das fezes 1º ensaio.....	68
Tabela 13	Peso seco e teor de umidade das fezes 2º ensaio	69
Tabela 14	Teor de fitatos nas rações	72
Tabela 15	Utilização de nitrogênio (1º ensaio)	74
Tabela 16	Utilização de nitrogênio (2º ensaio)	75
Tabela 17	Composição corporal da carcaça.....	75
Tabela 18	Distribuição de aminoácidos nas rações (1º ensaio).....	78
Tabela 19	Composição dos aminoácidos comparadas a FAO/NCR	79
Tabela 20	Cálculo do escore e PDCAA	80
Tabela 21	Parâmetros plasmáticos	82
Tabela 22	Hemograma (1º ensaio)	84
Tabela 23	Hemograma (2º ensaio)	84
Tabela 24	Mielograma (1º ensaio)	85
Tabela 25	Mielograma (2º ensaio)	86
Tabela 26	Esplenograma (1º ensaio)	87
Tabela 27	Esplenograma (2º ensaio)	88

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos geneticamente modificados têm sido foco de controvérsias devido a questões envolvendo a segurança alimentar e ambiental. Se de um lado os ambientalistas alegam danos ao meio ambiente e a saúde de animais e humanos que os consomem, de outro, a indústria biotecnológica e as pesquisas científicas têm resultados que atestam benefícios para o consumidor, para o produtor e para o meio ambiente (BRUCE, 2002).

A utilização de técnicas de modificações genéticas tem sido uma solução para o ser humano, uma vez que constantes ameaças como seca, redução de produtividade, pragas e danos na colheita têm prejudicado o aumento de oferta de alimento para a população. Outra preocupação é com o crescimento da população mundial, visto que no início do século passado havia cerca de 2 bilhões de pessoas, triplicados para aproximadamente 6 bilhões atualmente e com estimativa de que avance mais 7,5 bilhões, que corresponde a 25% até a década de 2020 (COCKBURN, 2002).

Nos Estados Unidos as agências regulatórias, como a *Food and Drug Administration* (FDA), havia aprovado aproximadamente 50 aplicações de biotecnologia para o desenvolvimento de novas variedades de plantas (BRUCE, 2002).

Neste contexto, as plantas geneticamente modificadas (GM) têm sido desenvolvidas para expressar características desejáveis comandadas por um gene específico encontrado em determinado ser vivo. Através do isolamento, cópia e inserção na planta alvo é possível criar novas vias metabólicas sem perder os traços originais intrínsecos à espécie, com benefícios à produção de alimentos e à saúde do consumidor (COCKBURN, 2002). Além disso, o

enriquecimento de alimentos com componentes alvos como, por exemplo, a vitamina A e ferro é uma solução no combate a deficiências nutricionais (KUIPER *et al.*, 2002).

Em termos políticos, vale ressaltar que o interesse na produção dos alimentos modificados prevalece com os argumentos da não agressão ao meio ambiente e da contribuição para a saúde da população (PINAZZA & ALIMANDRO, 1998; CAVALLI, 2001).

Com isso, há hoje mais de 150 diferentes vegetais modificados aprovados para pesquisa e produção em todo o mundo, incluindo cereais, leguminosas, vegetais fibrosos, frutas, nozes e plantas ornamentais. Essas modificações permitem a introdução de novos traços agronômicos nas plantas para torná-las tolerantes a defensivos agrícolas, resistentes a insetos, mais produtivas, mais saborosas, mais nutritivas, mais duráveis (com aumento da vida-de-prateleira), menos agressivas ao meio ambiente e, ainda, para veicular medicamentos e/ou vacinas, ou qualquer outro objetivo passível da nova técnica (MADDEN, 1995; ROBISON *et al.*, 2000; CHASSY, 2002; AULRICH *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, CLUGSTON & SMITH, 2002; MOFFAT, 2002).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico da Soja

A soja (*Glycine Max L.*) que hoje se cultiva é muito diferente dos seus ancestrais, que eram plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do rio *Yangtse*, na China. Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas do cruzamento natural entre duas espécies de soja selvagem, que foram cultivadas por cientistas da antiga China (EMBRAPA, 2004).

A soja é uma leguminosa anual, oleaginosa e foi introduzida na América em 1765. Nos Estados Unidos, o cultivo da soja passou a ser produzido em larga escala de produção em 1850 e, em 1999, seu plantio chegou a 72 milhões hectares, representando 27% da área total cultivada daquele país (FRIEDMAN & BRANDON, 2001). É também cultivada em mais de 80 países, gerando um volume superior a 162 milhões de toneladas métricas de grãos. Atualmente, os líderes mundiais na produção de soja são os Estados Unidos, Argentina, China, Índia, Paraguai e Brasil, sendo este último, o segundo maior produtor desta leguminosa, com 59,7 milhões de toneladas, sendo que cerca de 73% da produção é exportada e 27% permanece no mercado interno (EMBRAPA, 2004).

No Brasil, as primeiras referências sobre o cultivo da soja datam de 1892, no estado de São Paulo, e apenas no final da década de 1960 a soja passou a representar um produto comercial no país. Na época, o trigo era a principal cultura do Sul e a soja surgia como uma opção de verão, em sucessão ao trigo. Iniciava-se então um esforço para produção de suínos e aves, gerando demanda por farelo de soja. Em 1966, a produção comercial de

2.1.2 Propriedades nutricionais da soja

A soja é um alimento cujas alegações de saúde têm sido amplamente divulgadas pela mídia nos últimos anos. Suas características químicas e nutricionais a qualificam como um alimento funcional: além da quantidade de proteína, estudos mostram que a soja pode ser utilizada de forma preventiva e terapêutica no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas da menopausa (HASLER, 1998).

A ação da soja na prevenção do câncer ginecológico e alívio dos sintomas da menopausa são atribuídos as isoflavonas, compostos fenólicos heterocíclicos que podem atuar como agentes antiestrogênicos, competindo com estrógenos de origem endógena (como o 17β -estradiol), cuja função biológica está ligada ao desenvolvimento de alguns tipos de cânceres ginecológicos. Populações do Sudeste Asiático, onde a soja faz parte dos hábitos alimentares, apresentam baixa incidência de câncer estrogênio-dependente e este fato vem a reforçar, de acordo com a opinião de alguns pesquisadores, que a soja deveria fazer parte dos hábitos alimentares das mulheres. Contudo, mais estudos são necessários antes de se sugerir a ingestão de soja ou extratos de isoflavonas como substitutos da reposição hormonal de mulheres em fase de menopausa e pós-menopausa (BEHRENS *et al.*, 2004).

A proteína de soja é usada nos alimentos sob diferentes formas, incluindo fórmulas infantis, farinha de soja, proteína isolada, concentrados e proteína de soja texturizada. Alimentos à base de soja incluem sucedâneos de queijo, bebidas, miso, tempeh, tofu e outros substitutos de alimentos tradicionais na alimentação vegetariana (FRIEDMAN & BRANDON, 2001). A

soja também é destacada por sua rica composição nutricional; os grãos possuem em média 20% de lipídeos, 40% de proteína e de 4 a 10% de umidade (GARCIA *et al.*, 1997). Além disso, possui ácidos graxos poliinsaturados e compostos fitoquímicos como: isoflavonas, saponinas, fitatos, dentre outros. Também é uma excelente fonte de minerais como: cobre, ferro, fósforo, potássio, magnésio, manganês e vitaminas do complexo B (EMBRAPA, 2004).

A *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda a ingestão diária de 25 g de proteína de soja, que corresponde a aproximadamente 60 g de grãos de soja, para o controle da concentração plasmática de colesterol e triacilgliceróis, reduzindo, assim, os riscos de enfarto, trombose, aterosclerose e acidentes vasculares cerebrais (AVC) (EMBRAPA, 2004).

2.2 Alimentos geneticamente modificados

2.2.1 A biotecnologia

O termo biotecnologia foi conhecido pela primeira vez na Hungria, em meados de 1914, e fazia referência aos métodos aplicados na prática da agricultura. Os princípios desta técnica são antigos, anteriores à Era Cristã, quando gregos e egípcios produziam vinho e cerveja por meio da fermentação da uva e da cevada. Durante 1970, a biotecnologia passou por uma transformação, devido às mudanças na manipulação do material genético com enzimas e microrganismos sendo utilizados pelas indústrias de alimentos na manufatura dos mesmos, tornando-se assim o sinônimo da "modificação genética" (MADDEN, 1995).

O desenvolvimento desta nova biotecnologia é reconhecidamente dividido em três fases. A primeira privilegia as características agronômicas das espécies comerciais modificadas, estando ainda em curso, a segunda está produzindo culturas de melhor qualidade e a terceira pretende trazer opções de alimentos fortificados e com menores custos (COSTA & BORÉM, 2003).

Assim, o objetivo da biotecnologia aplicada aos alimentos não é o de somente melhorar sua produção, mas também o de atender à demanda dos consumidores por produtos mais seguros, naturais, frescos e saborosos (KUIPERS, 1999).

2.2.2 Organismos geneticamente modificados

Atualmente, as principais plantas modificadas de uso comercial são soja, tolerante à herbicidas, e milho e algodão, resistentes a insetos. A principal vantagem dessas plantas modificadas é a redução do uso de defensivos agrícolas e os benefícios advindos. Estudos têm mostrado redução nos custos de produção, economia de combustível, redução de intoxicações nos agricultores e menores resíduos no meio ambiente. Os resultados indicam que tais produtos agrícolas ou geneticamente modificados (GM) são seguros para a saúde humana e animal. Para tranquilizar o consumidor, é preciso salientar que o consumo de produtos modificados tem sido feito desde 1996 por milhões de pessoas em todo o mundo (PATERNIANI, 2003).

O cultivo e o comércio de organismo geneticamente modificado (OGM) vêm crescendo significativamente em todo o mundo, inclusive no Brasil. Segundo dados da *The International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications* (ISAAA), durante o período de 1996 a 2003, a área total cultivada

com lavouras transgênicas cresceu mais de 47 vezes, passando de 1,7 milhões de hectares em 1996 para 81,0 milhões em 2003 (JAMES, 2003).

No Brasil, a primeira liberação legal de um OGM foi em 2003, mediante a lei 10.688 de 13 de junho de 2003, quando a soja Roundup Ready® foi liberada para comercialização como grão até 31 de janeiro de 2004. Nos anos posteriores novas liberações legais para o plantio e comercialização de soja GM foram realizadas, em 2004 mediante a lei nº 10.814 e em 2005 pela lei 11.092. Essa ampliação mundial das culturas geneticamente modificada (GM), em especial a soja e o milho, refletiu-se também no aumento da presença de resíduos transgênicos em produtos alimentícios que tem em sua composição esses dois tipos de grãos. No Brasil a rotulagem é obrigatória para produtos embalados, a granel ou in natura, que contenham ou que sejam produzidos de OGM, a partir do limite de 1,0% do produto final, conforme decreto nº 4.680 de 25/04/03. Já a legislação para produtos modificados em outros países, ocorre de maneira diferenciada.

Nos Estados Unidos, a FDA deixa à critério da empresa mencionar no rótulo do alimento a existência de OGM na composição do produto. Na União Européia se encontram as regras mais rigorosas sobre rotulagem de alimentos transgênicos. Admite-se a plantação, produção e comercialização de alimentos que contenham OGM, mas dá-se percentual máximo de 1% para que exista o dever de rotulagem (ABIA, 2002).

No Japão, estabeleceu-se o nível máximo de 5% para a soja, enquanto que para o milho, devido a sua potencial polinização cruzada, nenhuma porcentagem foi estabelecida. Na Austrália e na Nova Zelândia, para que não seja necessária a rotulagem, definiu-se em no máximo 1% o limite da presença

de qualquer alimento geneticamente modificado já aprovado para consumo, acima desse limite, a rotulagem é obrigatória (LAJOLO e NUTTI, 2003).

A comercialização dos alimentos geneticamente modificados (AGM) ocorreu pela primeira vez, em 1994, com o lançamento do tomate *Flavr Savr*, nos Estados Unidos. Desde então, variedades GM vêm sendo cultivadas em áreas crescentes em diversos países, tanto nas Américas quanto na Europa, África e Oceania. A superfície cultivada com variedades transgênicas atingiu, em 2001, 52,6 milhões de hectares, envolvendo mais de 16 países e dezenas de espécies importantes na produção de alimentos (COSTA & BORÉM, 2003).

A maior parte desses alimentos está sendo cultivada nos Estados Unidos (72%), Argentina (17%) e Canadá (10%). Soja, milho, algodão, canola, batata, abóbora e mamão papaya, são os produtos geneticamente modificados mais plantados, considerando que a soja e o milho apresentam, respectivamente, 54 e 28% de área de cultivo e o algodão e a canola ocupam juntos 9%. Vários desses novos alimentos podem contribuir para o combate de deficiências alimentares, como a deficiência de ferro e de vitamina A, bem como para a eliminação ou redução de compostos tóxicos, através do controle de insetos e bolores, estes geradores de toxinas (KUIPER *et al.*, 2002).

Em termos industriais, os alimentos geneticamente modificados estão sendo utilizados pelos Estados Unidos e Canadá e já se encontram disponíveis no mercado. Um destes alimentos é o óleo de soja com alto teor de ácido oléico sendo (80% ácido graxo; os óleos produzidos a partir de variedades convencionais de soja contêm 24% de ácido oléico) (DU PONT, 1997). Esse óleo contribui para a diminuição da ingestão de gorduras saturadas e para o aumento da ingestão de gorduras mono e poliinsaturadas, mais saudáveis em

relação ao risco de doenças cardiovasculares (HU *et al.*, 1997). Outro produto também disponível no mercado norte-americano é o óleo de canola com maior teor de ácido esteárico, largamente utilizado pela indústria de biscoitos, sorvetes, sobremesas congeladas e margarinas. A utilização desse óleo diminui a necessidade de hidrogenação da gordura, diminuindo, assim, a ingestão de ácidos graxos trans, considerados prejudiciais à saúde (DU PONT, 1997).

2.2.3 Controvérsias sobre organismos geneticamente modificados

Uma das preocupações sobre a segurança dos organismos geneticamente modificados (OGM) é a alteração de características organolépticas e físico-químicas, podendo também ocorrer formação de toxinas, (KUIPER *et al.*, 2002). Outras preocupações também incluem: alteração na qualidade nutricional dos produtos, potencial toxicológico, possibilidade de resistência a antibióticos e potencial alergênico e carcinogênico provenientes do consumo de produtos modificados, além da poluição ambiental, transferência não intencional do gene para plantas selvagens, possibilidade de criação de um novo vírus, ameaça à diversidade genética dos produtos agrícolas, além de fatores religiosos, culturais e éticos (UZOGARA, 2000).

Os ativistas contrários aos alimentos modificados alegam que esses alimentos não são naturais e, portanto, não podem ser aceitos na chamada agricultura orgânica. Em consequência, e partindo da crença bastante difundida

de que “o que é natural é bom”, uma grande parcela da população manifesta-se receosa de aceitar os produtos da biotecnologia (COSTA & BORÉM, 2003).

As plantas geneticamente modificadas e seus produtos têm sido aceitos nos EUA. No Brasil, a liberação para o cultivo da soja modificada tem tido o apoio da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), que passou a assumir importância fundamental na análise e liberação de plantas modificadas. Mas o motivo maior desta polêmica é a falta de dados científicos que permitam uma avaliação conclusiva para a liberação comercial (NODARI & GUERRA, 2003).

2.3 Proteínas

2.3.1 Aspectos nutricionais e metabólicos

As proteínas são um componente essencial na dieta, necessárias para o crescimento e desenvolvimento de animais e humanos. Em termos nutricionais, a função básica das proteínas é de fornecer quantidade adequada de aminoácidos para o organismo (FRIEDMAN, 1996).

De acordo com REEDS (2000), a divisão dos aminoácidos em duas classes distintas, indispensáveis (ou essenciais) e dispensáveis (não essenciais), tem sido convencionalizada a mais de 60 anos. Esta classificação é definida em termos nutricionais e de acordo com a função dos aminoácidos de fornecerem condição adequada de crescimento e armazenamento protéico.

Assim os aminoácidos podem ser classificados nutricionalmente em dois grupos: indispensáveis (essenciais) e dispensáveis (não-essenciais). São definidos como aminoácidos essenciais, os nove aminoácidos (**Tabela 2**) cujos esqueletos de carbono não podem ser sintetizados pelo organismo,

necessitando de fontes externas (dieta) para a síntese protéica não existindo via de síntese em humanos. Estes aminoácidos são disponíveis para a célula tendo como função manter a velocidade e taxa de crescimento normal (MILLWARD, 1994 & REEDS, 2000). Em situação metabólica restrita, alguns destes aminoácidos essenciais podem ser sintetizados por precursores, que possuam estrutura molecular similar, como por exemplo, a metionina que pode ser sintetizada por transaminação de cetoácidos análogos ou por remetilação da homocisteína. Neste sentido, as células de humanos são capazes de sintetizar leucina, isoleucina, valina, fenilalanina e metionina. No entanto, não podemos considerar estas vias como novas vias de síntese uma vez que os cetoácidos de cadeia ramificada e a homocisteína são originários de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) e metionina. Dessa forma, de acordo com REEDS, (2000) os verdadeiros aminoácidos essenciais são treonina, lisina e, talvez, triptofano.

Em contraste, têm-se os não essenciais que segundo LAIDLAW & KOPPLE (1997), são aminoácidos normalmente sintetizados no organismo a partir de outros aminoácidos ou de outros metabólitos de complexos nitrogenados. Segundo REEDS, (2000), o ácido glutâmico e a serina são os verdadeiros representantes desta classe e os principais precursores dos demais aminoácidos. Além disso, estes aminoácidos podem ser retirados da dieta sem prejudicar a saúde ou bloquear o crescimento.

Finalizando, têm-se os aminoácidos condicionalmente essenciais, que segundo definição de LAIDLAW & KOPPLE (1997) são classificados em seis: arginina, cisteína, glutamina, glicina, prolina e tirosina. Estes aminoácidos são sintetizados a partir de outros aminoácidos e/ou sua síntese é limitada sob

condições fisiopatológicas especiais. Essa definição caracteriza que em condições normais o organismo pode sintetizar estes aminoácidos para alcançar a necessidade metabólica (HARPER, 1983 & SMITH, 1990).

Em contrapartida, segundo REEDS (2000), os aminoácidos condicionalmente essenciais (arginina, cisteína, prolina e talvez glicina) são utilizados quando o suprimento de um aminoácido na dieta torna-se limitado em função de necessidade para regeneração de tecidos. Estas limitações são: 1º) a síntese destes aminoácidos necessita de um outro aminoácido que promova a doação de um carbono ou um doador de um grupo acessório, como os grupos dos sulfurados e o grupo da cisteína; 2º) alguns aminoácidos podem ser sintetizados somente em alguns tecidos. Por exemplo, a síntese de prolina e arginina é dependente do metabolismo intestinal; 3º) algumas evidências sugerem que a síntese dos aminoácidos condicionalmente essenciais depende da quantidade adequada de precursores bem como de precursores adequados.

A **Tabela 2** apresenta a classificação dos aminoácidos, segundo a recomendação de macronutrientes pela DRI (*Dietary Reference Intake*) (THE ACADEMIES PRESS, 2005).

Tabela 2 - Aminoácidos indispensáveis, dispensáveis e condicionalmente indispensáveis na dieta humana.

Aminoácidos Indispensáveis exemplo (ovo)	Aminoácidos dispensáveis exemplo (gelatina)	Aminoácidos condicionalmente indispensáveis ^A exemplo (cereais)	Precusores dos aminoácidos condicionalmente indispensáveis
Histidina ^B	Alanina	Arginina	Glutamina/glutamato, aspartato
Isoleucina	Ácido aspártico	Cisteína	Metionina, serina
Leucina	Asparagina	Glutamina	Ácido glutâmico, amônia
Lisina	Ácido glutâmico	Glicina	Serina, colina
Metionina	Serina	Prolina	Glutamato
Fenilalanina		Tirosina	Fenilalanina
Treonina			
Triptofano			
Valina			

^A Aminoácidos condicionalmente indispensáveis são definidos como aqueles que necessitam ser ingeridos por meio de uma fonte dietética quando a síntese endógena não alcança a necessidade metabólica;

^B A histidina é considerada aminoácido indispensável, uma vez que a ausência deste aminoácido na dieta causa redução de depósito protéico e balanço nitrogenado negativo;
Fonte: LAIDLAW & KOPPLE, 1997.

A necessidade biológica define a quantidade de nutrientes que são utilizados em diferentes vias metabólicas. Deste modo, as perspectivas das recomendações de proteínas e aminoácidos podem ser usualmente divididas em necessidades para o armazenamento protéico e necessidades para a manutenção do equilíbrio de aminoácidos. É importante reconhecer que as necessidades biológicas de proteínas não são fixas e dependem do estágio de desenvolvimento, de produtividade e de fatores ambientais (REEDS *et al.*, 2003). A **Tabela 3** mostra a recomendação diária (DRI) para quantidade de proteína, segundo faixa etária e sexo.

Tabela 3 - Ingestão Alimentar de Referência (DRI) para proteína.

Faixa etária	RDA (g/dia ^a)
INFANTIL(meses)	
0-6	6,1 *
7-12	
CRIANÇAS (anos)	
1-3	13
4-8	19
HOMENS (anos)	
9-13	34
14-18	52
19-30	56
31-50	56
50-70	56
acima 70	56
MULHERES (anos)	
9-13	34
14-18	46
19-30	46
31-50	46
50-70	46
acima 70	46
MULHERES GRÁVIDAS (anos)	
≤ 18	71
19-30	71
31-50	71
FASE DE LACTAÇÃO (anos)	
≤ 18	71
19-30	71
31-50	71

^a Baseado em 1,5g/kg/dia para bebês até 1 ano de idade, 1,1g/kg/dia para 1-3 anos, 0,95g/kg/dia para 4-13 anos, 0,85g/kg/dia para adultos e 1,1g/kg/dia para mulheres grávidas (utilizando peso de mulheres grávidas) e fase de lactação. RDA, Recomendação dietética aceitável.

*Valor de Ingestão Adequada (AI); Fonte:

<http://www.nap.edu/openbook/0309085373/html/589.html>

A homeostasia de proteína e o balanço nitrogenado são realizados através de um equilíbrio complexo entre ingestão protéica, metabolismo de proteínas e aminoácidos, que incluem *turnover* de toda proteína corporal, oxidação de aminoácidos, produção de uréia e excreção de nitrogênio durante jejum e períodos de alimentação ao longo do dia (MORENS *et al.*, 2000).

A **Figura 1** mostra a digestão e absorção de proteínas. A proteína da dieta é enzimaticamente hidrolisada no trato digestório, liberando aminoácidos livres, di e tri peptídeos que são então absorvidos pelo lúmen intestinal e transportados para o sangue portal. O aminoácido então passa para a circulação sistêmica e são extraídos por diferentes tecidos (SHILS *et al.*, 2003).

Figura 1 - Digestão e absorção de proteínas

Segundo ADIBI (2003), o intestino delgado pode ser considerado o principal órgão na digestão dos alimentos. Por muito tempo, foi convencionalizado que as proteínas são completamente hidrolisadas no lúmen intestinal e absorvidas como aminoácidos livres. No entanto, há cerca de 30

anos atrás, estudos de digestão protéica no intestino delgado de humanos, tem revelado que o principal produto da digestão de proteínas no lúmen intestinal não são aminoácidos livres e sim dipeptídeos e tripeptídeos. Sendo assim, esses di e tri peptídeos são transportados para o interior do enterócito através do transportador de oligopeptídeos (PEPT-1), fundamental na absorção de proteínas. A entrada de di e tri peptídeos nos enterócitos permitem ao organismo menor gasto de ATP, quando comparados com a entrada de aminoácidos livres, uma vez que o organismo gasta 1 ATP para entrada de cada aminoácido livre na célula.

Como o *turnover* no intestino delgado é intenso, com as células formadas nas criptas migrando para a extremidade das vilosidades, células epiteliais e outras são continuamente esfoliadas para o lúmen intestinal. Assim, além do nitrogênio presente nas fezes poder ser proveniente da dieta, a secreção de proteínas e a esfoliação de células no lúmen intestinal são formas de excreção de nitrogênio de origem não-alimentar. Neste sentido, cerca de 60 a 70 g de proteína são adicionados ao lúmen, 20 g podem ser oriundos das proteínas secretadas e 50 g podem originar-se das células descamadas (SHILS *et al.*, 2003).

2.3.2 Qualidade protéica da soja

Considera-se que a qualidade nutricional de uma proteína seja função de sua concentração disponível de aminoácidos essenciais (YOUNG & PELLET, 1991).

Em geral, as proteínas de origem vegetal não são consideradas de boa qualidade porque contêm baixa concentração destes aminoácidos. Nos

cereais, os aminoácidos limitantes são a isoleucina, a lisina, a treonina e o triptofano; nas leguminosas, os aminoácidos sulfurados. A solução para melhorar a qualidade nutricional destes alimentos pode ser: 1) combinação das origens protéicas para criar misturas com balanço de aminoácidos adequados; 2) suplementação de proteínas de baixa qualidade com aminoácidos essenciais; 3) desenvolvimento de proteínas de plantas com alta qualidade por reprodução de técnicas de biologia molecular (FRIEDMAN, 1996).

A qualidade nutricional da proteína também depende da biodisponibilidade do aminoácido que, por sua vez, varia com a fonte protéica, o processo térmico e interação com outros compostos da dieta (FRIEDMAN & BRANDON, 2001). O processo térmico melhora a qualidade nutricional da proteína da soja, através da inativação (entre 10 a 20%) do inibidor de tripsina (*Kunitz*) e do inibidor de tripsina-quimiotripsina (*Bowman-Birk*), facilitando, deste modo, a sua digestão pelas enzimas digestivas.

Em estudo conduzido por ISTFAN *et al.* (1983), a utilização de um concentrado protéico de soja em comparação com a proteína do leite, em ensaio com adultos jovens, por um período de 10 dias, proporcionou um balanço nitrogenado de 95 mg N/kg de massa corporal, demonstrando que esta proteína atendeu as necessidades de manutenção para a população estudada.

Outros estudos também comprovam a eficácia da utilização da soja como fonte protéica. Segundo BERTOL *et al.* (2000), a proteína concentrada de soja, bem como o farelo de soja associado ou não com leite desnatado em pó, na dieta de desmame de leitões com 21 dias de idade, não influenciou o desempenho nem a composição corporal dos leitões; o aproveitamento dos aminoácidos também foi semelhante entre as dietas. SOARES *et al.* (2000)

demonstraram também, em estudo com leitões desmamados (14 dias), que o farelo de soja substitui o leite em pó em rações contendo soro de leite.

2.4 Fitatos

Os fitatos, conhecidos também como ácido fítico, são compostos químicos utilizados pelas plantas para armazenar o mineral fósforo no interior de suas células. São considerados fatores antinutricionais, pois reduzem a biodisponibilidade no organismo de minerais divalentes como: cálcio, ferro, magnésio, manganês, cobre e zinco (EMBRAPA, 2005). Os fitatos podem alterar as propriedades funcionais e nutricionais dos alimentos, formando complexos insolúveis e indigeríveis com íons metálicos (CHERYAN, 1980). Isso ocorre através da interação dos grupos fosfatos com proteínas, minerais e amido, levando as alterações na funcionalidade, solubilidade, digestibilidade e absorção desses nutrientes (REDDY *et al.*, 1982).

Segundo Reddy *et al.* (1982) os cereais apresentam teores de ácido fítico entre 0,14 e 2,20% e as leguminosas entre 0,20 e 9,20%. Porém, o teor de fitato em relação ao fosfato total varia em função de cada espécie ou variedade, por exemplo, para a lentilha, uma leguminosa, esses teores variam de 27 a 87%, e para a soja entre 50 e 70%. O ácido fítico tem capacidade de formar complexos com cátions e proteínas multivalentes de forte ligação. A maioria dos complexos formados pelo ácido fítico e um metal são insolúveis em pH fisiológico e, conseqüentemente, tornam-se biologicamente inaproveitáveis para monogástricos.

Os fitatos têm algumas funções fisiológicas importantes, incluindo o armazenamento de fósforo e cátions, que fornecem matéria-prima para a

formação das paredes celulares, após a germinação da semente. Além disso, o ácido fítico protege a semente contra o dano oxidativo durante a sua armazenagem. Também funciona como um estoque de energia (ATP) e iniciador de dormência. A formação do ácido fítico durante a maturação da semente previne o acúmulo excessivo de fosfato inorgânico (LOLAS & MARKAKIS, 1975; ERDMAN, 1979, MAGA, 1982 e GRAF, 1983).

Cerca de 70% do fosfato está contido no ácido fítico integrado a proteínas e/ou minerais na forma de complexos e 75% do ácido fítico está associado a componentes da fibra solúvel presente na semente. O conteúdo de ácido fítico pode ser significativamente reduzido por processos como maceração, germinação e fermentação. A eficiência da degradação é maior nos processos que favorecem a ativação da fitase, como a fermentação e o cozimento. Esta enzima hidrolisa o ácido fítico, produzindo inositóis com menor número de fosforilações penta, tetra, tri, di e monofosfatos, os quais, com exceção do pentafofato, não atuam como quelante de nutrientes (OLIVEIRA, *et al*; 2003).

2.5 Métodos para avaliação da qualidade protéica

O objetivo dos métodos para avaliação da qualidade protéica na dieta é estimar a quantidade da utilização biológica da proteína (FRIEDMAN, 1996). Os métodos mais utilizados para determinar a qualidade protéica incluem: determinação da quantidade de aminoácidos essenciais, digestibilidade protéica e biodisponibilidade de aminoácidos (SARWAR & McDONOUGH, 1990).

Para a padronização dos métodos da razão da eficiência protéica (PER) e do coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR), os alimentos são testados em rações contendo 10% de proteína, sendo a caseína não-suplementada usada como proteína de referência (SARWAR & McDONOUGH, 1990).

Em 1991, a FAO/WHO recomendou como metodologia para avaliação da qualidade protéica de alimentos o método do “Escore químico corrigido pela digestibilidade real da proteína”, ou “*Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score – PDCAAS*”, para a qual sugeriu-se como padrão de referência (exceto para alimentos substitutos do leite materno) as necessidades de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos. O método considera a capacidade da proteína em fornecer aminoácidos essenciais, nas quantidades necessárias ao organismo humano, para o crescimento e a manutenção (WU *et al.*, 1995; SARWAR, 1997; RAITEN *et al.*, 1998).

2.5.1 Métodos biológicos

2.5.1.2 Coeficiente da eficiência protéica (PER)

O coeficiente da eficiência protéica (*Protein Efficiency Ration - PER*) é considerado método oficial no Canadá e nos Estados Unidos para avaliação da qualidade protéica em alimentos. O método consiste na relação entre o ganho de peso e a proteína consumida do grupo teste. A crítica mais séria ao método é que a fonte protéica pode não atender as necessidades de crescimento e ter um valor de PER quase zero e, ainda assim, ser adequada para as propostas de manutenção (SARWAR & McDONOUGH, 1990). Este método pode ainda subestimar o valor de proteínas vegetais (HENLEY & KUSTER, 1994),

principalmente aquelas deficientes em aminoácidos sulfurados, uma vez que os animais (ratos em crescimento) utilizados em ensaios, possuem necessidades relativamente maiores para estes aminoácidos se comparados a humanos (SARWAR *et al.*, 1984; FAO/WHO, 1991). Outro aspecto deste método é o de apresentar alto custo e baixa reprodutibilidade, não havendo proporcionalidade entre os valores obtidos para diferentes fontes protéicas como também incapaz de computar adequadamente a proteína necessária à manutenção (FAO/WHO, 1991; EL & KAVAS, 1996; RAITEN *et al.*, 1998).

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

Completando, cabe citar que os valores de PER abaixo de 1,5 sugerem que a proteína seja de baixa qualidade, para valores entre 1,5 e 2,0 a proteína é classificada como de qualidade intermediária e valores acima de 2,0 sugerem que a proteína seja de alta qualidade (FRIEDMAN, 1996).

2.5.1.3 Coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR)

O coeficiente de eficiência líquida da proteína é definido pela relação entre a soma do ganho de peso do grupo experimental mais a perda de peso do grupo aprotéico, dividida pelo consumo de proteína do grupo experimental. Por tanto neste método, através da inclusão de um grupo experimental ingerindo dieta livre de proteína, tanto a proteína utilizada para o crescimento

como para manutenção tem o mesmo valor (SARWAR & McDONOUGH, 1990).

2.5.1.4 Razão da utilização líquida da proteína (NPU)

Este método pode ser determinado pelo método de balanço de nitrogênio como também por ensaios de crescimento, em que se utilizam dados da determinação de nitrogênio total da carcaça do grupo experimental (SARWAR & McDONOUGH, 1990).

2.5.1.5 Balanço Nitrogenado

O balanço de nitrogênio é a diferença entre o nitrogênio ingerido e a soma do nitrogênio excretado nas fezes e urina. Em indivíduos adultos e saudáveis, recebendo uma dieta balanceada (adequada) em relação aos nutrientes nitrogenados deve-se encontrar o verdadeiro balanço de nitrogênio, isto é, o nitrogênio ingerido deverá ser igual a soma do nitrogênio excretado nas fezes e urina. Nos indivíduos em crescimento deve-se encontrar o chamado “balanço positivo” em que o nitrogênio ingerido deverá ser superior à soma do nitrogênio excretado pelas vias fecal e urinária. Essa situação de retenção do nitrogênio é necessária sempre que houver necessidade de formação de novos tecidos pelo organismo (SGARBIERI, 1996).

2.5.1.6 Digestibilidade protéica

O termo digestibilidade refere-se às proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado (SARWAR *et al.*, 1986). A *Food and Agriculture*

Organization (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugerem o uso dos valores de digestibilidade protéica para ajustar dados de composição de aminoácidos na avaliação da qualidade protéica (McDONOUGH *et al.*, 1990).

O procedimento clássico para determinar a digestibilidade é o índice fecal, um procedimento *in vivo* no qual o nitrogênio das fezes é subtraído da quantidade ingerida e o valor é expresso como porcentagem de ingestão, e isto, na verdade, pode ser considerado um valor de digestibilidade aparente (FAO/WHO, 1989). As proteínas que não são digeridas passam para o cólon e são excretadas nas fezes, junto com o nitrogênio de fontes não alimentares produzido pelas bactérias e pela descamação celular das células do intestino. Assim, a digestibilidade verdadeira ou corrigida pela excreção fecal metabólica, pode estimar esta produção endógena de nitrogênio através do grupo aprotéico.

A determinação da digestibilidade de aminoácidos pelo método do balanço nitrogenado aplicado no presente trabalho, é alvo de críticas devido a possível interferência da ação microbiana no intestino grosso sobre o nitrogênio protéico que não foi digerido e absorvido no intestino delgado. Tem sido demonstrado que o padrão do nitrogênio excretado pelas fezes é modificado pela microbiota presente no intestino grosso (SARWAR & PEACE, 1986).

Embora haja esta crítica ao método, ele ainda é o mais utilizado em estudos com animais para avaliação da qualidade da proteína.

O uso de modelo animal para determinação da digestibilidade permite mais flexibilidade e um maior controle das condições experimentais (DARRAGH *et al.*, 2000).

2.5.2 Métodos bioquímicos

2.5.2.1 Aminograma e escore químico (PDCAA)

Por definição o método do PDCAA significa escore químico corrigido pela digestibilidade protéica, e tem sido adotado pela FAO/WHO, como o método mais adequado para avaliação da qualidade da proteína. O método é baseado na comparação entre o valor do primeiro aminoácido essencial limitante da proteína teste e o valor do aminoácido padrão (escore). Na **Tabela 4**, estão apresentadas todas as fórmulas utilizadas no trabalho para avaliação da qualidade protéica.

Tabela 4 - Fórmulas utilizadas para avaliação da qualidade protéica

Método	Fórmula	Referência
Coeficiente de eficácia protéica (PER)	$[\text{ganho de peso grupo experimental} \div \text{consumo de proteína do grupo experimental}]$	SARWAR & McDONOUGH, 1990
Coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR)	$[\text{ganho de peso do grupo experimental} + (\text{perda de peso do grupo aprotéico}) \div \text{consumo de proteína do grupo experimental}]$	SARWAR & McDONOUGH, 1990
Razão da utilização líquida da proteína (NPU%)	$[\text{nitrogênio corporal retido} \div \text{nitrogênio ingerido}] \times 100$	MILLER & BENDER, 1953
Razão da utilização líquida da proteína (NPU%)	$[(\text{nitrogênio ingerido} - \text{nitrogênio fecal} - \text{nitrogênio urinário}) \div \text{nitrogênio ingerido}] \times 100$	BOZA <i>et al</i> , 1999
Balanço nitrogenado	$[\text{nitrogênio ingerido} - (\text{nitrogênio fecal} + \text{nitrogênio urinário})]$	SGARBIERI, 1996
Valor biológico da proteína (BV)	$[(\text{nitrogênio ingerido} - \text{nitrogênio fecal} - \text{nitrogênio urinário} \div \text{nitrogênio ingerido} - \text{nitrogênio fecal})] \times 100$	BOZA <i>et al</i> , 1999
Digestibilidade aparente (DA%)	$[(\text{ingestão protéica} - \text{excreção protéica}) \div \text{consumo protéico}] \times 100$	SARWAR & McDONOUGH, 1990
Digestibilidade corrigida pela excreção fecal metabólica (DC%)	$[\text{ingestão protéica do grupo experimental} - (\text{excreção protéica do grupo experimental} - \text{excreção de proteína do grupo aprotéico}) \div \text{ingestão protéica do grupo experimental} \times 100]$	SARWAR & SEPEHR, 2003
Digestibilidade protéica corrigida pelo escore de aminoácidos (PDCAA)	$[(\text{mg do aminoácido limitante contido em 1 g da proteína teste} \div \text{mg do aminoácido limitante contido em 1 g da proteína de referência} \times \text{digestibilidade verdadeira})] \times 100$	SARWAR, 1997 & SCHAAFSMA, 2000

2.6 Métodos para avaliação do estado nutricional

A avaliação do sistema hematopoético através da análise do hemograma, mielograma e esplenograma caracteriza o estado nutricional geral do indivíduo, uma vez que proteínas advindas da dieta são essenciais para manutenção celular, bem como sua funcionalidade e integridade.

As funções do sistema hematopoético são basicamente transporte de oxigênio, CO₂ e nutrientes, ação na resposta imune específica e inespecífica, nos sistemas de coagulação e fibrinolítica (WILLIAMS, 2001).

Em mamíferos adultos, a hematopoese suporta seu espaço natural primariamente na medula óssea. A produção de células sanguíneas em um padrão constante depende de componentes do microambiente presente na cavidade medular. Sob certas condições ou em determinados animais como os roedores, o baço também atua como órgão hematopoético, indicando que neste local também existe condições de hematopoese. O microambiente hematopoético é uma estrutura altamente organizada que regula a localização e fisiologia da célula-tronco hematopoética. Este sistema é composto por células de estroma (fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, adipócitos-lyke), células acessórias (linfócitos T, monócitos) e seus produtos (matriz extracelular e citocinas) (MAYANI *et al.*, 1992), que fornecem suporte mecânico para adesão e desenvolvimento das células hematopoéticas pluripotentes, assim como para células não hematopoéticas, como as do sistema vascular da medula (OPAS, 1994). Além da manutenção estrutural do tecido, o microambiente também contém citocinas que influenciam a atividade hematopoética, controlando a proliferação e diferenciação das células-tronco (EAVES *et al.*, 1991; BRACH & HERRMANN, 1991).

2.6.1 Métodos para avaliação do estado nutricional protéico (IGF-1, albumina e proteínas totais)

O crescimento é influenciado por fatores hormonais, e muitos dos quais são regulados pela família das somatomedinas, que constituem um grupo de fatores peptídicos de crescimento (PHILLIPS & VASSILOPOULOU-SELLIN, 1979). *Insulin-like-growth factor-1* (IGF-1), ou seja, o fator de crescimento semelhante à insulina parece ser o principal hormônio plasmático em humanos e ratos em crescimento. Este hormônio é produzido principalmente no fígado e transportado no sangue ligado a proteínas carreadoras (UNDERWOD *et al.*, 1980). O IGF-1 participa dos processos anabólicos de crescimento, este processo, diz respeito ao estímulo à captação celular de aminoácidos e glicose, agindo semelhantemente a insulina, daí a sua denominação de *insulin-like growth factor* (REEVES *et al.*, 1979; PREWITT *et al.*, 1982, PIMENTEL, 1994; PHILLIPS *et al.*, 1998).

O IGF-1 também atua no organismo promovendo a proliferação celular e a síntese de proteoglicanos pelos tecidos cartilagosos, conectivo e ósseo e mediando o efeito anabólico e de promoção de crescimento linear exercido pelo hormônio (GH) hipofisário. A maioria do IGF-1 é secretado pelo tecido hepático e é transportado para outros tecidos (ação endócrina), sendo também secretado por outros tecidos, incluindo as células cartilaginosas, onde age localmente (ação parácrina). A relevância do IGF-1 pode ser constatada em estudo com camundongos que apresentam redução de tamanho em 40% a 45% bem como redução no desenvolvimento muscular, sendo justificada com ausência de IGF-1 no plasma (LARON, 2001 & GOMES *et al.*, 2004).

A ação anabólica do IGF-1 é comprometida por estados fisiológicos específicos, tais como diabetes, deficiência protéica, exercício físico e restrição

energética, sendo estes fatores considerados reguladores da secreção e atividade biológica do IGF-1 (BONI-SCHNETZLER *et al.*, 1991; CLEMMONS *et al.*, 1991; PHILLIPS *et al.*, 1991; ISLEY *et al.*, 1993; RIBEIRO *et al.*, 1995; SMITH *et al.*, 1995; SANCHEZ-GOMEZ *et al.*, 1998).

Em crianças desnutridas, o IGF-1 encontra-se diminuído, os valores encontrados são inversamente proporcionais à concentração do GH e diretamente relacionados com o grau de depleção protéica (REEVES *et al.*, 1979; YOSHIMURA *et al.*, 1995). Em humanos e animais em crescimento, a redução da ingestão de proteínas origina uma queda imediata dos níveis plasmáticos de IGF-1 e, conseqüentemente, do crescimento muscular e ósseo, evidenciados pelo menor peso e comprimento corporal (JEPSON *et al.*, 1988). A sua normalização depende da adequação protéica da dieta de realimentação. Segundo vários pesquisadores, estas alterações se correlacionam com o balanço nitrogenado (CLEMMONS *et al.*, 1985; UNDERWOOD *et al.*, 1986).

Estudos mais recentes reforçam a ação do IGF-1 na regulação do metabolismo protéico em diversas condições nutricionais, correlacionando sua concentração com a quantidade e qualidade nutricional da proteína da dieta (SIMMEN *et al.*, 1998; AMMANN *et al.*, 2000; NOUGUCHI, 2000). A restrição protéica promove diminuição na concentração plasmática e tecidual de IGF-1, sendo essa diminuição decorrente da deficiência de insulina ou da diminuição da disponibilidade de aminoácidos (THISSEN *et al.*, 1994). Corroborando esse fato, TIRAPEGUI (1999) verificou uma diminuição significativa de 95% e 42% na concentração plasmática e muscular de IGF-1, respectivamente, em ratos em crescimento, alimentados com dieta a base de 5% de caseína em

comparação ao grupo controle, que consumia uma dieta contendo 12% de caseína. Similarmente, BOURRIN *et al.*, (2000) demonstraram que uma dieta contendo 2,5% de caseína promoveu diminuição de 37% na concentração plasmática de IGF-1 em ratas adultas.

Além da determinação do IGF-1, as concentrações plasmáticas de albumina e de proteínas totais são utilizadas na avaliação do estado nutricional, uma vez que esses parâmetros são sensíveis à quantidade de proteína na dieta.

A quantidade e a qualidade nutricional da proteína da dieta afetam o metabolismo protéico em animais. A ingestão de dietas deficientes em proteínas ou em aminoácidos indispensáveis promove a diminuição do conteúdo de proteína corporal e o aparecimento de um quadro de desnutrição grave. Paralelamente, ocorre a diminuição da concentração de algumas proteínas plasmáticas, tais como: albumina, pré-albumina e proteína ligadora de retinol (GOMES *et al.*, 2003; NOGUCHI, 2000)

3. JUSTIFICATIVA

Estudos de segurança têm sido realizados com plantas GM, principalmente envolvendo aspectos nutricionais. Estes estudos são conduzidos, normalmente, em diversas espécies de animais submetidos a avaliações nutricionais ou toxicológicas convencionais, por períodos curtos ou mais longos, normalmente até 90 dias (KUIPER *et al.*, 2001). Os estudos nutricionais incluem a oferta da soja na ração em concentrações variadas de 20, 30, 60 e 90%. A avaliação engloba análise do crescimento e do comportamento dos animais, bem como análises sanguíneas e genéticas. Outros estudos que determinam a avaliação da qualidade protéica incluem análise de digestibilidade *in vivo* e escore químico corrigido pela digestibilidade real (PDCAA).

Nesse sentido, o intuito deste trabalho foi avaliar a segurança do consumo da soja geneticamente modificada, por análises de parâmetros nutricionais e hematológicos. Para isso, foram conduzidos dois ensaios biológicos com ratos saudáveis e em crescimento por um período de 28 e 32 dias, respectivamente.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o efeito do consumo da soja GM no estado nutricional e os parâmetros hematológicos correlacionados em ratos saudáveis na fase de crescimento.

4.2 Específicos

- Verificar o efeito do consumo de soja GM e convencional, sobre o aproveitamento biológico da proteína ingerida;
- Verificar a influência da suplementação de aminoácidos essenciais (leucina, valina, lisina e metionina) das dietas com soja sobre o aproveitamento biológico da proteína;
- Avaliar o estado nutricional geral e protéico dos animais submetidos às dietas experimentais através de hemograma completo, mielograma e esplenograma, concentração plasmática de IGF-1, proteínas totais e albumina.

5. MATERIAL e MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Soja

O trabalho foi constituído de 2 ensaios biológicos. Para os ensaios foram utilizados cerca de 8 kg de soja GM, pertencente ao cultivar BR00-69526, que contém o gene CP4 modificado que codifica a enzima EPSPS (5 enolpiruvil fosfato sintase) e confere a resistência ao herbicida glifosato *Roundup*®, e 10 kg de soja parental não-transgênica, pertencente ao mesmo cultivar, todas provenientes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA – Goiás).

5.1.2 Fibra

Em ambos os ensaios, os grupos com soja não tiveram acréscimo de fibra na ração, em função do emprego de soja integral desengordurada e autoclavada.

No 1º ensaio biológico, foi utilizada a celulose microcristalina como fonte de fibra para os grupos controle e aprotéico.

Para o 2º ensaio biológico foi utilizado a casca de soja (cerca de 600 g), sendo incorporada como fonte de fibra na ração dos grupos controle e aprotéico. A casca foi fornecida pela Empresa Perdigão S.A. (Rio Grande do Sul).

5.1.3 Animais

Para os ensaios biológicos foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, variação *Albinus*) da linhagem Wistar Hannover, heterogênicos, recém-desmamados. No 1º ensaio biológico, os animais foram desmamados no 21º dia, com peso inicial aproximado, de 45 g, e no 2º ensaio, o desmame aconteceu no 26º dia, sendo o peso aproximado de 60 g. Os animais foram obtidos a partir de colônias mantidas no biotério de produção e experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP).

5.1.4 Reagentes

Os reagentes empregados nas análises de composição da soja, das rações e das carcaças dos animais foram todos de grau analítico.

Para análises de lipídeos foi utilizado:

- Éter etílico anidro;

Para análises de proteínas foram utilizados:

- Indicador de Kjeldhal: 0,2 g de vermelho de metila + 60 mL de etanol, completar solução com água destilada para volume de 100 mL; 0,1 g de azul de metileno + 30 mL de etanol, completar solução com água destilada para volume de 50 mL.
- Solução concentrada de ácido bórico;
- NaOH 40%;
- HCl 0,1N para titulação caseína e carcaça e HCl 0,02 N para titulação nas fezes, urina, amostras de soja, casca e rações.

Para as análises sanguíneas foram utilizados:

- Líquido de *Turk* – Ácido acético glacial (30 mL), água destilada (1000 mL) e 2 gotas de solução de violeta de Genciana a 1% ou de azul de metileno;
- Líquido de *Gower* – Ácido acético glacial (666 mL), Na₂SO₄ anidro (250 g) e água destilada (4000 mL).

Para análise de fibras, foi utilizado o Kit K-TDFR (Megazyme), contendo as seguintes enzimas:

- Protease purificada (E-BSPRT), α -amilase termoestável (E-BLAAM) e amiloglicosidase purificada (E-AMGDF).

Material especial – lã de vidro (Merck, cat. nº 1.04086.0500).

Para análise de proteínas totais foi utilizado:

- Sulfato de cobre 10%;
- Citrato de sódio;
- Solução de hidróxido de sódio 3%;
- Padrão proteínas totais (Labtest);

Para análise de albumina foi utilizado:

- Solução padrão de ácido succínico 0,1M (Merk);
- Solução de verde de bromocresol 0,6 mM (Merk);
- Albumina bovina (Sigma código A8022)

Para análise de IGF-1 foi utilizado: kit de radioimunoensaio (Mouse/Rat IGF-1 RIA DSL-2900) importado pela empresa (Gênese Produtos Farmacêuticos e Diagnósticos Ltda).

Para análise de fitato foi utilizado: ácido fítico Sigma código P-3168.

Para análise de aminoácidos foi utilizado; HCl 6N.

5.2 Métodos

5.2.1 Processamento da farinha de soja e casca de soja

A manipulação das amostras de soja GM ocorreu seguindo-se as recomendações da Comissão de Biossegurança da FCF. O laboratório está credenciado a realizar experimentos com material geneticamente modificado, conforme processo nº CQB 0090/98.

A soja GM e a casca de soja foram fornecidas em pó e a parental em grãos inteiros, havendo, neste caso, a necessidade de ser processada em moinho (Marconi®, Piracicaba, SP) para obtenção de uma farinha. Posteriormente, as amostras de soja foram desengorduradas em extrador de Soxhlet (AOAC, 1995). Após este procedimento as amostra de soja e casca de soja foram acondicionadas em sacos plásticos autoclaváveis e submetidas a autoclavagem (120°C, 5 min.). Após este procedimento, foram secas em estufa ventilada (40°C, 2 h), peneiradas em tamís (mesh nº 20), transferidas para potes plásticos herméticos e armazenadas em refrigerador (4°C), até o momento da elaboração das rações.

5.2.2 Composição química da farinha de soja, casca de soja e das rações experimentais

A composição química da farinha e da casca da soja, e das rações experimentais foi determinada segundo os métodos preconizados pela AOAC (1995) e outros específicos a seguir.

O teor de umidade foi determinado através da aferição da perda de peso das amostras submetidas ao aquecimento em estufa a 105°C até peso constante. Para o teor de cinzas, utilizou-se a metodologia proposta pelo

Instituto Adolfo Lutz (1995), que se fundamenta na determinação do peso do material restante, na amostra dessecada, após destruição da matéria orgânica a 550°C. Para a análise de lipídeos, foi determinado o peso do material extraído, por meio de éter etílico anidro. Para a determinação do nitrogênio, foi empregado o método de *Kjeldhal*, para volume reduzido (AOAC, 1995), utilizando-se, para obtenção do teor de proteína, os fatores de conversão 6,25, para a ração controle, e 5,52, para as amostras de soja e rações contendo soja (MOSSÉ, 1990).

Para a análise de fibra alimentar total (FAT), foi realizado o método enzimático-gravimétrico, utilizando-se o tampão fosfato (PROSKY *et al.*, 1992), com modificações (FILISSETTI-COZZI & LAJOLO, 1991). O auxiliar de filtração (Celite) proposto pelo método foi substituído pela lã de vidro, que foi tratada com HCl 0,5N. Este método consiste na digestão enzimática da amostra com α -amilase termoestável, amiloglicosidase e protease para a remoção de contaminantes de amido e de proteína, respectivamente, para a precipitação da fração solúvel com etanol a 98% (v/v) e para a posterior filtração, quando o resíduo é lavado, com etanol a 78% e a 95% e com acetona, sendo posteriormente seco e pesado.

5.2.3 Elaboração das rações experimentais

As rações foram elaboradas segundo as especificações da AIN-93G, com algumas modificações (REEVES *et al.*, 1993) (**Tabela 5**). As rações experimentais foram elaboradas pela empresa *Rhoster* (Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, SP), seguindo formulação fornecida para estes experimentos e analisadas no Departamento de Alimentos e Nutrição

Experimental da FCF/USP. Para as análises químicas, foram retiradas alíquotas aleatórias, de cada ração, que foram homogeneizadas em moinho (IKA[®] A10, Labortechnik, Alemanha) e, posteriormente, peneiradas em tamís (mesh nº 32). O restante foi acondicionado em sacos plásticos, que foram identificados e armazenados em refrigerador (4°C), até o momento de sua utilização.

No **1º ensaio biológico**, a quantidade protéica fornecida foi de 12% para grupo controle, soja parental e soja GM. O grupo controle recebeu a proteína proveniente da caseína, por ser considerada a fonte mais completa, pela variedade de aminoácidos presentes e pela facilidade de absorção e os demais grupos receberam proteína proveniente da farinha de soja desengordurada e autoclavada. Não houve necessidade de suplementar com fibra as rações contendo soja, tendo em vista a quantidade suficiente desta fração em sua composição. A fibra utilizada para o grupo controle e aprotéico foi a celulose, sendo que o cálculo para incorporação nas rações foi segundo os teores encontrados nas dietas com soja. O óleo de soja foi substituído pelo óleo de milho, conforme especificações da FAO/WHO (1989). Outra justificativa para o uso do óleo de milho, foi para não ter outra fonte de soja a não ser a própria farinha desengordurada e autoclavada na ração. Os valores de carboidratos totais (carboidratos disponíveis e não disponíveis) da amostra foram determinados por diferença entre os demais componentes.

No **2º ensaio**, a quantidade protéica oferecida foi de 10%, sendo que as rações com soja foram suplementadas com os aminoácidos essenciais leucina, lisina, metionina e valina, este perfil foi confirmado pelos resultados obtidos com o aminograma realizado com as rações do primeiro ensaio. A fonte de

fibra utilizada para o grupo controle e aprotéico foi a casca de soja autoclavada, com o objetivo de verificar possíveis influências sobre peso seco e teor de umidade das fezes.

Tabela 5 - Distribuição dos componentes nas rações experimentais ¹

redientes (%)	1º ensaio biológico				2º ensaio biológico			
	Controle	Aprotéico	Soja Parental	Soja GM	Controle	Aprotéico	Soja Parental	
ina	14,52	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
3% de proteína)								
ina	_____	_____	_____	_____	12,44	_____	_____	
7% de proteína)								
² (celulose)	7,54	7,54	_____	_____	_____	_____	_____	
² (Casca de soja)	_____	_____	_____	_____	6,38	6,38	_____	
de milho	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	
ina	0,30	_____	0,30	0,30	0,30	_____	0,30	
na	_____	_____	_____	_____	_____	_____	0,06	
l	_____	_____	_____	_____	_____	_____	0,06	
nina	_____	_____	_____	_____	_____	_____	0,12	
a	_____	_____	_____	_____	_____	_____	0,09	
arato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	
ra vitamínica	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
ra mineral	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	
rose	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	
(12% de proteína)	_____	_____	31,68	29,68	_____	_____	_____	
(10% de proteína)	_____	_____	_____	_____	_____	_____	18,71	
o	55,89	70,71	46,27	48,27	59,13	71,87	58,91	
	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	

Foram as especificações da AIN-93G, com modificações (REEVES, 1993);

Para os grupos soja parental e soja GM, foi utilizada a proteína proveniente da soja;

O valor de fibra do grupo controle foi calculado segundo a média do teor de fibra da soja GM e sua parental. Para os grupos soja, a fibra não foi suplementada devido a soja apresentar quantidade suficiente;

Para os grupos de soja parental e GM, utilizados para cálculo da ração com 12% de proteína foi o valor de 37,37 g e 40,27 g, respectivamente, cálculo baseado em base desengordurada e autoclavada;

Para os grupos de soja parental e GM, utilizados para cálculo da ração com 10% de proteína foi o valor de 53,43 g e 48,27 g, respectivamente, cálculo baseado em base desengordurada e autoclavada.

Mistura salina AIN-93G*. Carbonato de cálcio 357 g; Sacarose 210 g; Fosfato de potássio monobásico 196 g; Cloreto de sódio 74 g; Citrato de potássio 70,78 g; Sulfato de potássio 46,6 g; Óxido de magnésio 24 g; Citrato férrico 6,06 g; Carbonato de zinco 165 g; Carbonato de manganês 0,63 g; Carbonato de cobre 0,30 g; Iodato de potássio 0,01 g; Selenato de sódio 0,01025 g; Paramolibdato de amônia 0,00795 g; Metasilicato de sódio 1,45 g; Cloreto de lítio 0,0174 g; Ácido bórico 0,0815 g; Fluoreto de sódio 0,0635 g; Carbonato de níquel 0,0318 g; Vanadato de amônia 0,0066 g; Sulfato de cromo e potássio 0,275 g.

Mistura vitamínica AIN-93G*. Ácido nicotínico 3 g; Pantotenato de cálcio 1,6 g; Piridoxina HCL 0,7 g; Tiamina HCL 0,6 g; Tiamina HCL 0,6 g; Riboflavina 0,6 g; Ácido fólico 0,2 g; D-Biotina 0,2 g; Vitamina B₁₂ 0,1% manitol 2,5 g; Vitamina E (500UI/g) 15 g; Vitamina A (500 mil UI/g) 0,8 g; Vitamina D₃ (400 mil UI/g) 0,25 g; Vitamina K 0,075 g; Sacarose 974,655 g.

* As misturas foram fornecidas pela empresa *Rhoster*.

O cálculo do valor energético das rações experimentais utilizadas no ensaio foi realizado através da multiplicação dos fatores 4, para carboidratos disponíveis e proteínas, e 9 para lipídeos. Os resultados foram expressos em kcal por 100 g de amostra.

5.3 Protocolo experimental

O protocolo experimental utilizado foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FCF/USP. Para os ensaios biológicos, foram utilizados sessenta e quatro animais recém-desmamados (n=32 para cada ensaio), divididos em quatro grupos de oito ratos cada um, sendo denominados de grupo controle, grupo aprotéico, grupo soja parental e grupo

soja GM. O grupo que recebeu a soja parental foi utilizado como um grupo controle da soja GM.

Os animais foram fornecidos em caixas ($n = 10$) com maravalha e foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais de aço inoxidável, logo após divisão dos grupos por homogeneidade de peso. O consumo de ração foi registrado diariamente e o controle de peso, a cada três dias, ao longo de 28 dias de ensaio (1º ensaio) e 32 dias (2º ensaio). O Coeficiente de eficácia alimentar (CEA) foi calculado através da relação entre ganho de peso e o consumo da ração no final do ensaio. A ração e a água foram fornecidas *ad libitum*. Durante todo o período de ensaio, os animais foram mantidos em temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $55 \pm 10\%$, com ciclos alternados de claro/escuro de 12h (das 8 às 20 h, claro, e das 20 às 8 h, escuro).

A coleta de fezes e de urina foi realizada em 2 períodos de balanço, constituído por 6 dias cada um, tendo início no (10º e 24º dias de experimento, no 1º ensaio, e 9º e 28º dias, no 2º ensaio), sendo as fezes acondicionadas em sacos plásticos, individualizada para cada animal e armazenadas em congelador a -20°C , até o momento das análises. A urina foi acondicionada em recipientes plásticos herméticos e também armazenada em congelador a -20°C , até o momento das análises. O 1º período de balanço incluiu a coleta do grupo aprotéico.

Houve uma subdivisão de grupos para o sacrifício dos animais logo após divisão dos grupos experimentais no primeiro dia de ensaio para garantir que todos os animais tivessem o mesmo tempo de experimento. Neste período, os animais receberam a ração caseína com (12% de proteína 1º ensaio e 10%

2º ensaio). Todos os animais foram mantidos em restrição alimentar por 8 h antes do sacrifício, para padronização metabólica das análises de proteína. Os animais foram anestesiados com uma solução contendo xilazina (Coopazine® 2%, Coopers, São Paulo, 30 mg/100 kg de peso corporal), um sedativo, e quetamina (Vetaset, Fort Dodge®, Campinas, 10 mg/kg de peso corporal), um agente anestésico, na proporção 2:1, respectivamente, através de injeção intraperitoneal. O sangue foi coletado pela veia aorta abdominal e, logo em seguida, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical. Os animais do grupo aprotéico foram sacrificados no 15º dia de ensaio e os animais dos demais grupos foram sacrificados entre o 29º e o 35º dias do período experimental, sendo utilizado o mesmo número de animais de cada grupo em um mesmo dia.

O fígado, o baço e os rins foram removidos, limpos com solução salina (NaCl, 0,85%, p/v) e pesados. As carcaças com a cabeça, mas, sem as vísceras, foram armazenadas em congelador (-20°C), para posterior análise de nitrogênio.

5.4 Avaliação do aproveitamento biológico da proteína

As determinações de nitrogênio foram realizadas nas fezes, na urina e na carcaça dos animais, pelo método de *Kjeldhal* (AOAC, 1995). O teor de umidade das fezes foi determinado através da perda de peso das amostras submetidas ao aquecimento em estufa regulada a 105°C. Após a secagem (14h), as fezes coletadas, de cada animal, foram agrupadas em cada período de balanço e moídas em moinho (IKA® A10, Labortechnik, Alemanha) sendo, em seguida, acondicionadas e armazenadas em congelador (a -20°C) até o

momento das análises. As amostras de urina, de cada animal, foram descongeladas em banho (40°C), também agrupadas por período de balanço em um grupo, filtradas e, após medição do seu volume, foram acondicionadas em recipientes plásticos herméticos e novamente armazenadas em temperatura de -20 °C, até o momento das análises.

Para análise de nitrogênio na carcaça, víceras (intestino, estômago, baço, rins, fígado, pâncreas), pulmão e coração de cada animal foram retirados e, após este procedimento, os animais foram secos em estufa ventilada (60°C) por sete dias, sendo em seguida retirada a gordura por meio de éter etílico (IAL, 1985). Depois de desengorduradas, as amostras foram moídas em moinho (IKA® M20, Labortechnik, Alemanha) e posteriormente peneiradas em tamís (mesh nº20).

Para estabelecer a digestibilidade corrigida, foi determinada a proteína fecal metabólica, representada pelo nitrogênio excretado nas fezes dos animais do grupo aprotéico (SARWAR & PEACE, 1986).

5.5 Análise de aminoácidos

As análises de aminoácidos das rações foram realizadas no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas.

Para análise de aminoácidos, as amostras foram submetidas a uma hidrólise ácida em HCl 6N (5 mg de nitrogênio/mL de HCl) por 22 h a 110°C em ampolas secadas à vácuo, de acordo com o procedimento originalmente descrito por Moore (1958). 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, marca Pickering). Uma alíquota de 25 µL 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.

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

O triptofano, que é destruído durante a hidrólise ácida, foi quantificado seguindo-se o método descrito por Spies (1967), usando-se hidrólise enzimática com pronase a 40°C por 24 h. A amostra hidrolisada foi submetida à reação colorimétrica com p-dimetilano benzaldeído (DAB) e posterior leitura em espectrofotômetro a 590nm. A concentração de triptofano foi calculada por comparação com uma curva padrão.

5.6 Análise de fitatos

As análises de fitatos foram realizadas pelo Dr. Ralf Greiner do *Federal Research Center for Nutrition and Food Center for Molecular Biology*, Alemanha, segundo metodologia (SANDBERG & AHDERINNE, 1986).

5.7 Processamento das amostras sanguíneas: sangue e plasma

Para obtenção do sangue total (hemograma e contagem de reticulócitos), foi utilizado como anticoagulante o EDTA 10%. O plasma foi separado por centrifugação (2000 x g por 10 min) a 4°C e congelado em alíquotas a -80°C, para análise de IGF-1, proteínas totais e albumina plasmáticas.

5.7.1 Determinação do hemograma e reticulócitos

As contagens de hemograma e reticulócitos foram realizadas segundo DACIE & LEWIS (1995). Para a determinação do volume do hematócrito foi utilizado o método de *Strumia* e, para a concentração de hemoglobina, o método da cianometahemoglobina (DACIE & LEWIS, 1995).

A contagem do número de eritrócitos foi realizada em câmara de *Neubauer*, utilizando-se sangue total diluído 1:200 (v/v) em líquido de *Gower* (ácido acético glacial (666 mL), Na₂SO₄ anidro (250 g) e água destilada (4000 mL)) (LIMA *et al.*, 1992).

Utilizando-se a relação entre hematócrito, hemoglobina e contagem de eritrócitos foi possível calcular os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Os reticulócitos foram determinados pela coloração supravital com Novo Azul de Metileno (BRECHER, 1949).

O número de leucócitos foi determinado em câmara de *Neubauer*, utilizando-se a diluição de 1:20 (v/v) em líquido de *Turk* (ácido acético glacial (30 mL), água destilada (1000 mL) e 2 gotas de solução de violeta de Genciana a 1% ou de azul de metileno) (DACIE & LEWIS, 1995).

Os valores relativos e absolutos do número de leucócitos foram determinados em extensões sanguíneas, realizadas após a coleta do sangue e coradas pela coloração de *May Grunwald-Giensa*, modificada (ROSENFELD, 1947).

5.7.2 Mielograma

Para a análise do mielograma, o fêmur direito de cada animal foi retirado e as células da medula óssea foram obtidas por meio de lavagem da cavidade femoral com meio *McCoy's 5A*[®], modificado (Sigma[®], Chemical Company, USA), utilizando-se seringa de 1mL e agulha de calibre 26 mm. A suspensão celular foi colocada em tubos plásticos, cuidadosamente homogeneizada com pipeta tipo *Pasteur* e mantida em banho de gelo. As células obtidas da medula óssea foram quantificadas em hemocitômetro de *Neubauer*, após diluição de 1:100 (v/v) em líquido de *Turk*.

Para avaliação morfológica foram feitas lâminas obtidas por citocentrifugação (Incibrás[®], 1000 RPM, 5 min, temperatura, ambiente) de amostras da suspensão celular e, posteriormente, submetidas à coloração de *May Grunwald-Giensa* (ROSENFELD, 1947).

5.7.3 Esplenograma

O baço foi retirado e transferido para uma placa de *Petri* de plástico, contendo meio de cultura *McCoy's 5A*[®] (Sigma[®], Chemical Company, EUA) modificado, contendo EDTA 10%, utilizado somente para a coleta das células. Na placa de *Petri*, a cápsula do órgão foi rompida, em uma de suas extremidades, com o auxílio de duas agulhas dobradas em "L", e fixas em seringas. As células foram delicadamente retiradas da cápsula pelo método de dissociação. A suspensão foi homogeneizada na placa com pipeta tipo *Pasteur*, para completa dissociação celular, e transferida para tubo cônico de plástico, que foi mantido em banho de gelo.

As células obtidas do baço foram quantificadas em hemocitômetro de *Neubauer*, após diluição de 1:500 (v/v) em líquido de Turk.

Para avaliação morfológica foram feitos citocentrifugados (Incibrás®, 900 rpm, 5 min, temperatura ambiente) da suspensão celular e, posteriormente, submetidos à coloração de *May Grunwald-Giensa*, modificado (ROSENFELD, 1947).

5.7.4 Critérios para classificação das células hematopoéticas

A classificação das células da linhagem granulocítica nos órgãos hemopoéticos de ratos foi baseada na relação núcleo-citoplasma, afinidade tintorial do citoplasma, e das organelas celulares, na presença ou não de granulações primária e secundária no citoplasma, no padrão de cromatina nuclear, na presença ou não de nucléolos, no diâmetro e segmentação, ou não do núcleo. Na série granulocítica, foram consideradas quatro etapas maturativas: blastos, envolvendo o hemocitoblasto e mieloblasto; formas jovens, englobando as etapas de promielócito e mielócito; formas em anel, correspondentes ao metamielócito e ao bastonete; segmentados, envolvendo as formas segmentadas a partir de 2 lóbulos nucleares (GARCIA, 1992).

Os precursores eritróides serão classificados em eritoblastos jovens, envolvendo proeritroblastos e eritoblastos basófilos; eritoblastos policromáticos, englobando todas as etapas em que as células apresentavam cromatina condensada e citoplasma basófilo ou policromatófilo; e eritoblastos ortocromáticos, incluindo células com núcleo apresentando cromatina picnótica e citoplasma eosinofílico. Quando as células apresentarem assincronismo maturativo, prevalecerá o aspecto da cromatina nuclear para identificação da

etapa maturativa.

A identificação dos monoblastos e plasmoblastos seguiu os critérios morfológicos do padrão de cromatina nuclear e basofilia do citoplasma. Promonócitos, monócitos e macrófagos foram reunidos em um grupo de células denominadas de mono-macrofágicas.

As células da linhagem linfóide envolvendo pro-linfócitos e linfócitos típicos ou atípicos foram agrupadas como linfócitos. As células da linhagem plasmocitária serão agrupadas como plasmócitos.

Nas preparações obtidas, tanto da medula óssea quanto do baço, foi realizada a contagem diferencial, contando-se, no mínimo, 200 células por lâmina.

5.8 Determinação de proteínas totais, albumina e IGF-1 plasmáticos

Para a determinação das proteínas totais no plasma foi utilizado o método de Biureto (GORNALL *et al.*, 1949) e a determinação da albumina foi feita através do corante de bromo cresol. As amostras foram processadas em duplicatas e as leituras realizadas em espectrofotômetro UV-(Shimadzu.mini 1240) a 628nm.

Para a contagem do IGF-1 total foi utilizado aparelho de radioimunoensaio.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis peso e consumo de ração foram comparadas entre os quatro grupos ao longo do tempo de experimentação através de ANOVA para medidas repetidas seguida de teste de Tukey HSD para identificação de contrastes significativos. As demais variáveis avaliadas neste estudo foram tratadas por ANOVA univariada. A homogeneidade das variâncias foi verificada pelos testes de Hartley (F-max), Cochran C e Bartlett. Nos casos em que tal suposição foi significativa, os dados foram transformados ou analisados através de testes não paramétricos (Kruskal Wallis seguido de comparação múltipla). Os valores foram expressos com média e desvio padrão adotando-se um valor α de 0,05. O software Statistica v.6 (Statsoft Inc., Tulsa, OK) foi utilizado para a elaboração de cálculos e gráficos.

Para as análises hematológicas foi aplicada análise estatística *Kruskal-Wallis* com pós-teste de comparação múltipla DUNN.

7. RESULTADOS e DISCUSSÃO

7.1 Processamento e caracterização química das amostras

Os resultados da composição química da soja GM, da soja convencional e da casca de soja estão apresentados na **Tabela 6 e 7**. A análise química não revelou nenhuma diferença significativa nas concentrações de proteína, lipídeos, cinzas, fibras e carboidratos totais entre as duas amostras.

Para a preparação das rações houve a necessidade de desengordurar as amostras de soja, devido a sua elevada concentração em lipídeos (cerca de 20%) (FRIEDMAN & BRANDON, 2001). No presente estudo, os valores encontrados variaram de 20 a 30% de lipídeos, na amostra integral. Além disso, tal procedimento foi adotado em virtude da necessidade de adequar a quantidade deste nutriente as recomendações, para animais experimentais (ratos) em crescimento, preconizadas pela AIN-93(G) (REEVES *et al.*, 1993).

Com o intuito de melhorar o aproveitamento da proteína vegetal e também para eliminar fatores antinutricionais, como inibidores enzimáticos, lectinas, fitatos e taninos (COSTA & BORÉM, 2003), as sojas GM, sua parental e a casca de soja foram submetidas a autoclavagem (120°C, 5 min). Além de eliminar os fatores antinutricionais, o processamento térmico também provoca ruptura da parede celular, que é responsável pelo baixo aproveitamento protéico, liberando assim a proteína que se encontra complexada ou encapsulada (MENDES *et al.*, 2004). Por outro lado, o processamento térmico pode provocar reação de *Maillard*, escurecimento não enzimático, e reação de beta-eliminação, pelo excesso de calor (HEIDENREICH, 1994; MENDES *et al.*, 2004), levando a perda da função biológica da proteína. Por este motivo, foi testado o melhor tempo/temperatura de autoclavagem, nas seguintes

condições: 120° C, variando o tempo entre 5, 10 e 15 min, e 110° C, por 30 min. Deste modo, foi verificado um menor escurecimento da amostra na temperatura de 120° C, durante 5 min. Segundo SAINI (1989), a temperatura de 121° C, por 5 min, inativa 80% dos inibidores de tripsina e 95% dos inibidores de quimiotripsina em legumes e cereais.

Tabela 6 - Composição química (%) das amostras de soja¹(1º ensaio)

	Soja parental			Soja GM		
	AI ²	ADA ²	ADAS ²	AI ²	ADA ²	ADAS ²
Umidade	8,16 ± 0,45	7,34 ± 0,18	---	7,51 ± 0,04	9,51 ± 0,05	---
Cinzas	4,30 ± 0,23	6,00 ± 0,05	6,47 ± 0,06	4,29 ± 0,25	5,45 ± 0,05	5,99 ± 0,01
Proteína ³ (N x 5,52)	29,27 ± 0,48	37,87 ± 1,47	40,87 ± 1,54	27,87 ± 0,20	40,42 ± 1,63	43,65 ± 0,43
Extrato etéreo	28,98 ± 1,13	0,54 ± 0,06	0,57 ± 0,07	30,02 ± 1,73	0,71 ± 0,02	0,78 ± 0,02
Fibra total	18,11 ± 0,35	25,50 ± 0,56	27,52 ± 0,53	16,55 ± 0,34	23,65 ± 0,55	26,14 ± 0,53
Carboidratos totais ⁴	29,29	48,25	52,09	30,31	43,91	49,58

¹ Resultados expressos como média e desvio padrão, $n = 3$, exceto para a fibra total, $n = 4$.

² AI, amostra integral; ADA, amostra desengordurada e autoclavada; ADAS, amostra desengordurada autoclavada e seca.

³ Valor de conversão, segundo MOSSÉ (1990).

⁴ Os carboidratos totais foram determinados pela diferença dos demais constituintes, não considerando o valor de fibras.

Tabela 7 - Composição química (%) das amostras de soja¹ e casca de soja (2º ensaio).

	Soja parental			Soja GM			Casca de soja ²
	AI ³	ADA ³	ADAS ³	AI ³	ADA ³	ADAS ³	
Umidade	9,05 ± 0,03	8,96 ± 0,08	—	7,91 ± 0,24	10,17 ± 0,05	—	8,12 ± 0,06
Cinzas	4,34 ± 0,03	5,75 ± 0,02	6,31 ± 0,02	4,61 ± 0,02	5,68 ± 0,03	6,32 ± 0,03	5,38 ± 0,30
Proteína ⁴ (N x 5,52)	39,43 ± 1,23	53,43 ± 4,00	58,68 ± 3,59	44,10 ± 0,44	48,32 ± 2,25	53,79 ± 2,04	16,48 ± 0,58
Extrato etéreo	19,44 ± 0,21	0,53 ± 0,06	0,57 ± 0,05	22,75 ± 0,52	0,71 ± 0,04	0,79 ± 0,04	4,13 ± 0,20
Fibra solúvel	2,06 ± 0,11	2,56 ± 0,16	2,82 ± 0,15	2,95 ± 0,13	3,86 ± 0,21	4,29 ± 0,20	4,70 ± 0,57
Fibra insolúvel	18,67 ± 0,23	23,17 ± 0,32	25,46 ± 0,31	18,80 ± 0,26	24,35 ± 0,39	27,10 ± 0,38	58,70 ± 0,29
Fibra total	20,73 ± 0,23	25,75 ± 0,29	28,27 ± 0,32	21,75 ± 0,32	28,21 ± 0,40	31,39 ± 0,44	63,41 ± 0,52
Carboidratos totais ⁵	27,74	31,33	34,44	20,63	35,12	39,1	65,89

¹ Resultados expressos como média e desvio padrão, $n = 3$, exceto para a fibra $n = 4$.

² Casca de soja autoclavada e desengordurada.

³ AI, amostra integral; ADA, amostra desengordurada e autoclavada; ADAS, amostra desengordurada autoclavada e seca.

⁴ Valor de conversão, segundo MOSSÉ (1990)

⁵ Os carboidratos totais foram determinados pela diferença dos demais constituintes, não considerando o valor de fibras.

7.1.2 Caracterização química das rações experimentais

A **Tabela 8** apresenta os valores das análises da composição química das rações experimentais utilizadas nos ensaios. Foram elaboradas rações para animais em crescimento, de acordo com o AIN-93 (REEVES *et al*; 1993), com algumas modificações. As rações do 1º ensaio foram formuladas de modo a conter 12% (p/p) de proteína. Entretanto, os valores determinados variaram entre 11,25 a 12,39% de proteína, não havendo diferença estatística entre os valores, pela análise de variância (ANOVA). Para o 2º ensaio, as rações foram elaboradas de modo a conter 10% (p/p) de proteínas e os grupos com soja foram suplementados com os aminoácidos metionina, leucina, valina e lisina. A suplementação da ração no 2º ensaio foi realizada a partir dos resultados do aminograma e a quantidade de aminoácido introduzida foi calculada tendo como referência a ração controle. Os aminoácidos que apresentaram valores inferiores a ração controle foram suplementados.

Tabela 8 - Composição química (%) das rações experimentais¹

	1º ensaio biológico				2º ensaio biológico			
	Controle	Aprotéica	Soja parental	Soja GM	Controle	Aprotéica	Soja parental	Soja GM
Umidade	7,19 ± 0,14 b	7,24 ± 0,07 b	6,16 ± 0,20 a	8,09 ± 0,05 c	6,52 ± 0,27 a	8,12 ± 0,27 b	8,37 ± 0,06 b	6,48 ± 0,15 a
Cinzas	2,39 ± 0,03 a	2,41 ± 0,08 a	4,07 ± 0,18 b	3,76 ± 0,17 b	2,71 ± 0,03 b	2,21 ± 0,15 a	3,58 ± 0,31 c	3,62 ± 0,10 c
Proteína ²	11,26 ± 1,17 a	0,56 ± 0,01 b	12,39 ± 0,26 a	12,16 ± 0,19 a	10,78 ± 0,15 a	1,13 ± 0,99 b	10,26 ± 1,06 a	10,32 ± 1,14 a
Extrato etéreo	6,77 ± 0,05 a	6,96 ± 0,06 b	6,95 ± 0,04 b	6,81 ± 0,07 ab	6,75 ± 0,21 ab	6,39 ± 0,09 ab	6,35 ± 0,57 a	7,31 ± 0,38 b
Fibra total	8,37 ± 0,15	7,75 ± 0,16	7,87 ± 0,21	7,77 ± 0,18	0,84 ± 0,19 a	7,71 ± 0,38 b	6,98 ± 0,16 c	8,57 ± 0,41 c
Carboidratos totais ³	72,40	82,83	70,43	69,18	73,24	82,15	71,44	72,27

¹ Resultados expressos, em base úmida, como média e desvio padrão, $n=3$, exceto para a fibra total, $n=4$.

² As determinações de proteína foram realizadas utilizando-se o método de Kjeldhal (AOAC, 1995). Para as rações (Nx5,52, soja parental e soja GM [MOSSI 1990]), $n=3$.

³ Os carboidratos totais foram determinados por diferença dos demais constituintes, não considerando o valor de fibras.
Letras iguais em uma mesma linha não indicam diferença significativa.

Os valores de 10-12,5% de caseína na ração são condizentes com as necessidades de proteína para manutenção (5%) e crescimento (15%), para animais de experimentação (ratos), segundo o *National Research Council* (1995). Neste contexto, a FAO/WHO (1989) afirma que, ao se fornecer uma quantidade protéica entre 7 a 10%, o destino desta proteína é principalmente para síntese de proteínas corporais.

As rações experimentais foram formuladas de modo a proporcionar um valor energético equivalente. Deste modo para o 1º ensaio, foi encontrado o valor de 384 Kcal/100 g para as rações controle, aprotéica, soja parental e soja GM. No 2º ensaio, foi encontrado o valor de 389 Kcal/100 g na ração controle, 390 Kcal/100 g na ração aprotéica e 387 Kcal/100 g nas rações com soja.

7.2 Crescimento dos animais durante os experimentos

A evolução do peso, ao longo dos períodos experimentais, dos animais alimentados com rações controle, aprotéica, soja parental e soja GM e rações com soja suplementada estão apresentadas nas **Figuras 2 e 3**. No 1º ensaio não foram observadas diferenças estatísticas de crescimento entre os grupos, exceto para o grupo aprotéico. Conforme mostra as **Figuras 2 e 3**, o grupo aprotéico apresentou uma diminuição de peso, demonstrando que a restrição protéica (0,56% de proteína na ração) afetou o consumo de ração dos animais (**Tabela 9**). A perda de peso do grupo aprotéico também pode ser justificada pela redução da síntese e aumento da degradação de proteínas musculares, alterando a distribuição de proteína corporal e afetando na perda de peso (YOUNG & MARCHINI, 1990).

Figura 2 - Evolução do peso (1º ensaio), ao longo do período experimental, em animais submetidos a dietas controle, aprotéica, soja parental e soja GM.

Segundo GIETZEN *et al.* (1998), os animais possuem mecanismos que oferecem vantagens para a seleção de uma dieta balanceada que proporcione todas as necessidades nutricionais. Quando dietas que resultam em deficiência de aminoácidos essenciais são oferecidas a ratos, a redução da concentração destes aminoácidos é reconhecida em áreas cerebrais específicas. O reconhecimento da deficiência induz a aversão ao alimento mediada em parte pela serotonina. A redução na ingestão de alimentos pode derivar também de transtornos hipotalâmicos, determinados por lesões locais e de distúrbios psicogênicos, como o identificado na anorexia nervosa (WARTERLOW, 1996).

Figura 3 - Evolução do peso (2º ensaio), ao longo do período experimental, em animais submetidos a dietas controle, aprotéica, soja parental e soja GM.

As quantidades de 10 e 12% de proteína na dieta foram suficientes para os animais se desenvolverem, como mostra a literatura. Segundo DU *et al.* (2000), ratos em crescimento consumindo rações contendo teores de proteína de 2, 5, 8, 10, 15 e 20%, têm melhor aproveitamento, com a oferta entre 8 e

10%. Estes autores também verificaram que quando houve diminuição na oferta de proteína na ração de 20 para 15%, ocorreu uma diminuição na ingestão alimentar diária e, quando a oferta diminuiu para 10%, ocorreu, por outro lado, um aumento na ingestão alimentar diária. Esta situação também foi verificada por MEYER (1958), que sugere que os mecanismos que controlam a ingestão de proteína e energia interagem com o controle total de ingestão alimentar. Segundo YOUNG & MARCHINI (1990), quando há restrição de proteína na dieta, para células e órgãos, o organismo promove uma mudança metabólica que inicialmente favorece a conservação da proteína. Estas mudanças na eficiência metabólica parecem ser resultados da adaptação da termogênese induzida pela dieta associada a um aumento da atividade do tecido adiposo (ROTHWELL & STOCK, 1987).

No segundo ensaio os animais foram alimentados com oferta de 10% de proteína na ração, o que fornecia por dia uma média de 16,25 g de ração, disponibilizando cerca de 1,62 g de proteína e 70 kcal diariamente. A suplementação da ração com aminoácidos essenciais (metionina, valina, leucina e lisina) favoreceu o crescimento dos animais, visto que foi observado um aumento de peso de aproximadamente 50 g em relação ao 1º ensaio. O crescimento dos animais ocorreu de maneira progressiva durante os dois ensaios realizados, verificando que tanto a oferta de 10% de proteína na ração, quanto a de 12% são suficientes para que o organismo desenvolva seu crescimento de maneira adequada.

7.3 Parâmetros nutricionais avaliados durante os dois ensaios

Na **Tabela 9** estão apresentados os valores de peso (g), ganho de peso (g), consumo ração (g), consumo de proteína (g), energia diária consumida em (Kcal) e (KJ), coeficiente de eficácia alimentar (CEA), coeficiente de eficácia protéica (PER), coeficiente de eficácia líquida da proteína (NPR), coeficiente de utilização líquida da proteína (NPU), valor biológico da proteína (BV), digestibilidades aparente e digestibilidade corrigida (%) durante os dois ensaios realizados.

Tabela 9 - Parâmetros nutricionais de ratos alimentados com dietas experimentais.

Parâmetros estudados	1º ensaio ¹			2º ensaio ²		
	Grupo controle	Grupo soja parental	Grupo soja GM	Grupo controle	Grupo soja parental	Grupo soja GM
Peso Inicial ³ (g)	46,24 ± 5,55 a	46,11 ± 5,73 a	47,09 ± 3,97 a	69,39 ± 8,00 a	69,16 ± 3,98 a	69,32 ± 4,40 a
Peso Final ⁴ (g)	140,87 ± 19,44 a	158,44 ± 16,60 a	140,46 ± 14,60 a	222,20 ± 37,66 a	234,49 ± 18,90 a	234,91 ± 12,62 a
Ganho de peso (g)	94,63 ± 16,38 a	112,83 ± 20,81 a	93,97 ± 16,18 a	151,97 ± 32,51 a	165,33 ± 19,45 a	165,59 ± 10,40 a
Consumo ração (g)	272,00 ± 38,40 a	320,76 ± 38,29 a	292,88 ± 38,75 a	471,77 ± 65,76 a	519,48 ± 28,73 a	528,29 ± 30,09 a
Consumo proteína (g)	30,60 ± 4,32 a	39,74 ± 4,74 b	35,63 ± 4,76 ab	50,86 ± 7,09 a	53,30 ± 2,95 a	54,52 ± 3,11 a
Energia						
KJ/dia ⁵	0,16 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,02
Kcal /dia	38,42 ± 5,42	45,11 ± 5,38	40,44 ± 5,36	58,50 ± 8,16	62,32 ± 3,45	65,40 ± 3,73
CEA ⁶	0,35 ± 0,04 a	0,35 ± 0,03 a	0,32 ± 0,02 a	0,32 ± 0,07 a	0,32 ± 0,03 a	0,31 ± 0,01 a
PER ⁷	3,10 ± 0,32 b	2,82 ± 0,21 ab	2,61 ± 0,15 a	3,00 ± 0,64 a	3,10 ± 0,27 a	3,04 ± 0,10 a
NPR ⁸	2,99 ± 0,69 ab	3,91 ± 1,43 b	2,60 ± 0,66 a	7,88 ± 2,62 a	5,82 ± 0,92 a	6,50 ± 0,95 a
NPU (1ºPB) ⁹	91,54 ± 3,73	81,12 ± 2,74	81,68 ± 3,68	54,00 ± 4,31	53,50 ± 3,40	52,63 ± 6,89
NPU (2ºPB)	83,62 ± 6,36	76,23 ± 3,41	76,57 ± 2,81	40,61 ± 16,07	46,20 ± 3,07	41,16 ± 1,28
BV (1º PB) ¹⁰	95,84 ± 3,35	91,96 ± 3,41	94,39 ± 3,80	62,27 ± 3,42	77,10 ± 6,79	77,95 ± 9,13
BV (2º PB)	87,59 ± 5,82	88,71 ± 3,88	91,74 ± 1,98	46,49 ± 17,18	70,99 ± 2,74	56,75 ± 6,09
Digestibilidade aparente % (1º PB) ¹¹	95,65 ± 0,87 b	87,51 ± 2,42 a	87,10 ± 2,60 a	86,13 ± 2,44	69,49 ± 2,89	67,58 ± 4,69
Digestibilidade aparente % (2º PB)	95,58 ± 0,56 b	85,06 ± 1,17 a	84,16 ± 1,80 a	86,00 ± 2,82	65,07 ± 3,71	66,91 ± 3,84
Digestibilidade corrigida % ¹²	96,77 ± 0,79 b	88,30 ± 2,43 a	88,10 ± 2,70 a	90,14 ± 1,62	72,73 ± 2,90	70,71 ± 4,52

¹. Resultados expressos como média e desvio padrão, $n=8$. Para o grupo soja parental, $n=7$.

². Resultados expressos como média e desvio padrão, $n=8$. Para o grupo controle, $n=7$.

³. 1º ensaio, animais desmamados no 21º dia; no 2º, animais desmamados no 26º dia.

⁴. 1º ensaio o peso final correspondeu ao tempo de 28 dias de experimento, 2º ensaio tempo total correspondeu a 32 dias.

⁵. KJ. O valor da caloria/ dia foi multiplicado por 4,184 e dividido por 1000, para obtenção do valor de KJ/ dia.

⁶. CEA, coeficiente de eficácia alimentar [ganho de peso (g)/consumo de ração (g)]; corresponde a 28 dias para 1º ensaio e 32 para 2º.

⁷. PER, coeficiente de eficácia protéica [ganho de peso (g)/consumo de proteína (g)], corresponde a 28 dias para 1º ensaio e 32 para 2º.

⁸. NPR, coeficiente de eficiência líquida da proteína [(ganho de peso (g) + perda de peso do grupo aprotéico (g))/proteína consumida (g)]. O valor de NPR corresponde a 15 dias de ensaio para os 2 ensaios.

⁹. NPU, coeficiente de utilização líquida da proteína [(nitrogênio ingerido(g) – nitrogênio fecal(g) – nitrogênio urinário(g))/nitrogênio ingerido(g)]. O valor de NPU foi dividido em 2 períodos de balanço constituídos por 6 dias cada um. 1º período de balanço (1º ensaio) foi coletado no 10º dia de experimento e 2º período no 24º dia. 1º período de balanço (2º ensaio) foi coletado no 9º dia de experimento e 2º período no 28º dia.

¹⁰. BV = valor biológico da proteína [(nitrogênio ingerido(g) – nitrogênio fecal(g) – nitrogênio urinário(g))/(nitrogênio ingerido(g) – nitrogênio fecal(g))]. O BV foi dividido em 2 períodos de balanço constituídos por 6 dias cada um. 1º período de balanço (1º ensaio) foi coletado no 10º dia de experimento e 2º período no 24º dia. 1º período de balanço (2º ensaio) foi coletado no 9º dia de experimento e 2º período no 28º dia.

¹¹. No 1º ensaio o primeiro período de coleta correspondeu ao 10º dia de experimento e o segundo ao 24º dia. Para o 2º ensaio o primeiro período de coleta correspondeu ao 9º dia de experimento e o segundo período ao 28º dia, com duração de 6 dias de coleta fecal.

¹². Para a determinação da digestibilidade protéica corrigida pela excreção fecal metabólica, foi utilizado o valor da excreção fecal de proteína do grupo “aprotéico”, ou seja, que recebeu ração isenta de proteína.

Letras iguais em uma mesma linha não indicam diferença significativa.

7.3.1 Coeficiente de eficácia alimentar (CEA), Coeficiente de eficiência protéica (PER) e Coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR)

Nos dois ensaios, durante o primeiro período de balanço, foi incluído um grupo aprotéico, com o objetivo de avaliar as possíveis diferenças nos valores do coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR) e nos da digestibilidade corrigida pela excreção fecal metabólica.

O grupo aprotéico permite a observação da perda de nitrogênio produzido endogenamente (DARRAGH & HODGKINSON, 2000). Neste sentido, os valores entre as digestibilidades aparente e corrigida do 1º ensaio, dos dois períodos de balanço, não apresentaram diferenças estatísticas.

Segundo a metodologia, o coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR) leva em consideração a perda de peso do grupo aprotéico, por isso, foi avaliado somente no primeiro período de balanço. No 1º ensaio os valores de NPR obtidos entre os grupos controle e soja GM foram bem similares, embora o grupo soja parental não tenha acompanhado tal tendência. O ganho de peso médio apresentado por este grupo influenciou o valor de NPR encontrado entre os grupos.

Segundo FRIEDMAN (1996), valores de PER acima de 2,0 sugerem que a proteína seja de alta qualidade, isto é, fornecendo ao organismo a quantidade adequada de aminoácidos, para que a taxa de crescimento e armazenamento protéico aconteçam sem déficit. Neste sentido os valores de PER obtidos em ambos os ensaios para os grupos alimentados com soja indicam que esta proteína seja de boa qualidade nutricional.

Os valores de NPR dos grupos com soja obtidos durante os 2 ensaios, também indicam boa qualidade protéica. Estes valores são adequados quando comparados com outros reportados na literatura para a soja e outras leguminosas não suplementadas com aminoácidos essenciais. FRIEDMAN & BRANDON (2001) reportaram um valor para PER de 2,11, em ratos em crescimento alimentados com soja + cistina na concentração de 10% na ração. LEMOS SILVA (1995) encontrou, em ratos em crescimento alimentados com rações contendo feijão (10,4% de proteína), um valor para PER de 2,28, em um período de 28 dias. MONTEIRO *et al.* (2004) encontraram, em ratos em crescimento alimentados com rações contendo farinha de soja (com cerca de 10% de proteína), valores de PER e NPR de 1,49 e 2,52, respectivamente, em um período de 14 dias. Outros estudos verificaram, em ratos em crescimento, alimentados com rações contendo feijão (11% de proteína), por um período de 15 dias, valores para PER entre 1,7 e 2,36 e, para NPR, de 3,49 (MARZO *et al.*, 2002; CRUZ *et al.*, 2003). GIORA (2004) encontrou, em ratos em crescimento alimentados com rações contendo soja parental e soja GM (com cerca de 11% de proteína), valores de NPR de 3,48 e 3,23, respectivamente, por um período de 14 dias.

No 2º ensaio biológico a dieta suplementada com aminoácidos essenciais refletiu em valores de CEA, PER e NPR mais semelhantes entre os grupos em comparação ao 1º ensaio e estes valores são bem expressivos quando comparados aos da literatura.

7.3.2 Razão da utilização líquida da proteína (NPU), valor biológico da proteína (BV)

Os valores de NPU (1º e 2º períodos de balanço) encontrados em ambos os ensaios parece não diferir entre os grupos com soja. Para ambos os ensaios os valores de NPU para os grupos com soja são inferiores aos do grupo controle. Uma explicação para tal tendência é a maior perda de nitrogênio fecal.

O valor biológico da proteína é representado pela fração de aminoácidos absorvida pelo intestino e retida na carcaça do animal. O alto valor biológico da proteína indica que os aminoácidos são compatíveis com as necessidades do organismo (BRODY, 1994). Neste sentido, foram observados resultados condizentes com a literatura para caseína e para soja.

7.3.3 Ingestão, excreção protéica e digestibilidade

Na **Tabela 10** estão apresentados os resultados de ingestão protéica, excreção de proteína urinária, fecal e balanço nitrogenado durante os dois ensaios realizados.

Os valores na ingestão de proteína (1º ensaio) dos grupos alimentados com soja parecem não apresentar diferença entre si e aparentemente apresentam-se superiores aos do grupo controle. No 2º ensaio os valores de consumo dos grupos soja com relação a caseína, são bem mais homogêneos, principalmente no 2º período de balanço. O valor superior da ingestão referente ao 2º ensaio pode ser atribuído a suplementação das rações com soja com aminoácidos essenciais.

Os resultados de excreção de proteína nas fezes do 1º ensaio em ambos os períodos de balanço, dos grupos alimentados com soja, não apresentaram diferenças estatísticas entre eles e estes valores são estatisticamente diferentes do grupo controle, com ($p < 0,000001$) para 1º período e ($p = 0,000500$) para 2º período. Podemos afirmar que os animais que consumiram soja apresentam maior excreção protéica. Os valores de excreção do grupo controle em relação ao grupo soja parental e soja GM são de 23 mg/dia *versus* 143 e 123 mg/dia, respectivamente, no 1º período; e 21,7 mg/dia *versus* 256,7 e 275 mg/dia, respectivamente, no 2º período. A excreção urinária referente ao 1º ensaio parece acompanhar tal tendência.

Pesquisas sugerem que a ingestão de quantidades elevadas de fibras aumenta as perdas fecais de nitrogênio, mas diminuem as perdas urinárias, sem afetar a retenção de nitrogênio (RÉMESY & DEMÍGNÉ, 1994).

Tabela 10 – Ingestão, excreção fecal e urinária de proteína e balanço nitrogenado durante os dois ensaios

	1º ensaio		2º ensaio	
(g/6dias)	1º período balanço ¹	2º período balanço ²	1º período balanço ³	2º período balanço ⁴
Ingestão protéica				
Controle	5,75 ± 1,40	9,55 ± 1,71	8,78 ± 2,25	10,93 ± 0,99
Soja parental	7,89 ± 1,67	12,44 ± 2,35	10,30 ± 1,06	11,28 ± 0,94
Soja GM	6,45 ± 1,88	12,39 ± 2,18	10,56 ± 0,63	10,71 ± 0,45
Excreção protéica fecal				
Controle	0,24 ± 0,06 a	0,42 ± 0,10 a	1,14 ± 0,23	1,44 ± 0,34
Soja parental	0,99 ± 0,30 b	1,85 ± 0,35 b	3,14 ± 0,42	3,94 ± 0,59
Soja GM	0,84 ± 0,35 b	1,93 ± 0,24 b	3,40 ± 0,34	3,54 ± 0,36
Excreção protéica urinária				
Controle	0,22 ± 0,11	1,08 ± 0,50	3,01 ± 0,53	5,41 ± 1,92
Soja parental	0,51 ± 0,33	1,37 ± 0,53	1,62 ± 0,53	2,11 ± 0,17
Soja GM	0,31 ± 0,21	0,86 ± 0,24	1,57 ± 0,73	3,07 ± 0,18
Balanço nitrogenado				
Controle	0,85 ± 0,24 a	1,29 ± 0,23 a	0,73 ± 0,28 a	0,59 ± 0,34 a
Soja parental	1,12 ± 0,24 a	1,78 ± 0,40 ab	1,00 ± 0,15 ab	0,95 ± 0,12 b
Soja GM	0,99 ± 0,33 a	1,86 ± 0,50 b	1,01 ± 0,18 b	0,74 ± 0,13 at

1. 1º período de balanço correspondeu ao 10º dia de experimento;

2. 2º período de balanço correspondeu ao 24º dia de experimento;

3. 1º período de balanço correspondeu ao 9º dia de experimento;

4. 2º período de balanço correspondeu ao 28º dia de experimento.

Letras iguais em uma mesma linha não indicam diferença significativa.

A suplementação das rações com soja do 2º ensaio, não mudou o perfil de maior excreção fecal de proteína quando comparados com o grupo controle.

No 1º ensaio, os valores das digestibilidades aparente e corrigida dos grupos com soja não apresentaram diferenças estatísticas, mas, quando comparados com o grupo controle, estes valores são estatisticamente diferentes, com ($p = 0,0001$) e ($p = 0,0005$) para digestibilidade aparente 1º período e 2º período, respectivamente e ($p = 0,0006$) para digestibilidade corrigida. Neste caso, podemos afirmar que a digestibilidade da proteína vegetal é pior. O menor valor de digestibilidade encontrado nos grupos com soja pode ser atribuído ao tipo de fibra fornecida. Estudos *in vitro* sugerem que várias fontes de fibras podem interagir com as enzimas digestivas, reduzindo

sua atividade e, conseqüentemente, interferindo negativamente na digestão das mesmas (GAGNE *et al.*, 1983). No entanto, deve-se destacar a presença de inibidores de tripsina dos tipos *Bowman-Birck* e *Kunitz* que, mesmo desnaturados, mantêm suas características de baixa digestibilidade (MÁRQUEZ & LAJOLO, 1991).

A diferença nos valores de digestibilidade também pode ser atribuída a perda de nitrogênio endógeno. Esta perda pode ocorrer por dois fatores: 1º) existe a perda obrigatória de nitrogênio que ocorre independente da composição da dieta e 2º) a perda de nitrogênio decorrente da fonte protéica que é fornecida pela dieta. Um exemplo da perda de nitrogênio endógeno (g/100g proteína) para isolado protéico de soja é de 3,3 g de nitrogênio endógeno por 100 g proteína, enquanto o leite desnatado oferece uma perda de 1,3 g de nitrogênio endógeno por 100 g de proteína (DARRAGH & HODGKINSON, 2000).

Embora os valores das digestibilidades (1º ensaio) dos grupos alimentados com soja tenham sido estatisticamente diferentes em relação à caseína, estão acima dos valores descritos pela literatura. Este valor aumentado pode ser atribuído ao tratamento térmico utilizado para a autoclavagem da soja neste ensaio, sendo suficiente para eliminar os fatores antinutricionais. Este tratamento térmico também pode ter contribuído para tornar a proteína da soja mais acessível às enzimas digestivas (CHACKO & CUMMINGS, 1988). FRIEDMAN & BRANDON (2001), reportaram um valor para digestibilidade da soja torrada de 81,9%. OTTO *et al.* (2003) obtiveram, em porcos em crescimento alimentados com milho e soja com 12% de proteína, um valor na digestibilidade de 81,1%, por um período de 60 dias.

SARWAR & SEPEHR (2003) obtiveram um valor de digestibilidade protéica, para ratos em crescimento alimentados com 10% de proteína na forma de farinha de soja autoclavada (120°C, 20 min), de 81%, por um período de 5 semanas. GIORA (2004) obteve em ratos em crescimento alimentados com soja parental e soja GM, ambas submetidas à autoclavagem (120°C, 15 min), os valores de 81,74% e 81,85% para digestibilidade corrigida, por um período de 14 dias.

A digestibilidade é o primeiro fator que afeta a eficiência da proteína da dieta. Quando alguns peptídeos da dieta não são hidrolisados no processo digestivo, partes destas proteínas são excretadas nas fezes, ou transformados em produtos do metabolismo microbiano no intestino grosso (CRUZ *et al.*, 2003).

Os valores de digestibilidade encontrados no 2º ensaio foram bem inferiores aos reportados na literatura. Estes valores estão abaixo dos encontrados no 1º ensaio, visto que as rações foram suplementadas com aminoácidos essenciais (metionina, valina, lisina e leucina). Segundo FRIEDMAN & BRANDON (2001), a adição de metionina em produtos contendo soja para adultos, não possui nenhum efeito de melhoria do estado nutricional, quando a ingestão de proteínas é adequada. Por outro lado, quando a metionina é adicionada em fórmulas infantis para crianças desnutridas, há aumento na retenção de nitrogênio.

No presente estudo, o acréscimo de aminoácidos essenciais pode não ter refletido em melhores valores para digestibilidade devido os animais não apresentarem desnutrição.

Outro fator preponderante foi a diferença no desmame dos animais, no 1º ensaio (o desmame aconteceu no 21º dia), e no 2º ensaio no (26º dia). Esta diferença de praticamente uma semana pode ser sensível a este parâmetro, uma vez que os animais apresentaram o valor de peso de 46 g (1º ensaio) e 69 g (2º ensaio).

Segundo SARWAR (2003), a idade do animal afeta nos valores de digestibilidade, quanto mais velho é o animal, pior é o valor da digestibilidade.

No 1º ensaio, devido ao maior tempo de desmame, os animais recebiam maior quantidade de proteína e conseqüentemente maior foi a quantidade de proteína absorvida quando comparados com os animais do 2º ensaio.

Outra explicação para os valores de digestibilidade, foi a colocação de dois animais por gaiola, dificultando a sensibilidade na diferença inter-grupo.

7.4 Peso dos órgãos dos animais e efeito do consumo das rações contendo soja sobre o peso e umidade das fezes

A **Tabela 11** apresenta o peso relativo dos órgãos (g/100g de peso corporal) dos animais alimentados com rações controle, aprotéica, soja parental e soja GM.

Tabela 11 - Peso relativo dos órgãos de ratos alimentados com rações controle, soja parental e soja geneticamente modificada¹

	1º ensaio biológico ¹			2º ensaio biológico ¹		
	Fígado	Baço	Rins ²	Fígado	Baço	Rins ²
	<i>g/100g</i>					
Controle	3,63 ± 0,44 a	0,40 ± 0,06 a	1,29 ± 0,28 a	4,10 ± 0,90 a	0,34 ± 0,08 a	1,07 ± 0,25 a
Soja parental	3,31 ± 1,33 a	0,33 ± 0,06 a	0,95 ± 0,34 a	3,52 ± 0,71 a	0,30 ± 0,06 a	0,89 ± 0,11 a
Soja GM	3,63 ± 0,47 a	0,38 ± 0,07 a	1,04 ± 0,14 a	3,74 ± 1,02 a	0,31 ± 0,07 a	0,84 ± 0,09 a

¹ Resultados expressos, em base úmida, como média e desvio-padrão, $n = 8$. Para o grupo soja parental, referente ao 1º ensaio e o grupo controle referente ao 2º ensaio $n = 7$

² Valores médios do peso dos rins direito e esquerdo.

Letras iguais em uma mesma linha não indicam diferença significativa.

Não foi observada nenhuma alteração nos órgãos dos animais alimentados com soja geneticamente modificada. Os valores entre os grupos não apresentam diferença estatística.

Nas Tabelas 12 e 13 e nas Figuras 4 e 5 estão apresentados os valores de umidade e peso seco das fezes coletadas nos 2 períodos de balanço (10º e 24º dias de experimento no 1º ensaio, e 9º e 28º dia no 2º ensaio) constituídos de 6 dias cada um referentes ao 1º ensaio e 2º ensaio.

Tabela 12 - Peso seco e teor de umidade das fezes (1º ensaio), de 2 períodos experimentais¹, de ratos alimentados com rações controle, aprotéica², soja parental e soja geneticamente modificada³

	1º Período		2º Período	
	Peso seco	Teor de umidade	Peso seco	Teor de umidade
	g	%	g	%
Controle	3,22 ± 0,96 a	26,73 ± 12,03 a	5,93 ± 1,08 a	15,92 ± 2,38 a
Aprotéico	1,21 ± 0,20 b	12,10 ± 1,13 b	-	-
Soja Parental	2,98 ± 0,90 a	35,02 ± 3,73 a	5,58 ± 1,13 a	34,98 ± 3,50 b
Soja GM	2,49 ± 1,42 a	32,07 ± 6,14 a	5,51 ± 0,65 a	31,70 ± 4,26 b

¹ Cada período (10º e 24º dias de experimento) correspondeu a 6 dias de coleta.

² As determinações do grupo "aprotéico", ou seja, que recebeu ração isenta de proteínas, foram realizadas após 15 dias de experimento.

³ Resultados expressos, em base úmida, como média e desvio-padrão, $n = 8$. Para o grupo soja parental, $n = 7$. O tempo total de experimento correspondeu a 28 dias.

Letras iguais em uma mesma linha não indicam diferença significativa.

Figura 4 - Em A, e teor de umidade (%) das fezes dos dois períodos experimentais (10º e 24º dias de ensaio). Em B, peso seco (g) das fezes dos dois períodos experimentais (10º e 24º dias de ensaio). O tempo de experimento correspondeu a 28 dias. Valores expressos como média e desvio padrão, $n = 8$. Para o grupo soja parental, $n = 7$.

Tabela 13 - Peso seco e teor de umidade das fezes (2º ensaio), de 2 períodos experimentais¹, de ratos alimentados com rações controle, aprotéica², soja parental e soja geneticamente modificada³

	1º Período		2º Período	
	Peso seco	Teor de umidade	Peso seco	Teor de umidade
	g	%	g	%
Controle	10,71 ± 2,64 a	27,92 ± 3,27 a	13,39 ± 2,81 a	30,00 ± 3,01 a
Aprotéico	5,14 ± 0,46 b	17,33 ± 1,39 b	-	-
Soja Parental	9,63 ± 1,55 a	42,89 ± 9,27 c	11,75 ± 1,51 a	49,82 ± 9,35 b
Soja GM	11,18 ± 0,64 a	42,63 ± 4,33 c	11,85 ± 1,08 a	40,86 ± 2,88 b

¹ Cada período (9º e 28º dias de experimento) correspondeu a 6 dias de coleta.

² As determinações do grupo "aprotéico", ou seja, que recebeu ração isenta de proteínas, foram realizadas após 15 dias de experimento.

³ Resultados expressos, em base úmida, como média e desvio padrão, $n = 8$. Para o grupo controle, $n = 7$ (2º período). O tempo total de experimento correspondeu a 32 dias.

Letras iguais em uma mesma linha não indicam diferença significativa.

Figura 5 - Em A, teor de umidade (%) das fezes em dois períodos experimentais (9º e 28º dias de ensaio). Em B, peso seco (g) das fezes dos dois períodos experimentais (9º e 28º dias de ensaio). O tempo de experimento correspondeu a 32 dias. Valores expressos como média e desvio padrão, $n=8$. Para o grupo controle, $n=7$.

A fibra da soja, casca de soja e celulose utilizadas nos ensaios, contém em sua composição uma proporção de fibra insolúvel, muito maior que a fibra solúvel (FILISETTI & LOBO, 2005).

São classificadas como fibra insolúvel as ligninas, celulose e a maior parte da hemicelulose. Do ponto de vista fisiológico as frações solúveis e insolúveis agem de forma distinta no trato digestório. O conteúdo de fibra também está relacionado com o grau de desintegração do alimento durante o processo industrial, preparo doméstico ou mesmo pela mastigação dificultando ainda mais sua real avaliação. É importante assinalar que nem todas as frações da fibra alimentar (FA) tem efeito similar sobre o hábito intestinal, e inclusive o tamanho das partículas de FA pode influenciar no tempo de trânsito e no peso das fezes. A capacidade de retenção de água pelas fezes está inversamente relacionada com a capacidade de fermentação da FA no cólon. Em consequência da menor digestibilidade e fermentabilidade da FA haverá maior retenção de água e aumento no volume e peso das fezes (FILISETTI & LOBO, 2005).

Foi verificado, no presente estudo, no segundo período (1º ensaio, 2º período), que as fezes dos ratos alimentados com soja apresentaram valores de umidade estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle. No 2º ensaio, o valor de umidade elevado dos grupos alimentados com soja em relação ao controle, permanece nos dois períodos de balanço. O processamento da soja e a menor fermentação no colón das fibras da soja foram responsáveis pelo aumento no teor de umidade das fezes visualizados nos dois ensaios. Apesar de no 2º ensaio, a fonte de fibra para os grupos controle e aprotéico serem advindos da mesma fonte (casca de soja), o

organismo dos animais responde similarmente ao 1º ensaio, ou seja, os grupos com soja continuam com aumento no teor de umidade.

Este aumento no valor de umidade encontrado pode estar associado a maior atividade fermentativa da microbiota intestinal, em virtude de maior quantidade de substrato alcançando o intestino grosso dos animais (LOBO, 2004).

O teor de umidade elevado dos grupos com soja está associado com a digestão do grão no trato gastrintestinal. A digestão de polissacarídeos de origem não-celulósica parece ser mais eficiente que a digestão da celulose. Estudos têm evidenciado que, em média, 80% de polissacarídeos de origem não-celulósica, de diferentes fontes alimentares, são degradados no trato gastrintestinal, enquanto compostos de origem celulósica da mesma fonte, são degradados mais lentamente. Os polissacarídeos da soja contêm entre 75 e 80% de fibra insolúvel, que são de baixa viscosidade e são resistentes ou parcialmente fermentados (menos que 40% desta fibra, no cólon, é excretada intacta nas fezes). Estudos *in vitro* demonstraram que os polissacarídeos da soja são relativamente fermentados, sendo que, *in vivo*, a fermentação destes carboidratos ocorre uma maior intensidade, devido ao aumento da estimulação da microbiota colônica (FREITAS *et al.*, 2004).

O aumento na umidade também pode estar relacionado ao efeito físico da retenção de água que é adicionado ao bolo fecal. Além disso, a fermentação de carboidratos proporciona um incremento na biomassa que, por sua vez, aumenta o volume fecal (LOBO, 2004).

7.5 Influência do fitato nos parâmetros nutricionais estudados

Na **Tabela 14** estão apresentados os dados de fitatos nas rações contendo soja e casca de soja.

OLIVEIRA e colaboradores (2003) observaram, em estudo com ratos em crescimento recebendo dietas acrescidas de ácido fítico (218, 436, 872 e 1744 mg de ácido fítico/kg de dieta) por 10 dias, que não houve influência sobre crescimento dos animais, CEA, NPR e digestibilidade aparente e corrigida.

No presente trabalho, as amostras de farinha e casca de soja foram autoclavadas (120°C, 5min) para melhorar seu aproveitamento e para eliminar fatores antinutricionais. Foi observado nos dois ensaios realizados que o teor de ácido fítico encontrado nas rações não influenciou o crescimento dos animais, bem como os valores de CEA, consumo de proteína, PER, NPR e digestibilidades (1º ensaio).

Tabela 14 - Teor de fitatos na casca e nas rações contendo soja

Alimento	Quantidade de fitato (mg/g peso seco)
Casca de soja	0,23
Ração com soja parental ¹	26,20
Ração com soja GM ¹	40,65

¹ Rações referentes ao 1º ensaio realizado

7.6 Perda de nitrogênio, nitrogênio retido, balanço nitrogenado, NPU e composição corporal da carcaça de ratos submetidos as dietas experimentais durante os 2 ensaios

Nas **Tabelas 15 e 16** estão apresentados os valores da utilização de nitrogênio durante os 2 ensaios realizados. No 1º ensaio foi observado que a ingestão de nitrogênio dos grupos controle e alimentados com soja no 2º

período de balanço é superior a ingestão do 1º período, que é acompanhada também por uma excreção maior. Também foi observado que todos os grupos apresentaram balanço nitrogenado positivo, ou seja, a oferta de nitrogênio ingerido é superior a soma de nitrogênio excretado pelas fezes e urina, encontrado em situações de crescimento, onde a ingestão deve ser maior devido a necessidade do organismo na formação de novos tecidos.

Os valores de nitrogênio retido na carcaça g N/peso seco de animal (1º ensaio) estão bem homogêneos, principalmente entre o grupo controle e soja GM. No 2º ensaio os valores entre os grupos estão iguais.

Foram encontrados valores semelhantes de NPU na carcaça dos animais 1º e 2º ensaio, entre os grupos com soja e valores inferiores quando comparados ao grupo controle. Os valores obtidos para os grupos com soja em ambos os ensaios, estão bem favoráveis quando comparados a outros experimentos, utilizando mesma metodologia. Segundo FRIEDMAN & BRANDON (2001) o valor de NPU encontrado para soja torrada foi de 62,4%. GIORA (2004) encontrou o valor de NPU de 73,89% para grupo soja GM e 75,15% para grupo soja parental, experimento que utilizou ratos em crescimento mantidos com ração a base de 10% de soja por 15 dias.

Na **Tabela 17** estão apresentados os valores da composição centesimal da carcaça dos animais alimentados com ração a base de caseína e rações contendo soja. Foi observado que a relação de ingestão de proteínas e lipídeos é inversamente proporcional, quando a quantidade de lipídeo retida é maior, conseqüentemente a quantidade de proteína retida é menor, sendo o inverso também verdadeiro.

A quantidade de proteína encontrada na carcaça do grupo soja GM (1º ensaio) em relação aos demais grupos parece indicar uma retenção menor. No 2º ensaio a mesma observação pode ser feita com relação ao grupo soja parental.

DU *et al.* (2000) e ZHU *et al.* (2004), comprovam maior eficiência protéica quando a oferta deste nutriente na dieta é oferecida a 10%. Em nosso experimento, também foi observado que a oferta de 10% de proteína na ração, oferece melhor aproveitamento, uma vez que os valores de nitrogênio retido, são melhores quando comparados com dieta oferecida com 12% de proteína.

Tabela 15 - Utilização de nitrogênio em ratos submetidos as dietas experimentais (1º ensaio)¹

Nitrogênio	(1º período de balanço) ²			(2º período de balanço) ³		
	Grupo controle	Grupo soja parental	Grupo soja GM	Grupo controle	Grupo soja parental	Grupo soja GM
Ingerido (g)	0,92 ± 0,24 a	1,43 ± 0,33 b	1,17 ± 0,36 ab	1,53 ± 0,29 a	2,25 ± 0,46 b	2,25 ± 0,42 b
Fecal (g) ⁴	0,04 ± 0,01 a	0,17 ± 0,06 b	0,15 ± 0,07 b	0,07 ± 0,02 a	0,32 ± 0,07 b	0,36 ± 0,05 b
Absorvido (g) ⁵	0,88 ± 0,23 a	1,26 ± 0,28 a	1,02 ± 0,31 a	1,41 ± 0,02 a	1,93 ± 0,40 ab	1,89 ± 0,38 b
Urinário (g/ mL)	0,03 ± 0,02 a	0,10 ± 0,06 b	0,06 ± 0,04 ab	0,17 ± 0,08 a	0,22 ± 0,08 a	0,15 ± 0,04 a
Retido ⁶ (g/peso seco)	5,09 ± 0,97	6,23 ± 0,85	4,88 ± 0,71	5,09 ± 0,97	6,23 ± 0,85	4,88 ± 0,71
NPU ⁷ %	98,04 ± 4,56	86,66 ± 9,00	75,97 ± 8,62	98,04 ± 4,56	86,66 ± 9,00	75,97 ± 8,62

¹ Resultados expressos como média e desvio padrão, $n=8$. Para o grupo soja parental $n=7$. As análises de nitrogênio foram realizadas em duplicata;

² O 1º período de balanço correspondeu a 6 dias de coleta e teve início no 10º dia de ensaio;

³ O 2º período de balanço correspondeu a 6 dias de coleta e teve início no 24º dia de ensaio;

⁴ O nitrogênio foi determinado em base seca;

⁵ Nitrogênio absorvido foi calculado com a diferença entre o nitrogênio ingerido e o nitrogênio excretado pelas fezes.

⁶ Nitrogênio retido foi determinado na carcaça no animal seco e desengordurado. O valor de nitrogênio retido não é dividido em períodos, foi determinado no final do período experimental (28 dias).

⁷ A fórmula para o cálculo foi $NPU = \text{nitrogênio retido (g)} / \text{nitrogênio total ingerido (g)} \times 100$.

Letras iguais em uma mesma linha não indicam diferença significativa.

Tabela 16 - Utilização de nitrogênio em ratos submetidos a dietas experimentais (2º ensaio)¹

Nitrogênio	(1º período de balanço) ²			(2º período de balanço) ³		
	Grupo controle	Grupo soja parental	Grupo soja GM	Grupo controle	Grupo soja parental	Grupo soja GM
Ingerido (g)	1,40 ± 0,36 a	1,87 ± 0,19 b	1,91 ± 0,12 b	1,75 ± 0,16 a	2,04 ± 0,17 b	1,94 ± 0,08 b
Fecal (g) ⁴	0,19 ± 0,03 a	0,57 ± 0,08 b	0,62 ± 0,06 b	0,24 ± 0,04 a	0,71 ± 0,10 b	0,64 ± 0,06 b
Absorvido (g) ⁵	1,22 ± 0,33 a	1,30 ± 0,14 a	1,30 ± 0,16 a	1,51 ± 0,17 b	1,33 ± 0,13 ab	1,30 ± 0,11 a
Urinário (g/ mL)	0,48 ± 0,09 a	0,29 ± 0,09 b	0,28 ± 0,12 b	0,91 ± 0,27 a	0,38 ± 0,03 b	0,56 ± 0,03 a
Retido ⁶ (g/peso seco)	8,26 ± 0,47	8,19 ± 1,01	8,09 ± 0,48	8,26 ± 0,47	8,19 ± 1,01	8,09 ± 0,48
NPU ⁷ %	99,93 ± 10,57	84,70 ± 7,38	82,02 ± 4,31	99,93 ± 10,57	84,70 ± 7,38	82,02 ± 4,31

¹. Resultados expressos como média e desvio padrão, n=8 para grupo controle n= 7. As análises de nitrogênio foram realizadas em duplicata;

². O 1º período de balanço correspondeu a 6 dias de coleta e teve início no 9º dia de ensaio;

³. O 2º período de balanço correspondeu a 6 dias de coleta e teve início no 28º dia de ensaio;

⁴. O nitrogênio foi determinado em base seca;

⁵. Nitrogênio absorvido foi calculado com a diferença entre o nitrogênio ingerido e o nitrogênio excretado pelas fezes.

⁶. Nitrogênio retido foi determinado na carcaça no animal seco e desengordurado. O valor de nitrogênio retido não é dividido em períodos, foi determinado no final do período experimental (32 dias).

⁷. A fórmula para o cálculo foi NPU = nitrogênio retido (g)/ nitrogênio total ingerido(g) x 100.

Letras iguais em uma mesma linha não indicam diferença significativa.

Tabela 17 – Composição corporal da carcaça dos animais¹

Nutrientes (g/100 g) ²	1º ensaio ³			2º ensaio ⁴		
	Grupo controle	Grupo soja parental	Grupo soja GM	Grupo controle	Grupo soja parental	Grupo soja GM
Proteína ⁵	17,43 ± 2,29	13,89 ± 1,17	9,17 ± 3,07	12,73 ± 1,54	9,07 ± 2,24	11,09 ± 1,36
Lípido ⁶	14,84 ± 2,01	18,88 ± 2,15	24,30 ± 2,70	18,49 ± 4,87	23,97 ± 3,66	20,04 ± 2,76
Cinza	3,24 ± 0,28	2,89 ± 0,25	2,09 ± 0,74	2,33 ± 0,23	1,84 ± 0,50	2,21 ± 0,33
Umidade	60,88 ± 1,10	60,46 ± 1,12	60,96 ± 2,67	62,87 ± 1,61	62,36 ± 0,87	62,84 ± 1,67

¹. As análises foram realizadas no 1º ensaio, n=8 para soja parental n=7, no 2º ensaio, n=7 para grupo controle;

². Valores expressos em gramas por 100g;

³. Duração do experimento de 28 dias;

⁴. Duração do experimento de 32 dias;

⁵. Análises realizadas em triplicata;

⁶. Lipídeos dos animais 1º ensaio foi determinado por diferença.

Letras iguais em uma mesma linha não indicam diferença significativa.

7.7 Digestibilidade protéica corrigida pelo escore de aminoácidos (PDCAA)

A **Tabela 18** apresenta a distribuição dos vinte aminoácidos (essenciais e não essenciais) das dietas controle, soja parental e soja GM determinados pelo aminograma das rações. A **Tabela 19** apresenta a quantidade de cada aminoácido encontrada sendo comparada às necessidades de crianças de 2 a 5 anos (FAO/WHO, 1991) e as necessidades para roedores, *National Research Council Nutrient Requirements of laboratory animals* (1995). Esta comparação permite a identificação do(s) aminoácido(s) limitante(s). Com relação as dietas contento soja, não foi identificado diferença significativa entre os valores, mas quando estes valores são comparados ao grupo controle, os resultados mostram os aminoácidos que se encontram em menor concentração nas dietas com sojas: leucina, metionina, valina e lisina.

A **Tabela 20** apresenta o cálculo do método PDCAA e a **Figura 6** apresenta a distribuição dos aminoácidos essenciais das dietas experimentais. O método do PDCAA considera como aminoácido limitante, o menor valor de escore químico encontrado, ou seja, $[\text{mg de aa/g proteína teste} \div \text{mg de aa/g proteína padrão (FAO)}]$. O valor de 1,0 para o escore químico representa que o valor encontrado para um determinado aminoácido essencial apresenta-se satisfatório. Mas, como o método considera sempre o menor valor para escore (aminoácido limitante), não permitindo ao leitor identificar os outros aminoácidos deficientes. Neste caso é interessante apresentar os resultados de forma variada, mostrando a comparação com a FAO e NCR, assim como mostrar o aminograma realizado nas rações.

Outras limitações do método incluem a falta de padronização e reprodutibilidade na análise de aminoácidos sulfurados e triptofano (FAO/WHO, 1991), a não detecção das formas D e L, e a avaliação da digestibilidade total da proteína que não considera a disponibilidade individual de cada aminoácido (WU *et al.*, 1996; SARWAR, 1997).

No 1º experimento realizado foi verificado que os animais alimentados com as rações contendo soja não refletiram em valores de digestibilidade indesejáveis, reportados por bons valores de PDCAA, comparando com outros valores demonstrados em literatura aplicando mesma metodologia.

SCHAAFSMA (2000) encontrou o valor de PDCAA para soja de 91%, e 118% para o ovo. Já SARWAR & SEPEHR (2003) encontrou o valor de PDCAA para soja autoclavada de 83% e para caseína de 100%. GIORA (2004) encontrou o valor de PDCAA de 44,5% para soja GM e sua parental, a caseína apresentou o valor de 101,7%.

No presente trabalho o valor de PDCAA para a caseína apresentou-se inferior ao esperado e esta tendência foi mantida também com o escore químico.

Tabela 19 - Composição de aminoácidos (mg/g proteína) das dietas experimentais 1º ensaio, comparada às necessidades de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos (FAO/WHO, 1991)

Aminoácido¹	Dieta controle	Dieta c/ soja parental	Dieta com soja GM	FAO²	NCR³
Ácido aspártico	66,3 ± 0,45	111,8 ± 0,40	110,2 ± 0,80	---	---
Treonina	38,2 ± 0	37,9 ± 0	37 ± 0	34	41,3
Serina	54,2 ± 0,90	52,1 ± 0,40	50,6 ± 0,40	---	---
Ácido glutâmico	216,5 ± 1,35	182,0 ± 0,40	178,9 ± 1,25	---	---
Prolina	97,8 ± 0	46,8 ± 0	46,1 ± 0,85	---	---
Glicina	17,8 ± 0	42,8 ± 0	41,5 ± 0,40	---	---
Alanina	29,3 ± 0	44,0 ± 0,40	42,8 ± 0	---	---
Valina	58,7 ± 0	46,0 ± 0	46,5 ± 0,40	35	49,3
Metionina	28,5 ± 0,85	16,1 ± 0	17,3 ± 0	---	---
Cistina	23,1 ± 0	32,3 ± 0	33,7 ± 0	---	---
Isoleucina	43,2 ± 0,45	39,6 ± 0,85	40,3 ± 0	28	41,3
Leucina	86,7 ± 0,45	73,9 ± 0,45	72,4 ± 0,85	66	71,3
Tirosina	32,9 ± 0,9	29,5 ± 0,40	29,6 ± 0,80	---	---
Fenilalanina	47,6 ± 1,35	47,6 ± 0,80	47,3 ± 1,20	---	---
Histidina	20,4 ± 0	18,6 ± 0	18,5 ± 0,40	19	18,7
Lisina	70,6 ± 0,45	59,3 ± 0,40	58,0 ± 0,40	58	61,3
Triptofano	10,7 ± 0	12,5 ± 0,40	13,6 ± 0,40	11	13,3
Arginina	33,4 ± 0,45	67,4 ± 0,40	67,4 ± 0	---	---
(Met + Cis)	51,6 ± 0,85	48,4 ± 0	51,0 ± 0	25	65,3
(Fen + Tir)	80,5 ± 0,45	77,1 ± 1,20	76,9 ± 2,00	63	68

1. Valores médios ± desvio padrão (n=2)

2. Valores de aminoácidos essenciais segundo *Food and Agriculture Organization & World Health Organization* (1991), para crianças de 2 a 5 anos

3. Valores de aminoácidos essenciais segundo NRC (1995). *National Research Council. Nutrient Requirements of laboratory Animals*, 3rd Ed. NRC < *National Academy of Sciences, Washington, DC*. In: Sarwar, 1997.

7.8 IGF-1, albumina e proteínas plasmáticas

Na **Tabela 21** estão apresentados os valores de IGF-1, proteína, e albumina durante os 2 ensaios realizados.

Os valores de albumina e proteínas totais entre os grupos 1º ensaio não apresentaram diferenças estatísticas, sugerindo que a proteína de soja não altera o estado nutricional dos animais. No 2º ensaio o perfil entre os grupos alimentados com soja parece ser mantido, já que os valores apresentaram-se bem homogêneos. Os valores de IGF-1 para ambos os ensaios entre os grupos com soja também acompanham tal tendência, e parecem não diferir do grupo controle, sendo mais um indicativo que o estado nutricional dos animais parece não apresentar indícios de menor aproveitamento protéico e menor síntese metabólica.

Os valores de proteínas totais encontrados estão condizentes aos valores reportados por outros autores. LEMOS SILVA (1995) encontrou, em ratos em crescimento alimentados com rações contendo (7,5% de caseína), um valor de proteínas totais plasmáticas de 4,7 g/dL, por um período de 28 dias. Já VITURI (2001) encontrou em camundongos adultos, alimentados com rações contendo (20% de caseína), um valor de proteínas totais no soro de 3,2 g/dL, por um período de 4 semanas.

Os valores de IGF-1 encontrado por RIBEIRO (1995), em ratos sedentários em crescimento alimentados com rações contendo (14,1% de caseína), foram de 424,91 ng/mL, por um período de 6 semanas.

Tabela 21 - Parâmetros plasmáticos de ratos submetidos à dietas experimentais: controle, soja parental e soja geneticamente modificada durante os dois ensaios¹

Grupos	IGF-1 (ng/mL) ²	1º ensaio		2º ensaio		
		Albumina (g/dL) ³	Proteínas totais (g/dL) ⁴	IGF-1 (ng/mL) ⁵	Albumina (g/dL) ⁶	Proteínas totais (g/dL) ⁷
Controle	745,26 ± 175,85	2,37 ± 0,43 a	4,18 ± 0,57 a	1075,37 ± 145,16	1,92 ± 0,37	3,21 ± 0,70
SP	995,40 ± 118,45	2,73 ± 0,18 a	4,28 ± 0,34 a	924,83 ± 159,26	2,19 ± 0,62	3,17 ± 0,62
SGM	839,71 ± 170,75	2,47 ± 0,56 a	4,58 ± 0,92 a	997,50 ± 251,70	2,19 ± 0,48	3,23 ± 0,42

¹ Resultados expressos, como média e desvio padrão, as amostras foram realizadas em duplicata para cada animal;

² n=7 para todos os grupos

³ n=8 para grupo controle e soja GM, n=7 para soja parental;

⁴ n=7 para grupos com soja, n=8 para controle;

⁵ n=6 para grupo controle e soja parental e n=7 grupo soja GM;

⁶ n=7 para grupos com soja, n=6 para grupo controle;

⁷ n=6 para os grupos controle, soja parental e GM;

Letras iguais em uma mesma linha não indicam diferença significativa.

7.9 Análises hematológicas

As análises hematológicas dos animais durante os dois ensaios, estão apresentadas nas **Tabelas 22 a 27**.

O hemograma, e esplenograma dos animais do 1º ensaio e 2º ensaio, que consumiram soja, quando comparados entre si e ao grupo controle, não apresentaram diferenças estatísticas.

Com relação ao mielograma foi observado diferença estatística com relação ao megacariócito basófilo (1º ensaio), megacarioblasto e relação das séries granulocítica/eritrocitária (2º ensaio) do grupo controle, quando comparado aos grupos com soja. O grupo controle nos dois casos apresentou valores inferiores aos grupos com soja.

Outros autores como ZHU *et al.* (2004) reportam valores normais de hemograma em ratos alimentados com 12% de proteína de soja modificada na ração, conforme observado no presente estudo.

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 (STROMBERG, 1992). Portanto, a maior parte da população de eritrócitos já havia sido produzida, não tendo a dieta tanta influência sobre os resultados. Os dados de hemoglobina e hematócrito encontrados evidenciam que o tratamento com soja modificada e sua parental não induziu processo hemolítico ou hemorrágico, que causaria anemia.

A quantificação dos reticulócitos na corrente sanguínea é um indicador da atividade eritropoética. No presente estudo, foi observado que não houve diferença estatística neste parâmetro quando comparamos os animais alimentados com soja em relação ao grupo controle. Podemos afirmar que a dieta não modificou a eritropoese.

GIORA (2004) obteve valores reduzidos de monócitos mm^3 ($108,4 \pm 55,3$ controle, $57,56 \pm 57,84$ soja parental e $55,21 \pm 55,75$ para soja GM) e leucócitos mm^3 (3819 ± 1186 controle, 3836 ± 1546 para soja GM) em experimento com ratos alimentados com soja modificada por um período de 14 dias. Esta situação não é mantida em nossos experimentos, podendo ser observado que as dietas com soja não alteraram o estado fisiológico e patológico da célula. Porém, observa-se um grande desvio padrão dos grupos, o que poderia ser melhorado se o número de animais fosse maior.

Tabela 22 - Hemograma dos animais submetidos a dietas experimentais (1º ensaio)¹

Hemograma	Grupos		
	Controle	Soja parental	Soja GM
Hemáceas (x 10 ⁶ /mL)	4,93 ± 1,21	5,06 ± 0,76	4,97 ± 0,91
Hemoglobina (g/dL)	12,10 ± 2,07	11,57 ± 1,28	11,21 ± 1,37
Hematócrito (%)	35,63 ± 6,09	37,00 ± 2,94	36,13 ± 5,71
Reticulócitos (%)	2,42 ± 0,78	2,88 ± 1,16	2,85 ± 1,15
Leucócitos Totais (mm ³)	4900 ± 1959	4629 ± 1124	4006 ± 1357
Neutrófilos (mm ³)	811,80 ± 384,20	580,10 ± 262,80	455,10 ± 150,60
Linfócitos (mm ³)	3883 ± 1526	4000 ± 873,60	3405 ± 1280
Monócitos (mm ³)	191,40 ± 100,30	113,40 ± 83,75	113,60 ± 55,98
Eosinófilos (mm ³)	13,56 ± 18,95	0	0
Basófilos (mm ³)	0	0	0

¹ Resultados expressos como média e desvio padrão da variação do número total de células. n=8 para grupo controle e soja GM e n=7 para grupo soja parental. Os resultados foram submetidos à análise estatística Kruskal-Wallis com pós teste de comparação múltipla DUNN.

Tabela 23 - Hemograma dos animais submetidos a dietas experimentais (2º ensaio)¹

Hemograma	Grupos		
	Controle	Soja parental	Soja GM
Hemáceas (x 10 ⁶ /mL)	5,05 ± 1,04	5,38 ± 0,85	5,35 ± 0,78
Hemoglobina (g/dL)	10,73 ± 1,54	10,69 ± 1,30	11,49 ± 0,70
Hematócrito (%)	28,33 ± 5,32	31,57 ± 4,99	33,29 ± 2,43
Reticulócitos (%)	3,00 ± 0,18	3,63 ± 0,32	3,82 ± 1,5
Leucócitos Totais (mm ³)	4755 ± 1112	4786 ± 1314	4371 ± 745
Neutrófilos (mm ³)	592 ± 444	549 ± 233	537 ± 221
Linfócitos (mm ³)	3910 ± 1050	4027 ± 1135	3794 ± 863
Monócitos (mm ³)	179 ± 123	146 ± 111	158 ± 98
Eosinófilos (mm ³)	35 ± 27	7 ± 18	19 ± 34
Basófilos (mm ³)	0	0	0

¹ Resultados expressos como média e desvio padrão da variação do número total de células. n=6 para grupo controle e n=7 para grupo soja parental e soja GM. Os resultados foram submetidos à análise estatística Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla DUNN.

Tabela 24 - Mielograma dos animais submetidos a dietas experimentais (1º ensaio)¹

Análise morfológica	Grupos		
	Controle	Soja parental	Soja GM
Células totais ($\times 10^7/\text{mL}$)	2,36 $\pm$ 0,79 a	3,45 $\pm$ 1,94 a	2,41 $\pm$ 1,04 a
Blastos ($\times 10^6/\text{mL}$)	0,52 $\pm$ 0,35 a	0,74 $\pm$ 0,50 a	0,66 $\pm$ 0,51 a
Promielócito e mielócito ($\times 10^6/\text{mL}$)	3,28 $\pm$ 1,98 a	4,59 $\pm$ 2,37 a	4,20 $\pm$ 3,02 a
Metamielócito e bastonete ($\times 10^6/\text{mL}$)	4,48 $\pm$ 4,92 a	5,42 $\pm$ 4,53 a	3,94 $\pm$ 2,40 a
Neutrófilos segmentados ($\times 10^6/\text{mL}$)	4,86 $\pm$ 3,63 a	2,97 $\pm$ 2,33 a	3,65 $\pm$ 2,27a
Eosinófilos ($\times 10^6/\text{mL}$)	3,01 $\pm$ 3,41 a	1,50 $\pm$ 0,87 a	1,11 $\pm$ 0,74 a
Eritroblastos basófilo ($\times 10^6/\text{mL}$)	2,72 $\pm$ 1,34 a	4,29 $\pm$ 2,93 a	1,99 $\pm$ 1,51 a
Eritroblastos policromático e ortocromático ($\times 10^6/\text{mL}$)	7,37 $\pm$ 4,95 a	11,58 $\pm$ 8,72 a	8,25 $\pm$ 3,61 a
Linfócitos ($\times 10^6/\text{mL}$)	3,95 $\pm$ 2,14 a	2,78 $\pm$ 1,73 a	1,92 $\pm$ 0,71 a
Plasmócitos ($\times 10^6/\text{mL}$)	0,07 $\pm$ 0,10 a	0,02 $\pm$ 0,06 a	0,03 $\pm$ 0,07 a
Macrófagos/Monócitos	0,33 $\pm$ 0,20 a	0,08 $\pm$ 0,14 a	0,50 $\pm$ 0,41 a
Mastócito ²	30,57 $\pm$ 26,63 a	19,14 $\pm$ 10,93 a	12,25 $\pm$ 5,44 a
Megacarioblasto ²	0,28 $\pm$ 0,49 a	1,43 $\pm$ 0,79 a	0,50 $\pm$ 0,58 a
Megac. Basófilo ²	2,86 $\pm$ 1,21 b	12,00 $\pm$ 3,00 a	8,00 $\pm$ 4,69 a
Megac. Acidófilo ²	7,43 $\pm$ 6,16 a	15,86 $\pm$ 5,08 a	10,75 $\pm$ 6,40 a
Relação G/E	1,67 $\pm$ 0,83 a	0,92 $\pm$ 0,33 a	1,37 $\pm$ 0,83 a

¹. Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão da variação do número total de células nucleadas e dos diferentes tipos celulares presentes na medula. N=8 para grupo controle, n=6 para grupo soja GM e n=4 para grupo soja parental. Os resultados foram submetidos à análise estatística Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla DUNN. Letras iguais em uma mesma linha não indicam diferença significativa.

². Valores encontrados em 10 campos microscópios, analisados com ocular 10x com (tamanho real $\times$ 0,25) e objetiva de 40x (tamanho real $\times$ 0,65).

Tabela 25 - Mielograma dos animais submetidos a dietas experimentais (2º ensaio)¹.

Análise morfológica	Grupos		
	Controle	Soja parental	Soja GM
Células totais ($\times 10^7/\text{mL}$)	$2,24 \pm 1,16$ a	$2,18 \pm 0,58$ a	$2,10 \pm 0,63$ a
Blastos ($\times 10^6/\text{mL}$)	$0,25 \pm 0,25$ a	$0,19 \pm 0,09$ a	$0,29 \pm 0,34$ a
Promielócito e mielócito ($\times 10^6/\text{mL}$)	$0,90 \pm 0,70$ a	$1,61 \pm 0,7$ a	$1,20 \pm 0,5$ a
Metamielócito e bastonete ($\times 10^6/\text{mL}$)	$2,33 \pm 1,70$ a	$2,35 \pm 1,30$ a	$1,93 \pm 0,76$ a
Neutrófilos segmentados ($\times 10^6/\text{mL}$)	$1,95 \pm 1,30$ a	$3,12 \pm 1,50$ a	$2,96 \pm 1,00$ a
Eosinófilos ($\times 10^6/\text{mL}$)	$0,52 \pm 0,24$ a	$0,59 \pm 0,29$ a	$0,50 \pm 0,18$ a
Eritroblastos basófilo ($\times 10^6/\text{mL}$)	$2,13 \pm 2,50$ a	$1,30 \pm 0,54$ a	$0,78 \pm 0,43$ a
Eritroblastos policromático e ortocromático ($\times 10^6/\text{mL}$)	$8,99 \pm 5,01$ a	$6,57 \pm 2,14$ a	$6,59 \pm 2,30$ a
Linfócitos ($\times 10^6/\text{mL}$)	$6,00 \pm 3,65$ a	$6,00 \pm 2,13$ a	$7,45 \pm 3,73$ a
Plasmócitos ($\times 10^6/\text{mL}$)	$0,07 \pm 0,13$ a	$0,04 \pm 0,052$ a	$0,02 \pm 0,035$ a
Macrófagos/Monócitos	$0,13 \pm 0,15$ a	$0,12 \pm 0,045$ a	$0,17 \pm 0,27$ a
Mastócito ²	$16,50 \pm 16,15$ a	$18,13 \pm 23,50$ a	$16,43 \pm 16,03$ a
Megacarioblasto ²	$0,67 \pm 0,51$ b	$3,00 \pm 1,69$ a	$1,87 \pm 1,12$ a
Megac. Basófilo ²	$3,00 \pm 2,50$ a	$4,12 \pm 1,24$ a	$7,37 \pm 4,81$ a
Megac. Acidófilo ²	$2,33 \pm 1,75$ a	$3,87 \pm 3,04$ a	$5,50 \pm 2,45$ a
Relação G/E	$0,60 \pm 0,14$ b	$0,97 \pm 0,26$ a	$0,93 \pm 0,20$ a

¹. Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão da variação do número total de células nucleadas e dos diferentes tipos celulares presentes na medula. N=6 para grupo controle, n=8 para grupo soja GM e para grupo soja parental. Os resultados foram submetidos à análise estatística Kruskal-Wallis com pós teste de comparação múltipla DUNN. Letras iguais em uma mesma linha não indicam diferença significativa.

². Valores encontrados em 10 campos microscópios, analisados com ocular 10x com (tamanho real x 0,25) e objetiva de 40x (tamanho real x 0,65).

Tabela 26 - Esplenograma dos animais submetidos a dietas experimentais (1º ensaio)¹

Análise morfológica	Grupos		
	Controle	Soja parental	Soja GM
Células totais ($\times 10^7/\text{mL}$)	19,00 $\pm$ 4,60	19,93 $\pm$ 2,72	22,54 $\pm$ 4,62
Blastos ($\times 10^6$)	6,71 $\pm$ 3,92	5,07 $\pm$ 1,57	5,92 $\pm$ 2,01
Promielócito e mielócito	0,72 $\pm$ 1,04	1,93 $\pm$ 1,67	0,87 $\pm$ 1,24
Metamielócito e bastonete	1,50 $\pm$ 1,83	1,10 $\pm$ 1,43	2,19 $\pm$ 1,94
Neutrófilos segmentados	4,68 $\pm$ 4,57	4,87 $\pm$ 1,77	4,19 $\pm$ 2,83
Eosinófilos	6,44 $\pm$ 3,69	3,38 $\pm$ 2,03	4,63 $\pm$ 2,58
Eritroblastos jovens	5,38 $\pm$ 3,06	8,23 $\pm$ 3,68	3,41 $\pm$ 2,70
Eritoblastos policromático e ortocromático	20,04 $\pm$ 12,79	31,04 $\pm$ 6,12	27,77 $\pm$ 6,89
Linfócitos	139,10 $\pm$ 27,17	142,10 $\pm$ 23,41	173,40 $\pm$ 33,44
Plasmócitos	0,94 $\pm$ 1,86	0,28 $\pm$ 0,76	0,33 $\pm$ 0,71
Macrófagos/Monócitos	0,20 $\pm$ 0,57	0	0,81 $\pm$ 1,13

¹ Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão da variação do número total de células nucleadas e dos diferentes tipos celulares presentes no baço. N=8 para grupo controle e soja parental, n=7 para soja GM. Os resultados foram submetidos à análise estatística Kruskal-Wallis com pós teste de comparação múltipla DUNN.

Tabela 27 - Esplenograma dos animais submetidos a dietas experimentais (2º ensaio)¹

Análise morfológica	Grupos		
	Controle	Soja parental	Soja GM
Células totais ($\times 10^7/\text{mL}$)	20,50 $\pm$ 6,20	19,88 $\pm$ 4,91	27,63 $\pm$ 10,1
Blastos ($\times 10^6$)	1,80 $\pm$ 1,05	1,50 $\pm$ 0,70	2,40 $\pm$ 0,22
Promielócito e mielócito	0	0	0
Metamielócito e bastonete	0,12 $\pm$ 0,20	0,42 $\pm$ 0,50	0,27 $\pm$ 0,70
Neutrófilos segmentados	3,91 $\pm$ 3,01	6,53 $\pm$ 4,06	9,21 $\pm$ 6,74
Eosinófilos	0,82 $\pm$ 0,80	0,25 $\pm$ 0,60	1,85 $\pm$ 1,90
Eritroblastos jovens	1,32 $\pm$ 0,93	1,94 $\pm$ 1,04	1,84 $\pm$ 0,51
Eritroblastos policromático e ortocromático	35,00 $\pm$ 10,00	25,10 $\pm$ 10,11	39,00 $\pm$ 11,21
Linfócitos	161,20 $\pm$ 57,07	160,08 $\pm$ 48,93	217,35 $\pm$ 85,36
Plasmócitos	0,52 $\pm$ 0,22	0,50 $\pm$ 0,83	1,40 $\pm$ 1,36
Macrófagos/Monócitos	1,65 $\pm$ 1,51	2,71 $\pm$ 1,88	2,91 $\pm$ 2,53

¹ Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão da variação do número total de células nucleadas e dos diferentes tipos celulares presentes no baço. N=5 para grupo controle, n=7 para soja GM e soja parental. Os resultados foram submetidos à análise estatística Kruskal-Wallis com pós teste de comparação múltipla DUNN.

8. CONCLUSÕES

De acordo com o protocolo experimental utilizado e os resultados obtidos é possível afirmar:

- Animais alimentados com soja GM e a soja convencional apresentaram crescimento adequado;
- A soja geneticamente modificada para tolerância ao herbicida glifosato não compromete o desenvolvimento de ratos na fase de crescimento.
- A proteína da soja GM apresenta qualidade nutricional adequada e equivale à soja convencional;
- A oferta protéica de 10% na dieta com suplementação de aminoácidos essenciais favorece o crescimento dos animais, visto que foi observado aumento de peso em média de 50g, PER e NPR superiores quando comparados com a oferta protéica de 12% sem suplementação;
- A proteína da soja GM e sua parental apresentam digestibilidade inferior quando comparadas com proteína animal, porém essa diferença não prejudica o metabolismo protéico;
- A proteína da soja GM não altera o aproveitamento protéico dos animais, apresentando bom valor de PDCAA (85%);
- O consumo da soja GM não altera o estado nutricional dos animais, visto que, os valores de albumina e proteínas, não apresentam diferenças estatísticas;
- O consumo da soja GM e sua convencional não alteram o estado de celularidade dos animais;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIBI, S.A. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (PEPT-1) in health and disease. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.285, p.G779-G788, 2003.
- AMMANN, P.; BOURRIN, S.; BONJOUR, J.P.; MEYER, J.M.; RIZZOLI, R. Protein undernutrition-induced bone loss is associated with decreased IGF-1 levels and estrogen deficiency. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v.15, n.4, p.683-690, 2000.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO. **Alimentos geneticamente modificados**: segurança alimentar e ambiental. São Paulo: ABIA, 2002. 175p. [Coletânea de palestras proferidas nos Seminários sobre Alimentos Geneticamente Modificados].
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis AOAC International**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. v.1, cap.12, p.7.
- AULRICH, K.; BOHME, H.; DAENICKE, R.; HALLE, I.; FLACHOWSKY, G. Novel feeds: a review of experiment at our Institute. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, p.285-293, 2002.

- BEHRENS, J.H.; SILVA, M.A.A.P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.24, n.3, p.431-439, 2004.
- BERTOL, T.M.; LUDKE, J.V.; MORES, N. Efeito de diferentes fontes protéicas sobre desempenho, composição corporal e morfologia intestinal de leitões. **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v.29, n.6, p.1735-1742, 2000.
- BONI-SCHNETZLER, M.; SCHMID, C.; MEIER, P.J.; FROECH, E.R. Insulin regulates insulin-like growth factor-I m RNA in rat hepatocytes. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.260, p.E846-E851, 1991.
- BOURRIN, S.; AMMANN, P.; BONJOUR, J.P.; RIZZOLI, R. Dietary protein restriction lowers plasma insulin-like growth factor 1 (IGF-1), impairs cortical bone formation, and induces osteoblastic resistance to IGF-1 in adult female rats. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.141, n.9, p.3149-3155, 2000.
- BOZA, J.J.; MOENNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A.R.; GAUDAUD DE WECK, D.; FRITSCHÉ, R.; DONNET, A.; SCHIFFRIN, E.J.; PERRUISSEAU, G.; BALLEVRE, O. Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.129, n.7, p.1340-1346, 1999.
- BRACH, M.A.; HERRMANN, F. Hematopoietic growth-factors: interactions and regulation of production. **Acta Haematol.**, Basel, v.86, p.128-137, 1991.

BRECHER, G. New methylene blue as a reticulocyte stain. **Am. J. Clin. Pathol.**, Chicago, v.19, n.9, p.895-896, 1949. [Note].

BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1994. 658p.

BRUCE, M.C. Food safety evaluation of crops produced through biotechnology. **J. Am. Coll. Nutr.**, Denville, v.21, n.3, p.166S-173S, 2002.

CAVALLI, S.B. Segurança alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.14, p.41-46, 2001.

CHACKO, A.; CUMMINGS, J.H. Nitrogen losses from the human small bowel: obligatory losses and the effect of physical form of food. **Gut**, London, v.29, p.809-815, 1988.

CHASSY, B.M. Food safety evaluation of crops produced through biotechnology. **J. Am. Coll. Nutr.**, Denville, v.21, n.3 (suppl), p.166-173, 2002.

CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Philadelphia, v.13, n.3, p.297-335, 1980.

CLEMMONS, D.R.; UNDERWOOD, L.E.; DICKERSON, R.N.; BROWN, R.O.; HAK, J.L.; McPHEE, R.D.; HEIZER, W.D. Use of plasma somatomedin-

C/insulin-like growth factor-I measurements to monitor the response to nutritional repletion in malnourished patients. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.41, p.191-198, 1985.

CLEMMONS, D.R.; UNDERWOOD, L.E. Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.11, p.393-412, 1991.

CLUGSTON, G.; SMITH, T.E. Global nutrition problems and novel foods. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, Melbourne, 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. Biotechnol.**, Amsterdam, v.98, p.79-106, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Estimativa de área plantada.

Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/safra/safra20042005Lev02.pdf>.

Acesso: 11 nov. 2005.

COSTA, N.M.B.; BORÉM, A., coord. **Biotecnologia e nutrição**: saiba como o DNA pode enriquecer a qualidade dos alimentos. São Paulo: Nobel, 2003. v.1, 214p.

CRUZ, G.A.D.R.; OLIVEIRA, M.G.A.; PIRES, C.V.; GOMES, M.R.A.; COSTA, N.M.B.; BRUMANO, M.H.N.; MOREIRA, M.A. Protein quality and *in vivo*

digestibility of different varieties of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v.6, p.157-162, 2003.

DACIE, J.V., LEWIS, S.M. **Practical hematology**. 8.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995. p.57-58.

DARRAGH, A.J.; HODGKINSON, S.M. Quantifying the digestibility of dietary protein. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.1850s-1856s, 2000.

DU, F.; HIGGINBOTHAM, D.A.; WHITW, D. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.514-521, 2000.

EAVES, C.J.; CASHMAN, J.D.; SUTHERLAND, H.J.; OTSUKA, T.; HUMPHRIES, R.K.; HOGGE, D.E.; LANDSDORP, P.L.; EAVES, A.C. Molecular analysis of primitive hematopoietic cell proliferation: control mechanisms. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.628, p.298-306, 1991.

EL, S.N.; KAVAS, A. Determination of protein quality of rainbow trout (*Salmoirideus*) by *in vitro* Protein Digestibility Corrected Aminoacid Score (PDCAAS). **Food Chem.**, Amsterdam, v.55, p.221-223, 1996.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Eventos. EMBRAPA Soja. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/>. Acesso em: 04 dez. 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Eventos. EMBRAPA Soja. Soja na Alimentação. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php. Acesso em: 06 out. 2005.

ERDMAN, J.W. Oilseed phytates nutritional implications. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.56, n.7, p.736-741, 1979.

FILIZETTI-COZZI, T.M.C.C.; LAJOLO, F.M. Fibra alimentar insolúvel, solúvel e total em alimentos brasileiros. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.27, n.1, p.83-99, 1991.

FILIZETTI, T.M.C.C.; LOBO, A.R. Fibra alimentar e seu efeito na biodisponibilidade de minerais. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri: Manole. Cap.7, p.174-212. 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Protein quality evaluation**: report of the joint FAO/WHO Expert Consultation Committee on Protein Quality Evaluation, 4-8 dec, 1989, Bethesda. Rome: FAO, 1991. 65p. (FAO food and nutrition paper, 51).

- FREITAS, K.C.; MOTTA, M.E.F.A.; AMANCIO, O.M.S.; NETO, U.F.; MORAIS, M.B. The effect of soy polysaccharide fiber on fecal weight and humidity in growing rats. **J. Pediatr.**, Orlando, v.80, n.3, p.183-188, 2004.
- FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources: a review. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, p.6-29, 1996.
- FRIEDMAN, M.; BRANDON, L.D. Nutritional and health benefits of soy proteins. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, n.3, p.1069-1081, 2001.
- GAGNE, C.M.; ALTON, J.C. Fiber constituents and fibrous food residue effects on the *in vitro* enzymatic digestion of protein. **J. Food Sci.**, Chicago, v.48, p.734-738, 1983.
- GARCIA, M.C.; TORRE, M.; MARINA, M.L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Philadelphia, v.37, n.4, p.361-391, 1997.
- GARCIA, P.B. **Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição protéica**: análise da mobilização celular e da hematopoese. São Paulo, 1992. 2v. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo.
- GIETZEN, D.W. Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. **J. Nutr.**, Bethesda, v.128, p.771-781, 1998.

GIETZEN, D.W. Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency.

J. Nutr., Bethesda, v.128, p.771-781, 1998.

GIETZEN, D.W.; ERECIUS, L.F.; ROGERS, Q.R. Neurochemical changes after imbalanced diets suggest a brain circuit mediating anorectic responses to amino acid deficiency in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.128, p.771-781, 1998.

GIORA, C.G.B. **Avaliação *in vivo* da qualidade protéica da soja geneticamente modificada**. São Paulo, 2004. 71p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

GOMES, M.R.; PIRES, I.S.O.; CASTRO, I.A.; TIRAPEQUI, J. Effect of protein restriction on plasma and tissue levels of insulin-growth factor-1 (IGF-1) in adult rats. **Nutr. Res.**, Orlando, v.23, n.9, p.12396-1250, 2003.

GOMES, M.R.; PIRES, I.S.O.; CASTRO, I.A.; TIRAPEQUI, J. Effect of moderate physical exercise on plasma and tissue levels of insulin-like growth factor-1 in adult rats. **Nutr. Res.**, Orlando, v.24, n.7, p.555-564, 2004.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.177, p.751-766, 1949.

HARPER, A.E. Dispensable and indispensable amino acid interrelationships. In: BLACKBURN, G.L.; GRANT, J.P.; YOUNG, V.R., eds. **Amino acids: metabolism and medical applications**. Boston: John Wright-PSG, 1983. p.105-121.

HASLER, C.M. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technol.**, Chicago, v.52, n.11, p.63-70, 1998. [Review].

HEALTH CANADA. **Guidelines for the safety assessment of novel foods**. Ottawa: Food Directorate-Health Protection Branch, 1994. 2v.

HEIDENREICH, E. Operation strategies for expansion cooking. **Feed Mix**, Doetinchem, v.2, p.32-34, 1994.

HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid score. **Food Technol.**, Chicago, v.48, n.4, p.74-77, 1994.

HU, F.B.; STAMPFER, M.J.; MANSON, J.E.; RIMM, E.; COLDITZ, G.A.; ROSNER, B.A.; HENNEKENS, C.H.; WILLETT, W.C. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. **New Engl. J. Med.**, Waltham, v.337, n.21, p.1491-1499, 1997.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz:**

métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo:

Instituto Adolfo Lutz, 1985. v.1, p.21-44.

ISLEY, W.L.; CLEMMONS, D.R.; UNDERWOOD, L.E. Dietary components that

regulate serum somastostatin-C concentration in humans. **J. Clin. Invest.**,

Ann Arbor, v.71, p.175-782, 1983.

ISTFAN, N.; MURRAY, E.; JANGHORBANI, M.; EVANS, W.J.; YONG, V.R.

The nutritional value of a soy protein concentrate for long-term nutritional maintenance in young men. **J. Nutr.**, Bethesda, v.113, p.2524-2534, 1983.

JAMES, D.; SCHMIDT, A.M.; WALL, E.; GREEN, M.; MASRI, S. Reliable

detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. **J. Agric. Food. Chem.**, Columbus, v.51,

n.20, p.5829-5834, 2003.

JEPSON, M.M.; BATES, P.C.; MILLWAR, D.J. The role of insulin and thyroid

hormones in the regulation of muscle growth and protein turnover in response to dietary protein in the rat. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.59, n.3,

p.397-415, 1988.

KUIPER, H.A.; NOTEBORN, H.P.J.M.; KOK, E.J.; KLETER, G.A. Safety

aspects of novel foods. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, p.267-271, 2002.

KUIPERS, O.P. Genomics for food biotechnology: prospects of the use of high-throughput technologies for the improvement of food microorganism. **Curr. Opin. Biotechnol.**, Haywards Heath, v.10, p.511-516, 1999.

LAIDLAW, S.A.; KOPPLE, J.D. Protein and amino acid requirements and the composition of complementary foods. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.46, p.593-605, 1997.

LAJOLO, F.M.; NUTTI, M.R. **Transgênicos**: bases científicas da sua segurança. São Paulo: SBAN, 2003. 112p.

LARON, Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. **Mol. Pathol.**, London, v.54, n.5, p.311-316, 2001.

LEMOS SILVA, G.M. **Influência da relação entre proteínas e fibras da dieta no crescimento**: estudo em ratos. São Paulo, 1995. 151p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRE, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**: técnica e interpretação. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

LOBO, A.R. **Efeito dos frutanos (frutooligossacarídeos) na biodisponibilidade de cálcio e magnésio em ratos**. São Paulo, 2004.

138p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

LOLAS, G.M.; MARKAKIS, P. Phytic acid and other phosphorus compounds of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.23, n.1, p.13-15, 1975.

MADDEN, D. **Food biotechnology**: an introduction. Washington: ILSI Press, 1995. 38p. (ILSI Europe concise monograph series).

MAGA, J.A. Phytate: it's chemistry occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.30, n.1, p.1-9, 1982.

MARQUEZ, U.M.L.; LAJOLO, F.M. *In vivo* digestibility of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins-the role of endogenous protein. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.39, n.7, p.1211-1215, 1991.

MARZO, F.; ALONSO, R.; URDANETA, E.; ARRICIBITA, F.J.; IBÁÑEZ, F. Nutritional quality of extruded kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Pinto*) and its effects on growth and skeletal muscle nitrogen fraction in rats. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v.80, n.4, p.875-879, 2002.

- MAYANI, H.; GUILBERT, L.J.; JANOWSKA-WIECZERK, A. Biology of the hematopoietic microenvironment. **Eur. J. Haematol.**, Oxford, v.49, n.5, p.225-233, 1992.
- MCDONOUGH, F.; STEINKE, F.; 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.**, Washington, v.73, n.5, p.801-805, 1990.
- MENDES, W.S.; SILVA, I.J.; FONTES, D.O.; RODRIGUEZ, N.M.; MARINHO, P.C.; SILVA, F.O.; AROUCA, C.L.C.; SILVA, F.C.O. Composição química e valor nutritivo da soja crua e submetida a diferentes processamentos térmicos para suínos em crescimento. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.56, p.207-213, 2004.
- MEYER, J.H. Interaction of dietary fiber and protein on food intake and body composition of growing rats. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.193, n.3, p.488-494, 1958.
- MILLER, D.S.; BENDER, A.E. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.9, p.382-388, 1955.

MILLWARD, D.J. Can we define indispensable amino acid requirements and assess protein quality in adult? **J. Nutr.**, Bethesda, v.124, p.1509S-1515S, 1994.

MOFFAT, A.S. Finding new ways to protect drought-stricken plants. **Science**, Washington, v.296, p.1226-1229, 2002.

MONTEIRO, M.R.P.; COSTA, N.M.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; PIRES, C.V.; MOREIRA, M.A. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina kunitz e das isoenzimas lipoxigenases. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.17, n.2, p.195-205, 2004.

MORENS, C.; GAUDICHON, C.; METGES, C.C.; FROMENTIN, G.; BAGLIERI, A.; EVEN, P.C.; HUNEAU, J.F.; TOMÉ, D. A hight-protein meal exceeds anabolic and catabolic capacities in rats adapted to a normalprotein diet. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.2312-2321, 2000.

MOSSÉ, J. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds - a reappraisal of its definition and determination - variation according to species and to seed protein content. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.38, n.1, p.18-24, 1990.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (United States). Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. **Nutrient requirements of laboratory**

animals. 4.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1995. p.11-79.

(Nutrient requirements of domestic animals).

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Plantas transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar (Biossegurança de plantas transgênicas). **Rev. Nutr.**, Campinas, v.16, n.1, p.105-116, 2003.

NOGUCHI, T. Protein nutrition and insulin-like growth factor system. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.84 (suppl 2), p.S241-S244, 2000.

OLIVEIRA, A.C.; REIS, S.M.P.M.; CARVALHO, E.M.; PIMENTA, F.M.V.; RIOS, K.R.; PAIVA, K.C.; SOUSA, L.L.; ALMEIDA, M.; ARRUDA, S.F. Adições crescentes de ácido fólico à dieta não interferem na digestibilidade da caseína e no ganho de peso em ratos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.16, n.2, p.211-217, 2003.

OPAS, M. Substratum mechanics and cell differentiation. **Int. Rev. Cytol.**, San Diego, v.150, p.119-137, 1994.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT.

Safety evaluation of foods derived from modern biotechnology, concepts and principles. Paris, 1992. 74p. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/57/3/1946129.pdf>. Acesso em: 01 abr. 2004.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT.

Report on the OCDE workshop on the toxicological and nutritional testing of novel foods. Paris, 1998. 48p. Disponível em: <http://www.ocde.org/subject/biotech>. Acesso em: 1 abr. 2004.

OTTO, E.R.; YOKOYAMA, M.; KU, P.K.; AMES, N.K.; TROTTIER, N.L.

Nitrogen balance and ileal amino acid digestibility in growing pigs fed diets reduced in protein concentration. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v.81, p.1743-1753, 2003.

PATERINIANI, E. Transgenia: ciência a serviço da sociedade e do meio ambiente. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL TRANSGÊNICOS NO BRASIL, São Paulo, 2003. **Resumos**. São Paulo: USP, Academia Brasileira de Ciências, International Union of Food Science and Technology, 2003.

PAYNE, J.H. DuPont Petition 97-008-01p for determination of nonregulated status for transgenic high oleic acid soybean sublines G94-1, G94-19 and G168: environmental assessment and finding of no significant impact may 1997. (APHIS-USDA). Disponível em: <http://www.agbios.com/docroot/decdocs/01-290-084.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2004.

PHILLIPS, L.S.; VASSILOPOULOU-SELLIN, R. Nutritional regulation of somatomedin. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.32, p.1082-179, 1979.

PHILLIPS, L.S.; GOLDSTEIN, S.; PAO, C.I. Nutrition and somatomedin. 26.

Molecular regulation of IGF-I by insulin in cultured rat hepatocytes.

Diabetes, Alexandria, v.40, p.1525-1530, 1991.

PHILLIPS, L.S.; PAO, C.I.; VILLAFUERTE, B.C. Molecular regulation of insulin-

like growth factor-I and its principal binding protein, IGFBP-3. **Prog. Nucleic**

Acid Res. Mol. Biol., San Diego, v.60, p.195-265, 1998.

PIMENTEL, E. Insulin, and Insulin-like growth factors. In: PIMENTEL, E.

Handbook of growth factors: peptide growth factors. Boca Raton: CRC

Press, 1994. v.2.

PINAZZA, L.A.; ALIMANDRO, R. A segunda revolução verde. **Agroanalysis**,

Rio de Janeiro, v.18, n.10, p.37-43, 1998.

PREWITT, T.E.; DÉRCOLE, A.J.; SWITZER, B.R.; VAN WYK, J.J. Relationship

of serum immuno reactive somatomedin C dietary protein and energy in

growing rat. **J. Nutr.**, Bethesda, v.112, p.144-50, 1982.

PROSKY, L.; ASP, N.G.; SCHWEIZER, T.F.; DE VRIES, J.W.; FURDA, I.

Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products: collaborative study. **J. -Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington,

v.75, p.360-367, 1992.

RAITEN, D.J.; TALBOT, J.M.; WATERS, J.H. LSRO report: assessment of nutrient requirements for infant formulas. **J. Nutr.**, Bethesda, v.128, p.2110S-2118S, 1998.

REDDY, N.R.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Phytates in legumes and cereals. **Adv. Food Res.**, New York, v.28, n.1, p.1-92, 1982.

REEDS, P.J. Dispensable and indispensable amino acids for humans. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.1835S-1840S, 2000.

REEDS J.P; GARLICK J.P. Protein and amino acid requirements and the composition of complementary foods. **J. Nutr.**, Bethesda, v.133, p.2953S-2961S, 2003.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEU, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on the reformulation of the AIN-76 a rodent diet. **J. Nutr.**, Bethesda, v.123, p.1939-1951, 1993.

REEVES, R.D.; DICKINSON, L.; LEE, J.; KILGORE, B.; BRANHAM, B. ELDERS, J. Effects of dietary composition on somatomedin activity in growing rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.109, p.613-20, 1979.

RÉMÉSY, C.; DEMÍGNÉ, C.; LEVRAT, M.A. Le rôle des produits végétaux, en particulier des fibres, na nutrition préventive. **Med. Nutr.**, Joue-les-Tours, v.30, p.189-198, 1994.

RIBEIRO, S.M.L. **Relações entre proteína da dieta, atividade física e crescimento**: estudo em ratos. São Paulo, 1995. 110p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

RIBEIRO, S.M.L.; TIRAPEGUI, J. Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I): algumas relações com crescimento corporal e tecidual, exercício físico e dieta. **Cad. Nutr.**, São Paulo, v.10, p.30-47, 1995.

ROBISON, S.; SCOTT, N.; GACKLE, A. Gene technology and future foods. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, Melbourne, v.9 (suppl.), p.113-121, 2000.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v.20, p.315-328, 1947.

ROTHWELL, N.J.; STOCK, M.J. Influence of carbohydrate and fat intake on diet-induced thermogenesis and brown fat activity in rats fed low protein diets. **J. Nutr.**, Bethesda, v.117, p.1721-1726, 1987.

SAINI, H.S. Thermal stability of protease inhibitors in some cereals and legumes. **Food Chem.**, Amsterdam, v.32, p.59-67, 1989.

SANCHEZ-GOMEZ, M.; MALMLÖF, K.; MEJIA, W.; BERMUDEZ, A., OCHOA, M.T.; CARRASCO-RODRIGUEZ, S.; SKOTTNER, A. Insulin-like growth factor-I, but not growth hormone, is dependent on a high protein intake to increase nitrogen balance in the rat. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.81, p.145-152, 1998.

SANDBERG, A.S.; AHDERINNE, R. HPLC method for determination of inositol tri, tetra, penta and hexaphosphates in foods and intestinal. **J. Food Sci.**, Chicago, v.51, p.547-550, 1986.

SARWAR, G. The Protein Digestibility-Corrected Aminoacid Score method overestimates quality of protein containing antinutritional factors and poorly digestible proteins supplemented with limiting aminoacids in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.127, p.758-764, 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.**, Washington, v.67, n.5, p.976-981, 1984.

SARWAR, G.; McDONOUGH, F.E. Review of protein quality evaluation methods. **J. -Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.73, p.347-356, 1990.

SARWAR, G.; McDONOUGH, F. E. Review of protein quality evaluation methods: evaluation of protein digestibility-corrected amino acids score method for assessing protein quality of foods. **J. -Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.73, n.3, p.347-356, 1990. [Review].

SARWAR, G.; PEACE, R.W. Comparisons between true digestibility of total nitrogen and limiting amino acids in vegetable proteins fed to rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.116, p.1172-1184, 1986.

SARWAR, G.; SEPEHR, S. Protein digestibility and quality in products containing antinutritional factors are adversely affected by old age in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.133, p.220-225, 2003.

SATTERLEE, L.D.; KENDRICK, J.G.; MARSHALL, H.F.; JEWELL, D.K.; ALI, R.A.; HECKMAN, M.M.; STEINKE, H.F.; LARSON, P.; PHILLIPS, R.D.; SARWAR, G.; SLUMP, P. *In vitro* assay for predicting protein efficiency ratio as measured by rat bioassay: collaborative study. **J. -Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.65, n.4, p.798-809, 1982.

SCHAAFSMA, G. The protein digestibility-corrected amino acid score. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.1865S-1867S, 2000.

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

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.**, Amsterdam, v.163, p.381-395, 2002.

SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C., eds. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9.ed. Barueri: Manole, 2003. 1026p.

SIMMEN, F.A.; BADINGA, L.; GREEN, M.L.; KWAK, I.; SONG, S.; SIMMEN, R.C. The porcine insulin-like growth factor system: at the interface of nutrition, growth and reproduction. **J. Nutr.**, Bethesda, v.128 (suppl 2), p.315S-320S, 1998.

SMITH, R.J. Glutamine: metabolism and its physiological importance. **JPEN, J. Parenter. Enteral Nutr.**, Silver Spring, v.14, n.4 (suppl.), p.40S-44S, 1990.

SMITH, W.J.; UNDERWOOD, L.E.; CLEMMONS, D.R. Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF- binding proteins children and adults. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v.80, v.443-449, 1995.

SOARES, J.L.; DONZELES, J.L.; OLIVEIRA, R.F.M.; FERREIRA, A.S.; FERREIRA, C.L.L.; HANNAS, M.I.; APOLÔNIO, L.R. Soja integral processada (fermentada e extrusada) e farelo de soja em substituição ao leite em pó em dieta de leitões desmamados aos 14 dias de idade. **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v.29, n.4, p.1153-1161, 2000.

SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. **Anal. Biochem.**, New York, v.30, p.1190-1206, 1958.

SPIES, J.R. Determination of tryptophan in protein. **Anal. Chem.**, Columbus, v.39, p.1412-1415, 1967.

STROMBERG, P.C. Changes in the hematologic system. In: MOHR, U.; DUNGWORTH, D.L., CAPEN, C.C., eds. **Pathobiology of the aging rat**. Washington: ILSI Press, 1992. v.1, p.15-24. [Blood and lymphoid, respiratory, urinary, cardiovascular, and reproductive systems, v.1].

THE NATIONAL ACADEMIES PRESS. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). Disponível em:
<http://www.nap.edu/openbook/0309085373/html/589.html>. Acesso em: 23 out. 2005.

THISSEN, J.P.; KETELSLEGERS, J.M.; UNDERWOOD, L.E. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. **Endocr. Rev.**, Chevy Chase, v.15, n.1, p.80-101, 1994.

TIRAPEGUI, J. Effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on muscle and bone growth in experimental models. **Int. J. Food.Sci. Nutr.**, Basingstoke, v.50, n.4, p.231-236, 1999.

UNDERWOOD, L.E.; CLEMMONS, D.R.; MAES, M.; D'ERCOLE, A.J.; KELELSERGER, J.M. Regulation of somatomedin-C/IGF-I by nutrients. **Horm. Res.**, Basel, v.24, p.166-176, 1986.

UNDERWOOD, L.E.; D'ERCOLE, A.J.; VAN WYK, J.J. Somatomedin-C and the assessment of growth. **Pediatr. Clin. North Am.**, Orlando, v.27, p.771-782, 1980.

UZOGARA, S.G. The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: a review. **Biotechnol. Adv.**, Amsterdam, v.18, p.179-206, 2000.

VITURI, C.L. **Efeito da desnutrição protéica sobre a matriz extracelular da medula óssea de camundongos**. São Paulo, 2001. 131p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

WATERLOW, J.C. **Malnutrición proteico-energética**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1996. 501p. (Publicação Científica n.555).

WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U., eds. **Williams hematology**. 6.ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. 1941p.

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

WU, W.; WILLIAMS, W.P.; KUNKEL, M.E.; ACTON, J.C.; HANG, F.B.; WARDLAW, F.B.; GRIMES, L.W. True protein digestibility-corrected amino acid score of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, p.1295-1298, 1995.

WU, W.; WILLIAMS, W.P.; KUNKEL, M.E.; ACTON, J.C.; HANG, F.B.; WARDLAW, F.B.; GRIMES, L.W. Amino acid availability and availability-corrected amino acid score of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, p.1296-1301, 1996.

YOSHIMURA, K.; KAJI, H.; KAMIDONO, S.; CHIHARA, K. Fasting increases the expression of basic fibroblast growth factor (FGF-2) messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus. **Horm. Metab. Res.**, Stuttgart, v.27, p.360-363, 1995.

YOUNG, V.R.; MARCHINI, J.S.; CORTIELLA, 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.**, Bethesda, v.51, p.270-289, 1990.

YOUNG, V.R.; PELLETT, P.L. Protein evaluation, amino acid scoring and the Food and Drug Administration's proposed food labelling regulation. **J. Nutr.**, Bethesda, v.121, p.145-150, 1991.

ZHU, Y.Z.; LI, D.F.; WANG, F.L.; YIN, J.D.; JIN, H. Nutritional assessment and fate of DNA of soybean meal from roundup ready or conventional soybeans using rats. **Arch. Anim. Nutr.**, Basingstoke, v.58, n.4, p.295-310, 2004.