

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO VALOR PROTÉICO DO
MILHO OPACO-2*

Leda Ulson Mattos

Capítulo I - INTRODUÇÃO	9
Capítulo II - MATERIAL E MÉTODOS	13
1 - Material	13
2 - Métodos	19
2.1 - Métodos de dosagem	19
2.2 - Métodos experimentais	21
2.3 - Métodos estatísticos	22
Capítulo III - EXPERIÊNCIAS	23
1 - Experiências em animais	23
2 - Experiências em estudantes	26
Capítulo IV - RESULTADOS	31
A - Resultado da análise de alimentos	31
B - Resultados das experiências em animais e sêres humanos	35
1 - Experiências em animais	35
2 - Experiências em estudantes	63
Capítulo V - DISCUSSÃO	73
Capítulo VI - CONCLUSÕES	81
Capítulo VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

* Tese de doutoramento apresentada à Escola de Enfermagem da
Universidade de São Paulo (Departamento de Enfermagem Médi-
co-Cirúrgica).

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O milho é uma das fontes protéicas mais utilizadas no Brasil, especialmente nas zonas economicamente pouco desenvolvidas, onde sabemos existir o problema da desnutrição protéica. Desde alguns anos, conhece-se uma variedade genética, o milho opaco-2, que se mostra mais eficiente no crescimento de animais, do que qualquer outra variedade de milho híbrido até então conhecida.

Entre os primeiros trabalhos de que temos conhecimento, a respeito do valor protéico do milho híbrido, salienta-se o de OSBORNE e MENDEL (1914), que estudaram a proteína do milho verificando que é deficiente em lisina e triptofano, deficiência esta provocada pelo alto teor de zeína.

Mais recentemente, HANSEN e col. (1946), constataram que a zeína em quase todas as variedades de milho, corresponde a 50% das proteínas.

MOSSÉ (1946), encontrou na zeína baixo teor de lisina e triptofano.

SAUERLICH e col. (1955), HANSEN e col. (1946) comprovaram que havia aumento do teor protéico do milho, quando este era plantado em terreno adubado. Esse aumento era devido à maior quantidade da fração zeína, o que prejudicava a qualidade da proteína.

Todas as variedades de milho, existentes até o momento, continham alto teor de zeína e portanto, carentes em lisina e triptofano.

A primeira comunicação acerca das características que o gen opaco-2 confere ao endosperma do milho foi apresentada por Mertz (1963) na reunião sobre "Pesquisa Industrial de Milhos Híbridos" realizada em Chicago.

MERTZ, BATES e NELSON (1964), mostraram que o milho opaco-2 contém duas vezes mais lisina do que o milho comum, diferença atribuída à diminuição da relação zeína-glut_elina. Confirmando estes resultados, MERTZ e BATES (1965), encontraram para a zeína do milho opaco-2 um teor de 22% do total das proteínas.

MERTZ, BATES e NELSON (1965), MERTZ (1966), alimentando ratos com milho opaco-2 em um nível protéico de 10%, observaram crescimento mais rápido do que com outras variedades de milho híbrido no mesmo nível protéico.

WATSON (1966), verificou que o gen opaco-2 aumenta a relação germe-endosperma, mas só o conteúdo de aminoácidos do endosperma é modificado, conforme já havia sido constatado por MERTZ, BATES e NELSON (1964).

Na Guatemala, BRESSANI (1966), pesquisou a retenção de nitrogênio em crianças em idade pré-escolar, recebendo como fonte de proteína, milho opaco-2 ou leite. Este autor realizou duas experiências: na primeira as crianças foram alimentadas com 1,8 g de proteína, e na segunda, com 1,5 g. Observou que no primeiro caso a absorção média de nitrogênio foi um pouco mais baixa nas crianças alimentadas com milho opaco-2, mas a retenção foi a mesma com as duas fontes protéicas. Na segunda experiência a retenção e absorção foi maior nas crianças alimentadas com leite.

Outro autor, PICKETT (1966), observando a variação de peso de porcos alimentados com milho opaco-2, milho comum ou milho comum suplementado com soja, verificou que os porcos alimentados com milho opaco-2 aumentaram de peso na mesma proporção que aqueles que recebiam milho comum e soja, o que não ocorreu com animais alimentados unicamente com milho comum.

Um outro aspecto foi estudado por CLARK (1966), CLARK e col. (1967), que se preocuparam com a determinação da quantidade de milho opaco-2 indispensável para manter o equilí

brio nitrogenado em homens e mulheres; dependendo de seu pêso corporal, esta quantidade variou de 200 a 350 g diárias. Suplementaram 200 g de milho opaco-2 com lisina e triptofano não constatando melhoria na retenção de nitrogênio.

BRESSANI (1969), estudou o PER para a proteína do milho opaco-2, milho comum e milho comum suplementado com aminoácidos. Obteve um pequeno, mas não significativo aumento quando suplementou o milho opaco-2 com lisina. O PER não se alterou quando foi acrescentado à lisina, triptofano ou triptofano e isoleucina. No caso do milho comum, a suplementação não foi significativa para lisina, mas sim, para lisina e triptofano.

Em trabalhos anteriores, MATTOS e DE ANGE LIS (1970), determinaram o PER do milho opaco-2, caseína, fubá e carne administrados a ratos em um teor protéico de 6%. A carne e o milho opaco-2 tiveram o mesmo PER (2,5) sendo o da caseína ligeiramente superior (2,8), e o do milho comum bastante inferior (0,7).

No Brasil, o "Instituto Agronômico de Campinas", a "Escola Superior de Agricultura de Viçosa" e "Sementes Agro ceres S.A." possuem programas intensos de produção e melhoramento do milho opaco-2, pois entre nós a linhagem americana não encontra as mesmas condições de produtividade.

A grande maioria das proteínas animais apresentam em taxa satisfatória os aminoácidos essenciais para o homem, ao passo que apenas uma pequena parte dos vegetais apresentam proteína completa. Na maioria dos casos, são deficientes em metionina, lisina e triptofano.

Apesar da evidente superioridade das proteínas animais, seria impossível pretender suprir o consumo humano de proteínas - em constante elevação - com os produtos da indústria pecuária. Isto, não só pelo elevado custo da carne, como também porque a extensão de terra requerida para a alimentação de um homem é maior quando esta se processa na base de proteínas animais.

Esta tese teve como objetivo precípuo estabelecer o valor do milho opaco-2 como fonte protéica para o ser humano. Visando à congecução dêsse objetivo propusemõ-nos a estudar o assunto de maneira metódica e planejada à vista de resultados representativos e seguros, que eventualmente pudessem contribuir para estimular o cultivo desta variedade de milho nas diversas regiões do país.

Assim, estudamos o balanço nitrogenado em estudantes e ratos, fazendo determinações de nitrogênio metabólico e endógeno; verificamos o crescimento de animais jovens (ratos) submetidos a dietas contendo proteínas de diferentes fontes e o desbalanço de aminoácidos do milho comum.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS.

1 - Material

Animais de experiência: (1) Neste trabalho foram utilizados ratos (Rattus norwegicus, albinus), Wistar, de ambos os sexos com a idade de aproximadamente 30 dias, pesando, em média, 55 g.

Estudantes: sete estudantes do sexo feminino, com a idade entre 18 e 24 anos, pertencentes à "Escola de Enfermagem da USP" participaram voluntariamente desta pesquisa. As estudantes levaram vida normal sendo controlada apenas a sua alimentação. Como as experiências foram realizadas em um período de dois anos, o pê so das alunas variou e será tabelado em cada experiência.

Milho opaco: (2) o milho opaco-2 por nós usado, é o resultado dos cruzamentos da linhagem americana, portadora do fator opa co-2 com a variedade Maya. Foi moído e colocado em latas fe chadas com fita gomada e conservado em geladeira a 4°C. Utiliza mos um único lote para toda a experiência, com um teor protéico de 9,1%.

Milho comum: (3) foi utilizado milho comum sob duas formas:

- A - fubá adquirido em quantidade suficiente para tô da a experiência e contendo 7,6% de proteína;
- B - milho integral moído e com um teor de proteína de 9,3%.

Carne: utilizamos o contrafilé, fresco, sem gordura, cozido e mof do para a dieta dos ratos e frito para as estudantes. Teor protéico 21,6%.

Caseína: (4) contendo 75,6% de proteína.

-
- (1) Todos os animais foram obtidos do Biotério Central da Faculda de de Medicina da USP.
 - (2) As sementes do milho opaco-2 nos foram gentilmente cedidas pelo Engenheiro Agrônomo Luiz Torres de Miranda do Institu to Agrônomico de Campinas.
 - (3) Fubá Cacique.
 - (4) Lacticínios Tacrigy Ltda.

Dietas para ratos: as dietas foram calculadas de maneira a fornecer aproximadamente 40cal/dia/rato.

A - Milho opaco-2 (6% proteína)

Óleo de milho	4,8%
sais minerais	3,2%
vitaminas	1,6%
óleo de fígado de bacalhau	1,6%
açúcar	22,8%
milho opaco-2	66,0%

Ba- Milho comum - fubá (6% proteína)

óleo de milho	4,8%
sais minerais	3,2%
vitaminas	1,6%
óleo de fígado de bacalhau	1,6%
açúcar	8,8%
milho comum	80,0%

Bb- Milho comum integral (6% proteína)

óleo de milho	4,8%
sais minerais	3,2%
vitaminas	1,6%
óleo de fígado de bacalhau	1,6%
açúcar	24,4%
milho comum integral	64,4%

C - Caseína (6% proteína)

óleo de milho	4,8%
sais minerais	3,2%
vitaminas	1,6%
óleo de fígado de bacalhau	1,6%
açúcar	80,8%
caseína	8,0%

D - Caseína (6% proteína)

óleo de milho	4,8%
sais minerais	3,2%
vitaminas	1,6%
óleo de fígado de bacalhau	1,6%
açúcar	84,8%
caseína	4,0%

E - Caseína (9,8% proteína)

óleo de milho	4,8%
sais minerais	3,2%
vitaminas	1,6%
óleo de fígado de bacalhau	1,6%
açúcar	75,2%
caseína	13,6%

F - Carne (6% proteína)

óleo de milho	4,8%
sais minerais	3,2%
vitaminas	1,6%
óleo de fígado de bacalhau	1,6%
açúcar	64,8%
carne	24,0%

G - Aprotéica

óleo de milho	4,8%
sais minerais	3,2%
vitaminas	1,6%
óleo de fígado de bacalhau	1,6%
açúcar	88,8%

H - Dieta Ba suplementada com 136 mg de lisina e 25 mg de tripto fano.

I - Dieta Ba suplementada com 136 mg de lisina 25 mg de tripto fano, 140 mg de ácido aspártico, 133 mg de argidina e 35 mg de glicina.

J - Dieta Ba suplementada com 136 mg de lisina, 25 mg de tripto fano, 140 mg de ácido aspártico, 133 mg de arginina e 35 mg de glicina, 27 mg de histidina e 23 mg de cistina.

K - Dieta A suplementada com 530 mg de leucina.

A mistura de sais minerais, utilizada em tôdas as dietas, foi a de Phillips e Hart (1935) modificada:

NaCl	335,0 g
K ₂ HPO ₄	845,0 g
Ca(H ₂ PO ₄) 2.H ₂ O	190,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	204,0 g
CaCO ₃	600,0 g
FeSO ₄ .H ₂ O	15,0 g
ou	
FeC ₆ H ₅ O ₇ .3H ₂ O	75,0 g
KI	1,6 g
ZnCl ₂	0,5 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,6 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,7 g

A solução de vitaminas utilizada tinha a seguinte composição, por 100 ml:

Tiamina (HCl)	20,0 mg
Riboflavina	20,0 mg
Piridoxina	20,0 mg
Vitamina K	50,0 mg
Pantotenato de cálcio	50,0 mg
Ácido fólico	10,0 mg
Vitamina B ₁₂	0,2 mg
Colina (HCl)	10,0 mg
Inositol	1,0 mg
Ácido nicotínico	20,0 mg

Dietas para estudantes: as dietas L e M foram calculadas para fornecer 1450 calorias por dia, sendo as calorias adicionais necessárias para atingir o requisito calórico de cada estudante, fornecidas pelo açúcar, manteiga e óleo. Contém 31,2g de proteína/estudante/dia.

L - Fubá	240 g
Tomate	200 g
Banana	200 g
Suco de laranja	200 g
Maçã	150 g
Alface	50 g
Pão	50 g
M - Milho opaco-2	200 g
Tomate	200 g
Banana	200 g
Pão	50 g
Suco de laranja	200 g
Maçã	150 g
Alface	50 g

As dietas N e O foram calculadas para fornecer 31,9 g proteína/estudante/dia e da mesma maneira que as anteriores 1450 calorias/dia.

N - Milho comum (fubá)	240 g
Tomate	200 g
Alface	80 g
Banana	200 g
Pão	50 g
Suco de laranja	200 g
Maçã	150 g

O - Dieta de milho comum (L) suplementada com 417 mg de lisina e 80 mg de L-triptofano.

A dieta P foi calculada de maneira a conter 36,2 g proteína/estudante/dia, e as calorias necessárias para atingir as necessidades calóricas do estudante fornecidas pela manteiga, açúcar e óleo.

P - Carne	85 g
Tomate	200 g
Alface	50 g
Banana	200 g

Pão	50 g
Suco de laranja	200 g
Maçã	150 g
Macarrão	50 g

Q - Dieta com 3% de proteína e 2200 calorias/dia

Carne	70 g
Tomate	200 g
Alface	50 g
Banana	200 g
Pão	50 g
Suco de laranja	200 g
Maçã	150 g
Arroz	100 g
Óleo	50 g
Manteiga	40 g
Açúcar	100 g

R - Dieta com 5,8% de proteína e 2200 calorias/dia

Carne	200 g
Tomate	200 g
Alface	50 g
Banana	100 g
Pão	50 g
Suco de laranja	200 g
Maçã	150 g
Arroz	60 g
Óleo	40 g
Manteiga	20 g
Açúcar	100 g
Queijo prato	40 g

S - Dieta com 10,6% de proteína e 2200 calorias/dia

Carne	200 g
Gelatina	10 g
Queijo prato	150 g
Leite	200 g
Pão	50 g

Açúcar	50 g
Arroz	100 g
Óleo de milho	40 g
Alface	50 g
Banana	200 g

A fim de manter um paladar razoável, os milhos, tanto o comum como o opaco-2, foram preparados na maneira usual, isto é, cozidos com água e sal e a carne, servida como bife.

2 - Métodos

2.1 - Métodos de dosagem

Dosagem de nitrogênio: tôdas as dosagens de nitrogênio foram feitas pelo método de Kjeldahl modificado, ALBANESE(1963), O método consiste em digerir a amostra em H₂SO₄ concentrado e mistura digestiva (sulfato de cobre e sulfato de potássio). Quando a solução se torna clara, junta-se água oxigenada a 30% e deixa-se digerir mais 20 minutos. A adição de um excesso de álcali em um sistema fechado liberta amônia que é recebida em ácido bórico a 4% e titulada com H₂SO₄ 0,1 N. Para calcular a proteína, foi usado o fator convencional (N x 6,25).

Dosagem de nitrogênio nas fezes e urina de ratos: as fezes totais de cada rato foram digeridas pelo método de Kjeldahl e o digerido transportado para um balão volumétrico de 100 ml, o seu volume completado com água destilada e o nitrogênio determinado em uma alíquota de 5 ml.

O volume total da urina foi completado com água destilada até o valor exato mais próximo e uma amostra de 2 ou 5 ml tomada para a determinação do nitrogênio.

Dosagem de nitrogênio nas fezes e urina de estudantes:

As fezes totais foram pesadas, homogeneizadas em liquidificador, e da suspensão retirada uma amostra de aproximadamente 3g para a determinação do nitrogênio.

O volume total da urina foi medido e usada uma alíquota de 2 ml para a determinação de nitrogênio.

Dosagem de aminoácidos do milho comum e opaco-2:
os aminoácidos, com exceção do triptofano, foram dosados por cromatografia (5).

- a) Preparo da amostra: amostras de milho de aproximadamente 3 mg de proteína foram colocadas em ampolas de vidro com 4 ml de HCl 6 N e estas fechadas. As amostras foram hidrolisadas durante 4, 18, 24, 48 e 72 horas em estufa a 100°C.

As soluções foram filtradas, o HCl removido a vácuo a 40°C e os resíduos dissolvidos com tampão de citrato pH 2,2. As soluções assim obtidas, tiveram seu pH acertado com o mesmo tampão, sendo então diluídas para 5 ml.

- b) Análise dos aminoácidos: alíquotas de 0,25 ml do hidrolisado foram analisadas no analisador. As quantidades de aminoácidos das amostras foram determinadas por comparação com uma mistura de aminoácidos, padrão Beckmann.
- c) Cálculo dos aminoácidos: para obter valores mais exatos, a hidrólise das amostras foi realizada em 5 tempos, como já vimos. Quando, em determinado tempo de hidrólise, o valor do aminoácido era significativamente maior do que nos outros tempos, usou-se este valor como o do referido aminoácido. Quando os valores de um aminoácido eram muito semelhantes, nos diversos tempos de hidrólise, usou-se a média como valor do aminoácido. Em alguns casos, em que os valores diminuiam muito com o aumento do tempo de hidrólise, foi feita uma extrapolação linear destes valores para tempo zero e este valor foi usado como resultado ideal.

Dosagem de triptofano: foi feita pelo método de HORN e JONES (1945). A amostra foi hidrolisada pela papaína a 2% em

(5) Analisador de Beckmann, modelo 120 B.

pH 8,0 a 70°C durante 12 horas. A solução foi filtrada e o resíduo lavado várias vezes com água destilada e diluído a 100 ml. Em uma alíquota deste hidrolisado, o triptofano foi dosado colorimetricamente com nitrito de sódio e paradimetilbenzaldeído.

2.2 - Métodos experimentais

Crescimento de ratos: nas experiências em que determinamos o crescimento de ratos, eles foram colocados em gaiolas individuais, recebendo dieta e água ad libitum, sendo pesados cada dois dias.

Balanço nitrogenado em ratos: os ratos, mantidos em gaiolas individuais, foram transferidos para as gaiolas metabólicas no período em que se media o balanço nitrogenado, onde permaneceram por sete dias, retornando depois às primeiras.

As gaiolas metabólicas usadas tinham fundo de tela de arame por onde passavam as fezes e urina. As fezes foram recolhidas em um funil colocado logo abaixo do fundo da gaiola e que era vedado por uma tela de nylon. A urina atravessava a tela e era recebida em um recipiente, contendo 5 ml de H₂SO₄ a 10%. As fezes eram recolhidas diariamente e colocadas em um frasco de Kjeldahl, contendo 10 ml de H₂SO₄ conc. sendo este usado na digestão do material. As urinas foram recolhidas cada dois dias e guardadas na geladeira.

Determinação de nitrogênio metabólico e endógeno em ratos: o balanço nitrogenado foi determinado em ratos alimentados com 3%, 6% e 9, 8% de proteína derivada da caseína. Com os valores médios obtidos para nitrogênio ingerido, urinário e fecal nas três dietas foi feita a análise de linearidade e obtidas as retas de regressão N fecal e urinário em relação à proteína ingerida. Em ambos os casos, obtivemos uma reta do tipo $y = a + bx$. Traçamos as retas e extrapolando para o ponto proteína zero, conseguimos o valor para nitrogênio metabólico e endógeno conforme a reta considerada. Entende-se por nitrogênio endógeno aquele eliminado na urina, quando a proteína ingerida é zero, e, por nitrogênio metabólico o eliminado pelas fezes nas mesmas condições.

Balanço nitrogenado em estudantes: as estudantes foram submetidos inicialmente a vários exames de laboratório, tais como, exame bacteriológico e parasitológico de fezes, hematológico, eletroforese de sôro e tipo I de urina. Submetidas a exame clínico, foram consideradas aptas para tomar parte na pesquisa.

Em tôdas as experiências, cada estudante permaneceu por nove dias em dieta, sendo três dias para ajustamento e seis para a determinação do balanço nitrogenado.

As fezes foram recolhidas em H_2SO_4 a 50% e mantidas fortemente ácidas para evitar a perda de nitrogênio.

A primeira micção do dia do início da experiência foi desprezada, e foram reunidas tôdas as demais, inclusive a primeira do dia subsequente ao término da experiência. Para melhor conservação da urina, ela foi recolhida em H_2SO_4 conc.

Determinação de nitrogênio metabólico e endógeno em estudantes: o balanço nitrogenado foi determinado em duas estudantes, recebendo dietas contendo 3%, 5,8% e 10,6% de proteína, e o nitrogênio endógeno e metabólico, calculado pelo processo anteriormente citado.

2.3 - Métodos estatísticos: fizemos nas nossas experiências vários testes estatísticos, tais como, análise de variância, aplicação do método de Scheffé para julgar todos os possíveis contrastes na análise de variância, e dos métodos de Cochran e Bartlett's para a verificação da homogeneidade das amostras. Também testamos a linearidade e construímos as retas de regressão sempre que necessário, Berquó e Marques (1963).

CAPÍTULO III

EXPERIÊNCIAS

As experiências realizadas neste trabalho tiveram os seguintes objetivos:

- a) Determinar o nitrogênio metabólico e endógeno tanto em animais como em seres humanos;
- b) Comparar o valor nutritivo das diferentes fontes protéicas estudadas: fubá, milho opaco-2, caseína e carne. Este estudo foi feito em animais, por meio de observação das velocidades de crescimento ou perda de peso e capacidade de manutenção do equilíbrio nitrogenado e nas estudantes, pelo balanço nitrogenado;
- c) Comparar a capacidade de recuperação das diferentes fontes protéicas, em ratos submetidos a uma carência protéica;
- d) Comparar o comportamento do fubá e do milho comum integral em relação ao crescimento e à recuperação de ratos submetidos a uma carência protéica;
- e) Estudar o desbalanço de aminoácidos no milho comum e no opaco-2, estudando este efeito por meio de uma suplementação adequada.

Para atingir esta finalidade, realizamos as seguintes experiências:

1 - Experiências em animais

Experiência 1.1 - Esta experiência foi planejada com a finalidade de determinar o nitrogênio endógeno e metabólico em ratos. Para isso, 12 ratos foram submetidos sucessivamente a dietas contendo 3%, 6% e 9,8% de proteína, derivada da caseína. Após o término destas dietas foram submetidos a uma dieta aprotéica para determinar diretamente o nitrogênio endógeno e metabólico sem extrapolar.

Na segunda semana de tratamento com cada dieta, foram determinados os balanços nitrogenados. As dietas utilizadas foram as dietas C, D, E, G, conforme material e métodos.

Experiência 1.2 - Foi comparado o crescimento de ratos mantidos em dietas isonitrogenadas, com proteínas de diferentes fontes: milho opaco-2 (dieta A), fubá (dieta Ba), caseína (dieta C), carne (dieta F). Os ratos foram mantidos nas dietas por 28 dias. Também comparamos o crescimento de ratos alimentados com fubá (dieta Ba) e milho comum integral (dieta Bb).

Experiência 1.3 - Foi realizada para estudar o valor dos alimentos utilizados como fonte protéica, usando para isso o balanço nitrogenado. Os ratos usados nesta experiência, foram os mesmos da experiência 1.2, sendo os balanços nitrogenados realizados uma semana após o início da mesma. As dietas utilizadas foram, portanto, as da experiência 1.2, milho opaco-2 (dieta A), fubá (dieta Ba), caseína (dieta C) e carne (dieta F).

Experiência 1.4 - A capacidade de recuperação das diferentes fontes protéicas foi estudada, mantendo ratos durante 15 dias em uma dieta sem proteína (dieta G) e recuperando-os com milho opaco-2, (dieta A), fubá (dieta Ba), caseína (dieta C) e carne (dieta F).

Cada grupo era formado de 10 ratos, sendo recuperados por um período de 10 semanas. Comparamos também a capacidade de recuperação do fubá (dieta Ba) e milho comum integral (dieta Bb) em ratos submetidos a 15 dias de carência protéica.

Experiência 1.5 - A finalidade desta experiência é estudar o balanço nitrogenado em várias fases de recuperação empregando diferentes fontes protéicas: milho opaco-2 (dieta A), fubá (dieta Ba), e caseína (dieta C). Os ratos usados nesta experiên

cia, foram os mesmos da experiência 1.4, com exceção do grupo da carne, no qual não foi feito balanço nitrogenado.

Experiência 1.6 - Nesta experiência, quisemos verificar a resposta à suplementação de fubá com diferentes aminoácidos, lisina, triptofano, ácido aspártico, arginina, glicina, cistina, histidina e ácido glutâmico adicionados de maneira a atingir os respectivos valores no milho opaco-2.

O milho opaco-2 foi suplementado com leucina a fim de equiparar-se ao fubá.

Foram os seguintes as suplementações realizadas baseadas na tabela (1):

- a) - Fubá (dieta Ba) suplementado com 136 mg de lisina e 25 mg de triptofano (dieta H)
- b) - Fubá (dieta Ba) suplementado com 136 mg de lisina, 25 mg de triptofano, 133 mg de arginina, 35 mg de glicina e 140 mg de ácido aspártico (dieta I)
- c) - Fubá (dieta Ba) suplementado com 136 mg de lisina, 25 mg de triptofano, 133 mg de arginina, 35 mg de glicina, 140 mg de ácido aspártico, 27 mg de histidina, 23 mg de cistina (dieta J)
- d) - Milho opaco-2 (dieta A) suplementado com 530 mg de leucina (dieta K).

Tabela (1) - Mg de aminoácidos em 100 g das dietas: milho opaco-2 (dieta A), fubá (dieta Ba), milho comum integral (dieta Bb).

Aminoácidos	Milho opaco-2	Fubá	Milho comum int.	diferença entre	
				Milho opaco-2 e Fubá	Milho opaco-2 M.c. int.
Isoleucina	184	276	270	-92	-86
Leucina	480	1010	940	-530	-460
Lisina	288	152	167	+136	+121
Cistina	108	85	89	+23	+19
Metionina	98	125	119	-27	-21
Tirosina	219	336	330	-117	-111
Fenil alanina	260	352	295	-92	-35
Triptofano	73	48	43	+25	+30
Treonina	224	256	274	-32	-50
Valina	296	348	331	-52	-35
Histidina	176	149	160	+27	+16
Arginina	400	267	300	+133	+100
Ác. aspártico	612	472	494	+140	+118
Ác. glutâmico +					
Serina	1250	1800	1595	-550	-345
Glicina	293	258	225	+35	+68
Alanina	496	472	456	+24	+40
Prolina	477	681	608	-204	-131

2 - Experiência em estudantes

Em estudantes, foi determinado o nitrogênio endógeno e metabólico e a capacidade de manutenção do equilíbrio nitrogenado com dietas de milho comum e opaco-2, suplementados ou não, com aminoácidos.

Para avaliar o valor nutritivo de uma proteína por meio do balanço nitrogenado, resolvemos usar níveis de nitro

gênio suficientemente baixos para produzir um balanço de equilíbrio, pois, em níveis baixos, há maior sensibilidade a pequenas modificações. Também o tempo de duração da experiência deve ser suficiente para permitir a estabilização do nitrogênio eliminado.

Em face da pouca aceitação das dietas preparadas com milho integral moído, usamos para as determinações dos balanços nitrogenados, fubá. Pelos resultados obtidos no estudo dos dois milhos, vimos que eles têm composição semelhante, e que, na porcentagem de proteínas utilizada nas dietas, se comportam da mesma maneira.

Foram realizadas 8 dietas diferentes para 7 estudantes segundo o esquema que se segue:

Experiência 2.1 - Foi realizado o balanço nitrogenado em 2 estudantes recebendo cada uma 3 dietas diferentes, contendo respectivamente de proteína 3% (dieta Q), 5,8% (dieta R) e 10,6% (dieta S) com o objetivo de determinar o nitrogênio metabólico e endógeno.

As características das estudantes que tomaram parte na experiência estão tabuladas abaixo (tabela 2).

Tabela (2) - + Características das estudantes da Experiência 1.

Nome	Sexo	Idade (anos)	Pêso (kg)	Altura (m)	Sup. corporal (m ²)	Kcal/dia
M. I. B.	F	21	62,0	1,63	1,66	2600
A. P. S.	F	21	53,5	1,58	1,52	2500

Experiência 2.2 - Nesta experiência, foi estudada a capacidade de manutenção do equilíbrio nitrogenado em 5 estudantes, 3 vezes consecutivas, recebendo respectivamente dietas isonitrogenadas contendo 5,02 g/dia de N, sendo 2,90 g provenientes do milho opaco-2 (dieta M), do milho comum (dieta L) ou da carne (dieta P) e 2,12 dos alimentos restantes.

Como a dieta da carne apresentasse baixo valor calórico, acrescentamos-lhe macarrão objetivando atingir as calorias necessárias às estudantes. A dieta P continha 5,8 g de nitrogênio, sendo 0,8 fornecido pelo macarrão.

Cinco estudantes participaram desta experiência, estando suas características agrupadas na tabela (3).

Tabela (3) - Características das estudantes da experiência 2.

Nome	Sexo	Idade (anos)	Pêso	Altura (m)	Sup. cor poral (m ²)	kcal/dia
M.A.M.	F	24	43,5	1,60	1,40	2400
M.T.	F	22	41,5	1,57	1,37	2300
O.G.H.	F	19	58,7	1,58	1,60	2550
M.E.G.	F	20	62,7	1,62	1,68	2600
Z.B.	F	23	47,8	1,55	1,44	2400

Na tabela (4) colocamos a composição em aminoácidos de 240 g de fubá, 200 g de milho opaco-2, 85 g de carne que foram usados no preparo das dietas L, M e P, comparados com os requisitos diários estabelecidos por Rose (1949) e pela FAO (1965).

Tabela (4) - Composição em aminoácidos essenciais (mg) das dietas L, M, e P comparados com os requisitos estabelecidos por Rose e pela FAO.

Aminoácidos essenciais (mg)	Milho opaco-2 (200 g/dia)	Fubá (240 g/dia)	Carne (85 g/dia)	Rose	FAO
Isoleucina	554	735	725	700	1080
Leucina	1460	3060	1219	1100	1220
Lisina	870	453	1337	300	1080
Aminoácidos sulf.	638	611	598	1100	1080
cistina	326	254	192		
metionina	312	357	406		
Aminoácidos arom.	1458	2061	1202	1100	1440
fenil-alanina	792	1056	661		
tirosina	666	1005	541		
Treonina	678	525	690	500	720
Triptofano	228	148	168	250	360
Valina	888	739	753	800	950

Experiência 2.3 - Nesta experiência, foi realizado o balanço nitrogenado em 4 estudantes, recebendo cada uma 2 dietas, respectivamente de fubá e de fubá suplementado com lisina e triptofano. A suplementação do fubá comum foi feita de maneira a igualar os teores de lisina e triptofano ao do milho opaco-2, conforme tabela (5). Assim as estudantes receberam fubá suplementado com 417 mg de lisina e 80 mg de triptofano por dia. (dieta O).

Tabela (5) - Composição em aminoácidos essenciais (mg) em 200 g de milho opaco-2 e 240 g de fubá.

Aminoácidos essenciais (mg)	Milho opaco-2 (200 g)	Fubá (240 g)	Diferença entre m. opaco-2 e fubá
Isoleucina	554	735	-181
Leucina	1460	3060	-1600
Lisina	870	453	+417
Aminoácidos sulf.	638	611	+27
cistina	326	254	+72
metionina	312	357	-45
Aminoácidos arom.	1458	2061	-603
fenil-alanina	792	1056	-264
tirosina	666	1005	-339
Treonina	678	525	+153
Triptofano	228	148	+80
Valina	888	739	+149

As dietas eram isonitrogenadas contendo 5,11 g de nitrogênio por dia, sendo 2,9 g proveniente do fubá, 0,10 g do triptofano e da lisina e o restante, dos outros alimentos.

Na realização desta experiência, cooperaram 4 estudantes cujas características apresentamos na tabela (6).

Tabela (6) - Características das estudantes da experiência 3.

Nome	Sexo	Idade (anos)	Pêso (kg)	Altura (m)	Sup. corp. (m ²)	Kcal/dia
M.A.M.	F	24	44,3	1,60	1,40	2400
Z.B.	F	24	47,5	1,55	1,42	2400
M.I.B.	F	21	64,7	1,63	1,70	2600
A.P.S.	F	21	53,0	1,58	1,51	2500

Achamos melhor cada estudante ser seu próprio contrôle, por isso elas se submeteram também a uma dieta de fuba (dieta N) sem suplementação. Duas estudantes, M. A. M. e Z. B., iniciaram a experiência com o fubá sem suplementação e as duas outras, M. I. B. e A. P. S., com fubá suplementado.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Os resultados foram compilados em dois grupos:

A - Resultados das dosagens dos alimentos que compunham as dietas.

B - Resultados das experiências em animais e seres humanos.

A - RESULTADO DA ANÁLISE DOS ALIMENTOS

Nitrogênio dos alimentos: todos os alimentos usados no preparo das dietas foram dosados para nitrogênio em nosso laboratório pelo método descrito em Material e Métodos, sendo os resultados apresentados na tabela (7).

Tabela (7) - Dosagem de nitrogênio nos alimentos

Alimentos (100 g)	Nitrogênio (mg)	Proteínas (g)
Pão	1335	8,34
Tomate	153	0,95
Carne	3453	21,58
Suco de laranja	99	0,62
Alface	285	1,78
Banana	239	1,49
Maçã	204	1,27
Queijo prato	3900	24,37
Gelatina	12950	80,93
Fubá	1213	7,57
Milho comum integ.	1483	9,29
Milho opaco-2	1438	9,04
Caseína	12173	75,62

Os resultados da análise de aminoácidos do fubá, do milho comum integral e do milho opaco-2 encontram-se na tabela (8).

Tabela (8) - Composição do milho opaco-2, fubá e milho comum integral.

	M. opaco-2		Fubá		M. comum integral	
Nitrogênio (g de N. em 100 g de milho)	1.438		1.213		1.483	
Fator de conversão	6,25		6,25		6,25	
Proteína (g/100 g de milho)	9,04		7,57		9,27	
Aminoácidos	mg/100 g milho	mg/100 g proteína	mg/100 g milho	mg/100 g proteína	mg/100 g milho	mg/100 g proteína
Isoleucina	277	3,0	348	4,5	422	4,5
Leucina	730	8,1	1275	16,8	1467	15,7
Lisina	435	4,8	189	2,5	262	2,8
Fenil-alanina	396	4,4	440	5,8	460	4,9
Tirosina	333	3,7	418	5,5	516	5,5
Cistina	163	1,8	106	1,2	139	1,4
Metionina	149	1,6	156	2,0	186	2,0
Treonina	339	3,7	322	4,3	428	4,6
Triptofano	111	1,2	62	0,8	67	0,7
Valina	444	4,9	435	5,8	518	5,5
Arginina	605	6,7	334	4,4	470	5,0
Histidina	268	3,0	186	2,5	250	2,6
Ác. aspártico	931	10,3	592	7,8	772	8,3
Glicina	444	4,9	323	4,3	352	3,7
Alanina	600	6,6	592	7,8	713	7,6
Ác. glutâmico + serina	1895	21,0	2259	29,0	2419	26,2
Prolina	725	8,0	854	11,4	950	10,0

Usando os resultados da tabela (8), calculamos as quantidades de cada aminoácido essencial em mg por g de nitrogênio total (E/T). Os valores para a caseína, carne e ovo foram extraídas da FAO. OMS (1966) e FAO-NUTRITIONAL STUDIES (1970) e agrupados na tabela (9).

Tabela (9) - E/T-Relação mg de aminoácidos essenciais por g de nitrogênio total.

Aminoácidos essenciais	Padrão FAO	Caseína	Milho opaco-2	Fubá	M. comum integral	Carne	Ovo
Isoleucina	270	345	192	287	284	301	415
Leucina	306	607	505	1050	989	507	553
Lisina	270	518	302	156	176	556	403
Total Aminoácidos Arom.	360	705	505	708	617	500	627
Fenil alanina	180	334	274	362	270	275	365
Tirosina	180	371	231	346	347	225	262
Total aminoácidos sulf.	270	201	226	215	218	249	346
Cistina	126	23	113	87	93	80	149
Metionina	144	178	103	128	125	169	197
Treonina	180	297	235	265	288	287	317
Triptofano	90	106	79	51	45	70	100
Valina	270	430	303	358	349	313	454
Total de Aas. Essenciais	2016	3206	2342	3090	2966	2793	3215

Tabela (10) - A/E-Relação mg de determinado aminoácido essencial por g do total de aminoácidos essenciais.

Aminoácidos essenciais	Padrão FAO	Caseína	Milho opaco-2	Fubá	M. comum integral	Carne	Óvo
Isoleucina	134	107	82	92	95	108	129
Leucina	152	188	216	339	333	182	172
Lisina	134	161	128	50	59	200	125
Total aminoácidos aromáticos	178	219	219	230	208	187	195
Fenil alanina	89	104	119	118	92	99	114
Tirosina	89	115	100	112	116	88	81
Total aminoácidos sulfurados	133	63	91	72	73	96	107
Cistina	62	8	46	29	31	30	46
Metionina	71	55	45	41	42	66	61
Treonina	89	92	103	86	97	103	99
Triptofano	45	33	34	17	15	29	31
Valina	134	134	116	112	117	112	141

Chamaram de aminoácido limitante o que se en-
contra em maior deficit em relação ao ôvo. Na tabela (11) coloca-
mos os índices químicos segundo MITCHELL e BLOCK (1946).

Na caseína, foi considerado como aminoácido li-
mitante a metionina + cistina porque no metabolismo, a metionina
é convertida em cistina, mas o inverso não ocorre. Qualquer que
seja o deficit, o fator limitante é a metionina ou a metionina + cisti-
na.

Podemos observar que a proteína do milho opa-
co-2 contém todos os aminoácidos essenciais, com exceção da iso-
leucina e metionina, em quantidades equivalentes àquelas do ôvo.
O milho comum é deficiente em lisina, triptofano, cistina metioni-
na, valina e treonina.

B - RESULTADOS DAS EXPERIÊNCIAS EM ANIMAIS E SÊRES HUMANOS

1 - Resultados das experiências em animais:

Experiência 1.1 - Nesta experiência, foi determinado o ni-
trogênio endógeno e metabólico em ratos. Os resultados estão
apresentados na tabela (12) e correspondem à média dos valores
obtidos para os 12 ratos.

Tabela (12) - Balanço nitrogenado em ratos recebendo 3%, 6% e
9,8% de proteína (caseína).

Nitrogênio (mg/dia)	Proteína 3%	Proteína 6%	Proteína 9,8%
Ingerido	48,2	95,7	156,8
Fecal	6,2	12,1	14,7
Urinário	18,4	27,1	34,6
Absorvido	42,0	83,6	142,1
Retido	23,6	56,5	107,5
% absorvido	87,1	87,3	90,6
% retido	48,9	59,0	68,5
% valor biológico	56,1	67,5	75,6
Balanço Nitrogenado (g/dia)	0,024	0,056	0,107

Tabela (11) - Índices químicos de acordo com a definição de Mitchell e Block (1946).

Aminoácidos essenciais	Padrão FAO	Caseína	Milho opaco-2	Fubá	M. comum integral	Carne
Isoleucina	65	82	63	71	73	83
Leucina	55	109	125	197	193	105
Lisina	67	128	102	40	47	160
Total Aas. aromáticos	57	112	112	117	107	95
Fenil alanina	49	96	100	100	80	86
Tirosina	68	141	123	138	143	108
Total Aas. sulfurados	77	53	85	67	68	89
Cistina	84	17	100	63	67	65
Metionina	72	90	73	67	69	108
Treonina	56	93	104	86	98	104
Triptofano	90	88	109	54	48	88
Valina	59	95	95	82	82	79
Índice químico	55	53	63	40	47	79
Aminoácido limitante	LEUCINA	METIONINA + CISTINA	ISOLEUCINA	LISINA	LISINA	VALINA

Foi calculada a reta de regressão para N fecal em relação à proteína ingerida, sendo a equação da reta $y=3,8+0,012x$, e para N urinário, em relação à proteína ingerida, $y=12,9+0,023x$.

Por extrapolação das retas para o ponto proteí na zero, obtivemos para N metabólico 3,8 mg/dia e para N endógeno 12,9 mg/dia como podemos ver na figura (1).

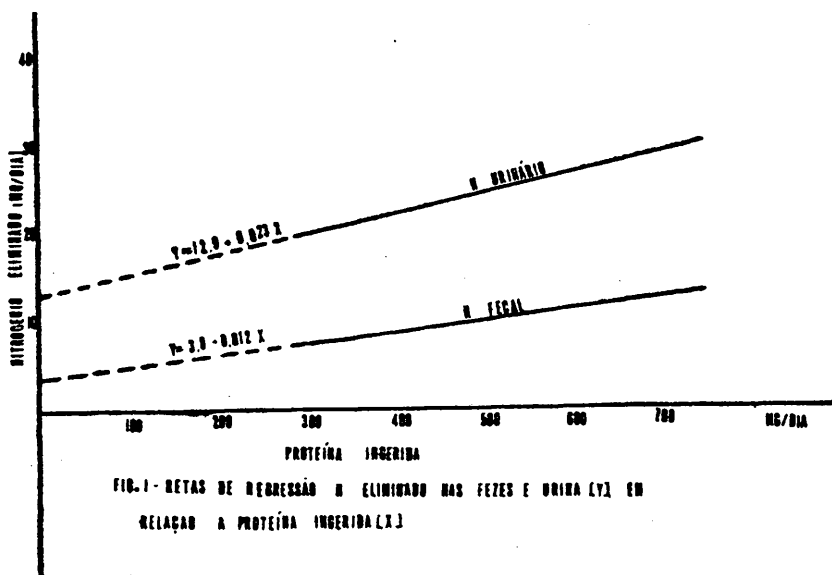


FIG. 1 - RETAS DE REGRESSÃO N ELIMINADO NAS FEZES E URINA (Y) EM RELAÇÃO A PROTEÍNA INGERIDA (X)

Como o peso médio dos ratos nesta experiência foi de 60,8 g, o nitrogênio metabólico por g/pêso, por dia, corresponde a $3,8/60,8$ ou $0,062$ mg/g pêso, e $12,9/60,8$ ou $0,21$ mg/g pêso para o N endógeno.

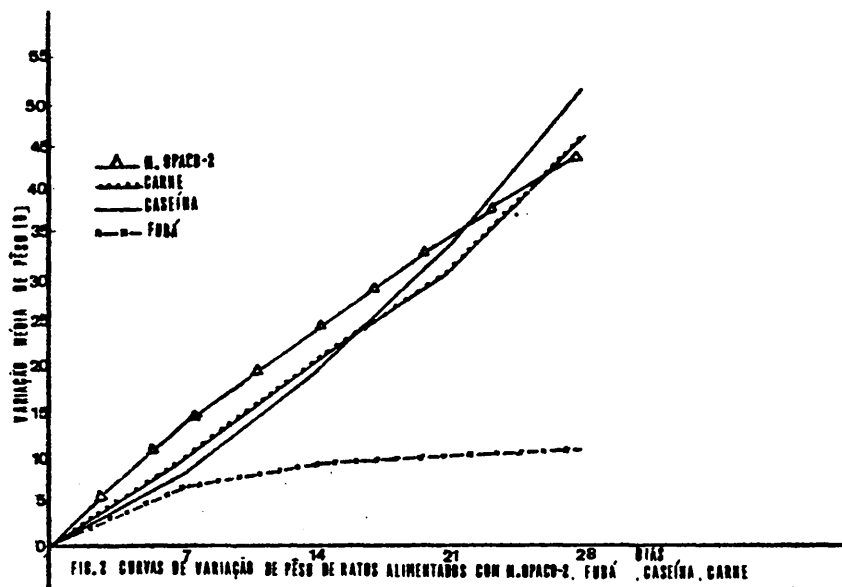
Também foi determinado o N metabólico e endógeno, alimentando um grupo de 10 ratos com uma dieta aprotéica

(dieta G). Os resultados estão na tabela (13). Como podemos ver, o N metabólico e o endógeno calculado por extrapolação são maiores que os valores obtidos em uma dieta aprotéica.

Tabela (13) - Nitrogênio urinário e fecal em uma dieta aprotéica.

Proteína	%
N ingerido	0
N fecal (metabólico)	2,53 mg/dia
N urinário (endógeno)	11,30 mg/dia

Experiência 1.2 - Foi comparada nesta experiência a variação de peso de ratos alimentados com várias fontes protéicas. Na figura (2) estão colocados os resultados da variação semanal média de peso dos ratos submetidos às diferentes dietas: milho opaco-2, fubá, caseína e carne.



Quadro (1) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	quadrado médio	Teste
Entre alimentos	13617	3	4539	F=27,6*
Dentro grupos	6739	41	164	
Total	20356	44	4703	

$$q_{3,41}=4,31$$

$$T=1671$$

$$\hat{\sigma}^2_{Cas e MO_2}=8,3$$

* significativa ao nível de 1%

$$\hat{\sigma}^2_{MO_2 e fubá}=34,0*$$

$$\hat{\sigma}^2_{carne e MO_2}=6,6$$

A análise de variância acima descrita leva-nos a concluir pela desigualdade de crescimento de ratos alimentados com milho opaco-2, fubá, caseína e carne ao nível de significância de 1%. Os contrastes, para as médias nos indicam que não há diferença de crescimento entre os ratos alimentados com caseína, carne ou milho opaco-2. Mas existe uma diferença significativa entre o crescimento dos ratos alimentados com fubá e qualquer das outras três fontes protéicas.

Foi feita a análise de linearidade e regressão, sendo que as retas obtidas representam dentro de 1% de significância a variação do peso dos ratos nos dias de observação. Baseado nos dados de crescimento dos ratos, foram calculadas e construídas as retas de regressão entre peso dos ratos e o número de dias após o início das dietas (figura 3).

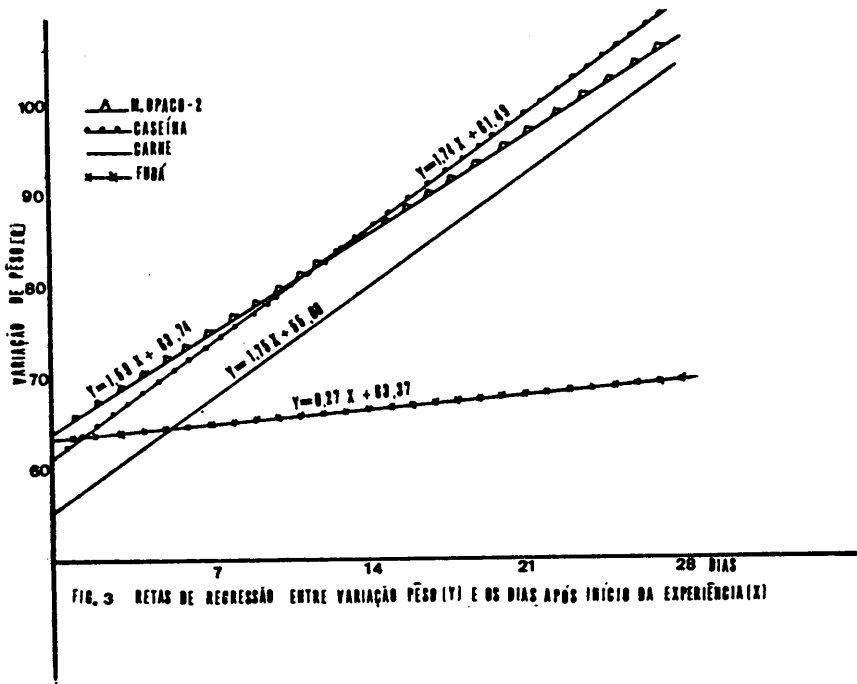


FIG. 3 RETAS DE REGRESSÃO ENTRE VARIACÃO PÊSO (Y) E OS DIAS APÓS INÍCIO DA EXPERIÊNCIA (X)

Também comparamos a variação de peso de ratos alimentados com fubá e milho comum integral. Na figura (4) te mos o crescimento semanal médio dos ratos submetidos às duas dietas.

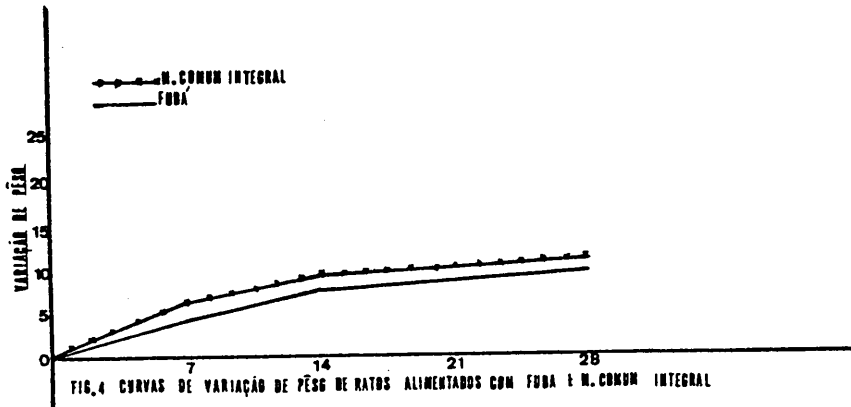


FIG. 4 CURVAS DE VARIACÃO DE PÊSO DE RATOS ALIMENTADOS COM FUBÁ E M. COMUM INTEGRAL

No quadro (2), temos os resultados da análise de variância para esta experiência.

Quadro (2) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	quadrado médio	Teste
Entre alimentos	39	1	39,0	F=6,9
Dentro grupos	101	18	5,6	
Total	106	19		

$$q_{1, 18} = 8,29$$

$$T = 188$$

A análise de variância acima descrita nos leva a concluir pela igualdade de crescimento de ratos alimentados com fubá e com milho comum integral.

Baseados nos dados de crescimento dos ratos foram calculadas as retas de regressão que se encontram na figura(5).

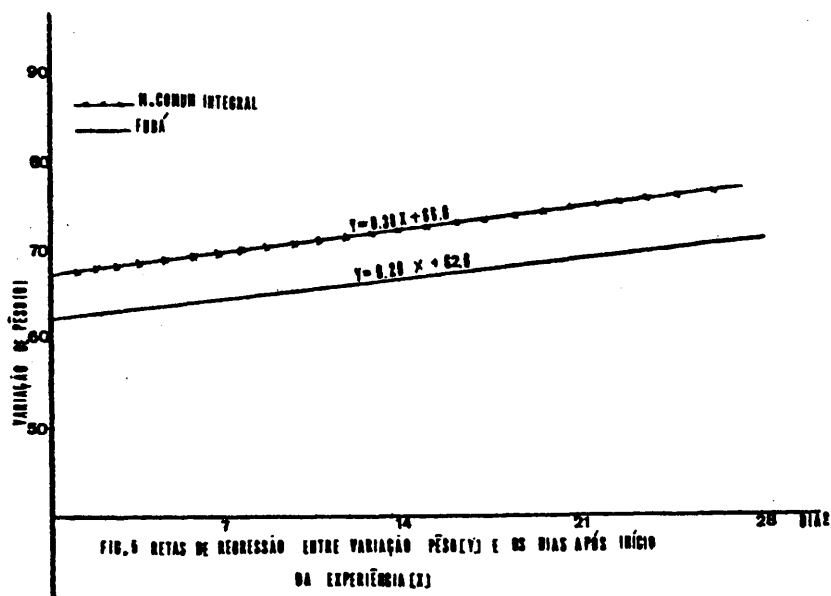
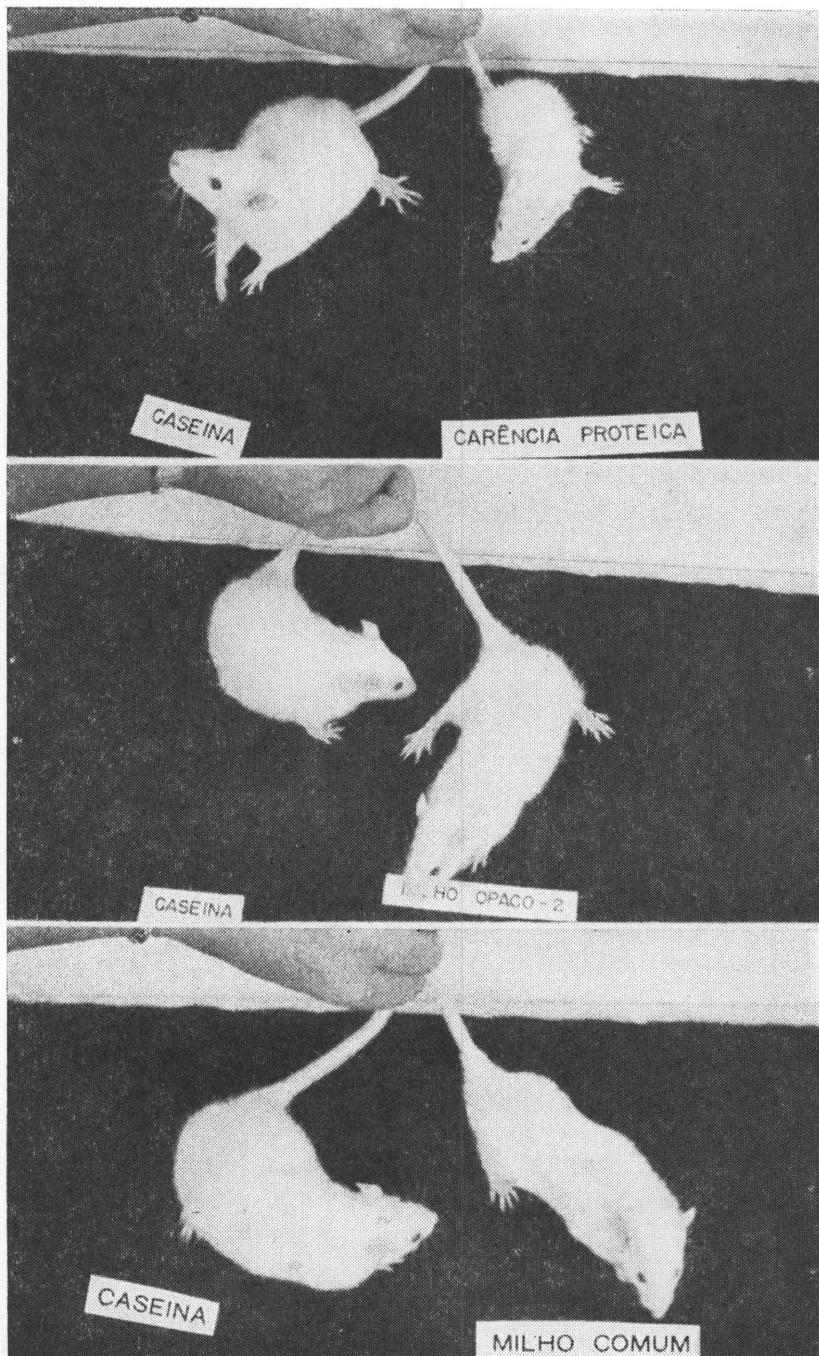


FIG. 5 RETAS DE REGRESSÃO ENTRE VARIAÇÃO PÊSO(Y) E OS DIAS APÓS INÍCIO DA EXPERIÊNCIA (X)

A comparação do aspecto dos animais nestas diferentes situações, está documentada nas fotografias (1).



Fotografia (1) - Aspecto dos ratos alimentados com milho comum, milho opaco-2 e caseina.

Segundo OSBORNE, MENDEL e FERRY (1919), a determinação da eficiência protéica pelo método do PER é simples. PER é a relação entre o aumento de peso e a proteína ingerida. BENDER e DOELL (1957) criticaram o método dizendo que ele não leva em consideração a proteína necessária para a manutenção do animal e a variação do PER com a quantidade de alimento ingerido. O PER é função da variação de peso e não característica de uma proteína. Assim, a precisão é a mesma se usamos somente o ganho em peso ou o PER. BENDER e DOELL propuseram o uso do NPR para comprovar o valor de uma proteína. NPR (net protein ratio) é o quociente da diferença algébrica entre a variação de peso dos ratos alimentados com a proteína a ser testada e com uma dieta aprotéica e a proteína ingerida.

Na tabela (14), colocamos o PER e o NPR calculado para o grupo de ratos que foi submetido à dieta de milho opaco-2. O NPR leva em consideração a proteína usada para a manutenção do animal, e seus valores são mais constantes do que para o PER. Podemos verificar na tabela (14) que o PER variou de 1,5 a 3,1 enquanto que o NPR permaneceu entre 3,5 e 3,8 para todos os ratos.

Tabela (14) - Determinação do PER e NPR para a proteína do milho opaco-2.

Rato	Varição de peso dieta milho opaco-2 (g)	Varição de peso dieta aprotéica (g)	Proteína ingerida (g)	PER	NPR
1	74	-12	24,3	3,0	3,5
2	78	-12	25,2	3,1	3,5
3	31	-18	13,2	2,3	3,7
4	36	-19	14,6	2,4	3,7
5	46	-17	17,3	2,6	3,6
6	62	-22	21,6	2,9	3,8
7	16	-22	10,2	1,5	3,7
8	27	-19	11,9	2,2	3,8
9	33	-18	13,8	2,4	3,7
10	36	-18	14,2	2,5	3,7
11	39	-17	15,0	2,6	3,7
12	35	-19	14,3	2,4	3,7
Média	43	-18	16,1	2,5	3,6

O valor do NPR, em 28 dias, para milho opaco-2 e carne, mostra que os valores destes dois são aproximadamente equivalentes em relação à proteína requerida para o crescimento do rato.

Na tabela (15), apresentamos o PER e o NPR para as diferentes fontes protéicas.

Tabela (15) - PER e NPR para caseína, carne, milho opaco-2, fubá e milho comum integral.

Fonte protéica	Aumento médio peso (g/28 dias)	PER	NPR
Caseína	51,0	2,8	4,0
Carne	45,9	2,5	3,5
Milho opaco-2	43,9	2,5	3,6
Fubá	10,8	0,7	2,1
M. comum integral	11,9	1,1	2,3

Experiência 1.3 - Nesta experiência, estudamos a retenção de nitrogênio em ratos alimentados com milho opaco-2, caseína, carne e fubá.

Foi calculado o balanço nitrogenado aparente e o real. Entende-se por balanço nitrogenado aparente a diferença entre o nitrogênio ingerido e o eliminado por dia. No balanço nitrogenado real, descontamos do nitrogênio eliminado o endógeno e o metabólico. Na tabela (16), estão os dados usados na determinação dos balanços nitrogenados aparentes.

Tabela (16) - Balanço nitrogenado médio aparente em ratos alimentados com milho opaco-2, fubá, carne e caseína.

Nitrogênio (mg/dia)	Caseína	Carne	Milho opaco-2	Fubá
Ingerido	95,6	110,6	99,4	76,4
Fecal	14,0	12,5	22,9	17,4
Urinarío	27,1	23,1	22,1	23,5
Absorvido	81,6	98,3	76,5	59,0
Retido	55,5	75,2	54,4	35,5
% absorvido	85,3	88,8	76,9	77,2
% retido	58,0	68,0	54,7	46,4
V. biológico	68,0	76,0	71,0	60,0
Balanço nitrogenado (g/dia)	0,055	0,075	0,054	0,036

Com os dados obtidos na experiência 3, fizemos a análise de variância cujos resultados estão no quadro (3).

Quadro (3) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste
Entre alimentos	9950	3	3316	F=30,9*
Dentro grupos	4841	45	107	
Total	14791	48		

$$q_{3,45} = 4,22$$

$$T=2685$$

$$\hat{\sigma}^2 \text{ Cas e MO}_2 = 1,0$$

$$\hat{\sigma}^2 \text{ MO}_2 \text{ e fubá} = 17,0^*$$

$$\hat{\sigma}^2 \text{ carne e MO}_2 = 21,0^*$$

* significativo ao nível de 1%

$$\hat{\sigma}^2 \text{ carne e fubá} = 40,0^*$$

Os contrastes para os balanços nitrogenados aparentes, pelo método de Scheffé, indicam que a retenção de nitrogênio com a dieta de carne é superior àquela apresentada pelo milho opaco-2 ou pela caseína; que a do milho opaco-2 é igual à da caseína, e a do milho opaco-2 e caseína são maiores que a do fubá.

Na tabela (17), temos os balanços nitrogenados reais. Para calcular o balanço nitrogenado real, usamos o nitrogênio metabólico que, como vimos, é 0,062 mg/g pêso e o nitrogênio

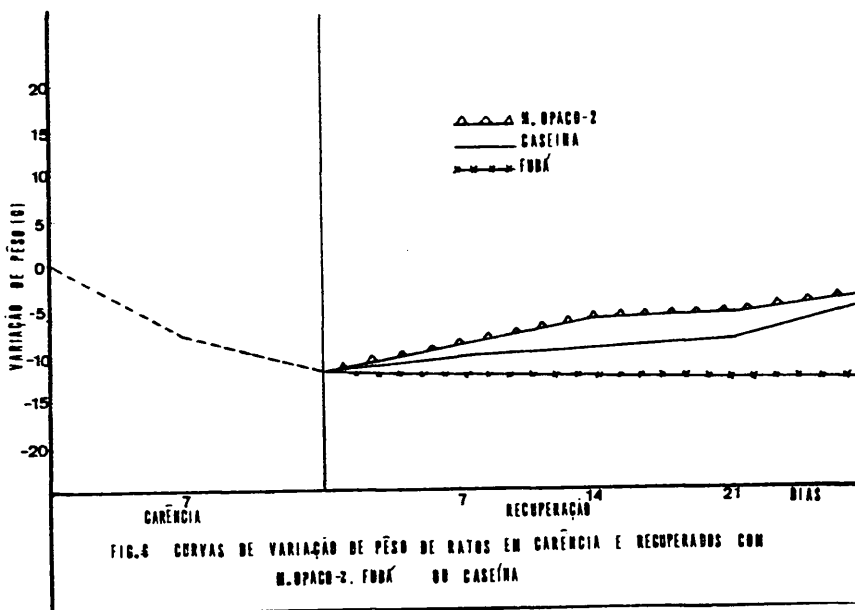
nio endógeno 0,21 mg/g pêso. O pêso médio dos ratos do grupo da caseína foi de 65 g, do fubá 63 g, da carne 60 g e do milho opaco-2 68 g. Assim o nitrogênio metabólico médio para os ratos do grupo da caseína é $65 \times 0,062$ ou 4,0 g e o endógeno $65 \times 0,21$ ou 13,6 g.

Tabela (17) - Balanço nitrogenado médio real em ratos alimentados com milho opaco-2, fubá, caseína e carne.

Nitrogênio (mg/dia)	Caseína	Carne	Milho opaco-2	Fubá
Ingerido	95,6	110,8	99,4	76,4
Fecal	16,1	12,5	22,9	17,4
Metabólico	4,0	3,9	4,2	3,8
Urinário	27,1	23,1	22,1	23,5
Endógeno	13,6	12,6	14,2	13,3
Absorvido	83,5	102,7	80,7	62,8
Retido	70,0	91,7	72,8	49,6
% absorvido - Coef. dig.	87,3	92,6	81,2	82,2
% retido	72,8	87,2	73,2	64,9
Valor biológico	84,0	81,0	88,0	78,0
Balanço nitrogenado (g/dia)	0,070	0,092	0,073	0,049

Experiência 1.4 - Esta experiência foi realizada para estudar a capacidade de recuperação de diferentes fontes protéicas após 2 semanas de carência protéica.

Na figura (6), estão traçadas as curvas de recuperação em um período de 28 dias, embora a recuperação tenha continuado até 10 semanas, como podemos ver na figura (12) onde foram colcados todos os resultados dos trabalhos feitos com ratos.



Para melhor analisar as diferenças de recuperação com as várias fontes protéicas, submetemos as variações de pêso a uma análise de variância cujos resultados se encontram no quadro (4).

Quadro (4) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste
Entre alimentos	1169	2	584	F=12,42 *
Dentro grupos	1292	27	47	
Total	2461	29		

$q_{2,27} = 5,49$

T=847

$\hat{\Theta}$ MO₂ e fubá = 15,0 *

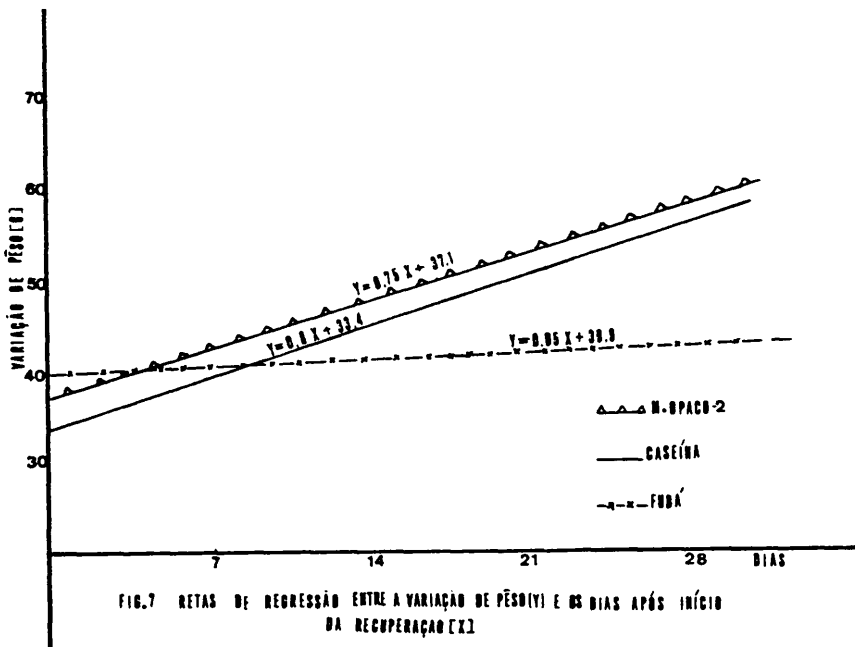
$\hat{\Theta}$ Cas. e MO₂ = 4,8

$\hat{\Theta}$ Cas. e fubá = 10,2 *

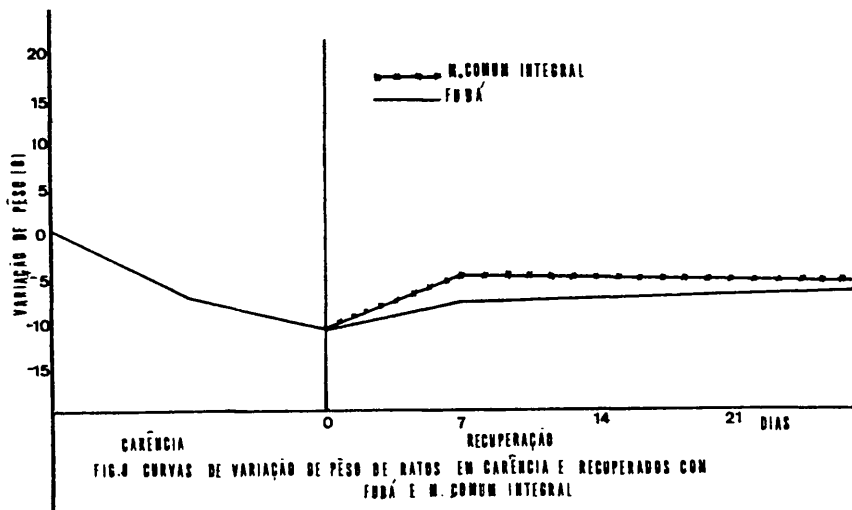
* significante ao nível de 1%

Os contrastes para as variações de crescimento mostraram que a recuperação com fubá é inferior do que com milho opaco opaco-2 ou caseína, não havendo diferença entre a recuperação com milho opaco-2 ou caseína ao nível de significância de 1%.

Foram calculadas as retas de regressão entre a variação de pêso dos ratos alimentados com as diferentes fontes protéicas e os dias após o início das dietas. Na figura (7), apresentamos as retas de regressão.



Nesta experiência, comparamos também a capacidade de recuperação do fubá e do milho comum integral, em 20 ratos mantidos durante 15 dias em uma dieta aprotéica. Na figura (8), temos o crescimento semanal médio dos ratos recuperados com as duas dietas.



Quadro (5) - Análise de variância

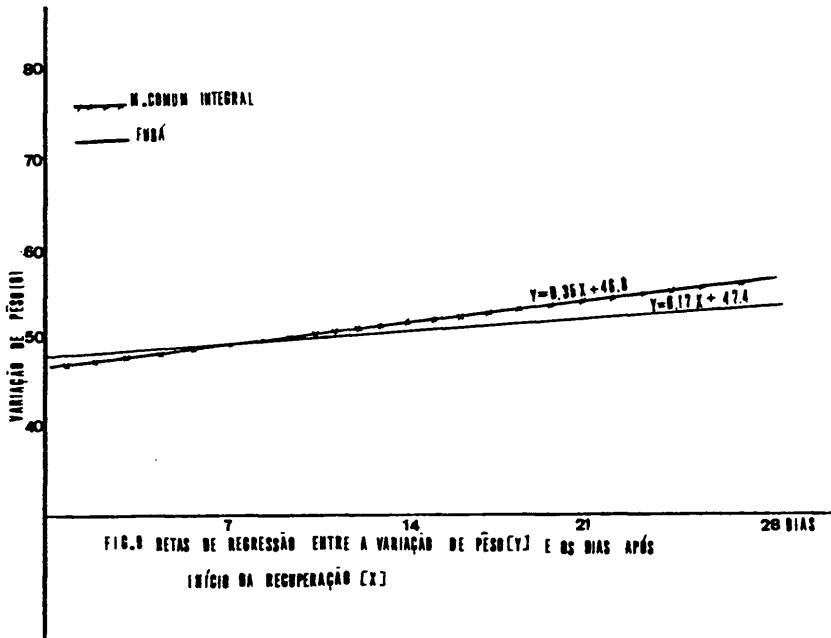
Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste
Entre alimentos	29	1	29	F = 2, 6
Dentro grupos	200	18	11	
Total	229	19		

q 1, 18 = 8, 3

T=92

A análise de variância acima descrita levou-nos a concluir pela igualdade de crescimento dos ratos recuperados com fubá integral para o nível de significância de 1%.

Na figura (9), temos as retas de regressão entre a variação de pêsos de ratos recuperados com fubá e milho comum integral e os dias após o início da recuperação.



Experiência 1.5 - Tôdas as experiências de recuperação relativas a balanço nitrogenado foram realizadas em duas fases: a primeira, 5 dias e a segunda, 21 dias após o início da recuperação, colhendo-se material durante 7 dias. Apenas o grupo do milho opaco-2 teve seu balanço nitrogenado determinado em uma terceira fase: 43 dias após o início da recuperação, quatro ratos que pesavam em média 75 g-a mesma média de pêsos de ratos contrôles alimentados com milho opaco-2 na experiência 3 - tiveram seus balanços nitrogenados realizados. Devido à grande mortalidade nos grupos alimentados com caseína e fubá, não foram feitos os respectivos balanços nitrogenados.

Na tabela (18) temos os balanços nitrogenados aparentes na recuperação.

Tabela (18) - Balanço nitrogenado aparente em ratos recuperados com milho opaco-2, fubá e caseína, cinco dias após o início da recuperação.

Nitrogênio (mg/dia)	Milho opaco-2	Fubá	Caseína
Ingerido	50,6	42,7	46,2
Fecal	13,6	16,5	7,8
Urinarío	18,2	16,6	15,8
Absorvido	37,0	26,2	38,4
Retido	18,8	9,6	22,6
% absorvido	73,1	61,0	83,0
% retido	37,1	22,0	49,0
Balanço nitrogenado (g/dia)	0,019	0,010	0,023

Quadro (6) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste
Entre alimentos	799	2	399	F=8,5 *
Dentro grupos	938	20	47	
Total	1737	22		

$$q_{2,20} = 5,85$$

$$T=390$$

$$\hat{C} \text{ MO}_2 \text{ e fubá} = 9,1 *$$

$$\hat{C} \text{ Cas. e fubá} = 14,0 *$$

$$\hat{C} \text{ Cas. e MO}_2 = 4,9$$

* significativo ao nível de 1%

Os contrastes para as médias dos balanços nitrogenados na recuperação, pelo método de Scheffé, indicam que não há diferença entre os balanços nitrogenados para caseína e milho opaco-2.

Tabela (19) - Balanço nitrogenado aparente em ratos recuperados com milho opaco-2.

Nitrogênio	Dias após início da recuperação		
	5	21 (*)	43 (**)
Ingerido	50,6	55,5	66,2
Fecal	13,6	13,3	17,2
Urinarário	18,2	13,6	20,1
Absorvido	37,0	42,2	49,0
Retido	18,8	28,6	28,9
% absorvido	73,1	76,0	74,0
% retido	37,1	51,5	43,6
Balanço nitrogenado (g/dia)	0,019	0,029	0,029

(*) - Mortalidade - 8%

(**) - Mortalidade - 17%

Quadro (7) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste
Entre fases	440,37	2	220,18	F = 4,98
Dentro grupos	751,55	17	44,2	
Total	2246	19		

$Q_{2,17} = 6,11$

T=491

$\hat{C} \text{ 1}^{\text{a}} \text{ fase e 2}^{\text{a}} \text{ fase} = 10,0$

$\hat{C} \text{ 2}^{\text{a}} \text{ fase e 3}^{\text{a}} \text{ fase} = 0,1$

A análise de variância levou-nos a concluir pela igualdade dos balanços nitrogenados nas 3 fases de recuperação com milho opaco-2.

Tabela (20) - Balanço nitrogenado em ratos recuperados após 2 semanas de carência, com milho opaco-2.

Nitrogênio (mg/dia)	Dias após início da recuperação		
	5	21	43
Ingerido	50,6	55,5	66,2
Fecal	13,6	13,3	17,2
Metabólico	2,5	3,2	4,8
Urinário	18,2	13,6	20,1
Endógeno	9,5	11,4	16,8
Absorvido	39,5	45,5	53,8
Retido	30,8	43,2	50,5
% absorvido	77,0	81,0	81,0
% retido	60,0	78,0	77,0
Balanço nitrogenado (g/dia)	0,031	0,043	0,050

Tabela (21) - Balanço nitrogenado aparente de ratos recuperados com caseína, após 2 semanas de carência protéica.

Nitrogênio (mg/dia)	Dias após início da recuperação	
	5	21 (*)
Ingerido	46,2	54,5
Fecal	7,8	7,5
Urinarío	15,8	16,0
Absorvido	38,4	47,0
Retido	22,6	31,0
% absorvido	83,0	86,0
% retido	49,0	56,0
Balanço nitrogenado (g/dia)	0,023	0,031

(*) Mortalidade - 19%

Quadro (8) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste
Entre fases	235,34	1	235,34	F = 3,59
Dentro fases	785,16	12	65,43	
Total	1020,50	13		

$$q_{1,12} = 9,33$$

$$T = 376,6$$

$$\hat{\sigma} = 8,0$$

A análise de variância nos levou a concluir pela igualdade dos balanços nitrogenados nas duas fases de recuperação ao nível de significância de 1%.

Tabela (22) - Balanço nitrogenado real em ratos recuperados com caseína, após duas semanas de carência protéica.

Nitrogênio (mg/dia)	Dias após início da recuperação	
	5	21
Ingerido	46,2	54,5
Fecal	7,8	7,5
Metabólico	2,3	3,0
Urinário	15,8	16,0
Endógeno	8,1	10,5
Absorvido	40,7	50,0
Retido	33,0	44,5
% absorvido	88,0	90,0
% retido	71,0	81,0
Balanço nitrogenado (g/dia)	0,033	0,044

Tabela (23) - Balanço nitrogenado aparente em ratos recuperados com fubá, após duas semanas de carência protéica.

Nitrogênio (mg/dia)	Dias após início da recuperação	
	5	21 (*)
Ingerido	42,7	31,2
Fecal	16,5	7,6
Urinário	16,6	15,7
Absorvido	26,2	23,6
Retido	9,6	7,9
% absorvido	61,3	75,6
% retido	22,4	25,3
Balanço nitrogenado (g/dia)	0,010	0,008

(*) Mortalidade - 26%

Quadro (9) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste
Entre fases	11,60	1	11,60	F = 0,31
Dentro grupos	415,63	14	36,83	
Total	427,23	15		

$$q_{1,14} = 8,86$$

$$T = 142,8$$

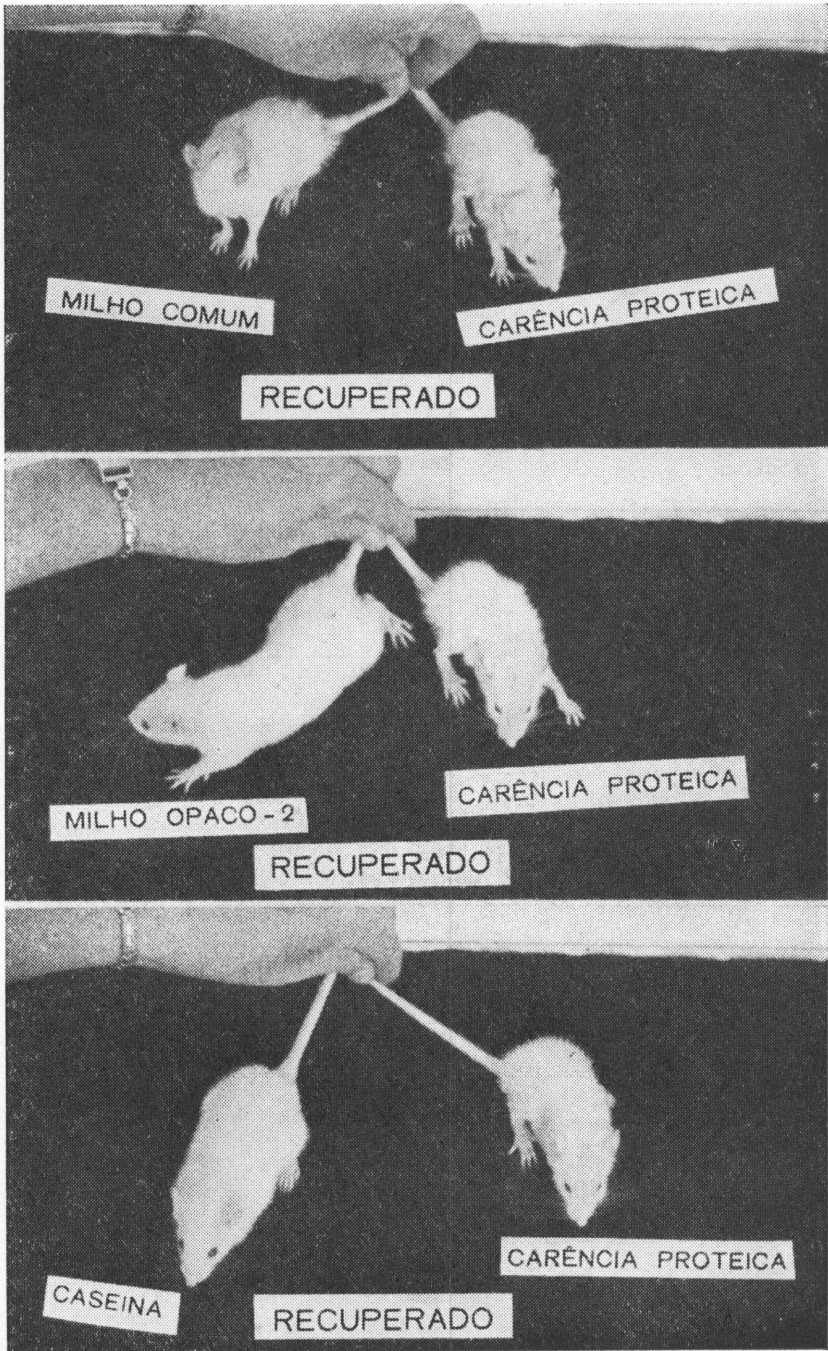
Pela análise de variância, concluímos que não há diferença significativa, no nível de significância de 1%, para as duas fases de recuperação.

Tabela (24) - Balanço nitrogenado real de ratos recuperados com fubá, após duas semanas de carência protéica.

Nitrogênio (mg/dia)	Dias após início da recuperação	
	5	21 (*)
Ingerido	42,7	31,2
Fecal	16,5	7,6
Metabólico	3,1	2,8
Urinário	16,6	15,7
Endógeno	9,0	8,3
Absorvido	29,3	26,4
Retido	21,7	19,0
% absorvido	68,0	84,0
% retido	50,0	60,0
Balanço nitrogenado (g/dia)	0,022	0,019

(*) Mortalidade - 26%

O aspecto dos animais em recuperação com as diferentes fontes protéicas é apresentado nas fotografias (2).



Fotografia (2) - Aspecto dos ratos recuperados com caseína, milho comum e milho opaco-2

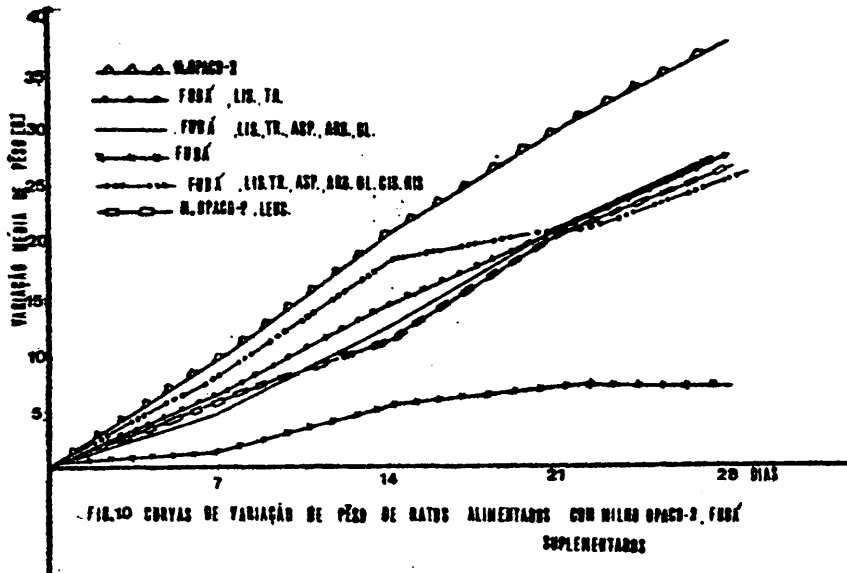
Experiência 1.6 - Nesta experiência, estudamos o desbalanço de aminoácidos do milho comum pela suplementação adequada.

A tabela (25) mostra o efeito da suplementação do fubá e do milho opaco-2 no crescimento de ratos.

Tabela (25) - Variação média de peso em ratos, recebendo fubá e milho opaco-2 suplementados com aminoácidos.

	Variação de peso (g) em 28 dias	
	fubá	Milho opaco-2
Sem suplementação	7,0	37,9
Suplementado com lisina e triptofano	27,2	-
Suplementado com lisina, triptofano, aspártico, arginina e glicina	27,2	-
Suplementado com lisina, triptofano, histidina, aspártico, glicina, cistina, ácido glutâmico	23,9	-
Suplementado com leucina		25,9

Na figura (10) temos o crescimento médio semanal de ratos alimentados com dietas suplementadas com aminoácidos.



Quadro (10) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste
Entre alimentos	4996	5	999,0	F = 28,9*
Dentro grupos	1865	54	34,5	
Total	6861	59		

$q_{5,54} = 3,40$

T = 1493

$\hat{\sigma}^{2} MO_2$ e fubá = 30,8*

$\hat{\sigma}^{2} MO_2$ e fubá (1) = 10,7*

$\hat{\sigma}^{2} MO_2$ e fubá (2) = 10,7*

$\hat{\sigma}^{2} MO_2$ e fubá (3) = 14,1*

$\hat{\sigma}^{2} MO_2$ e $MO_2(L)$ = 12,0*

* significativa ao nível de 1%

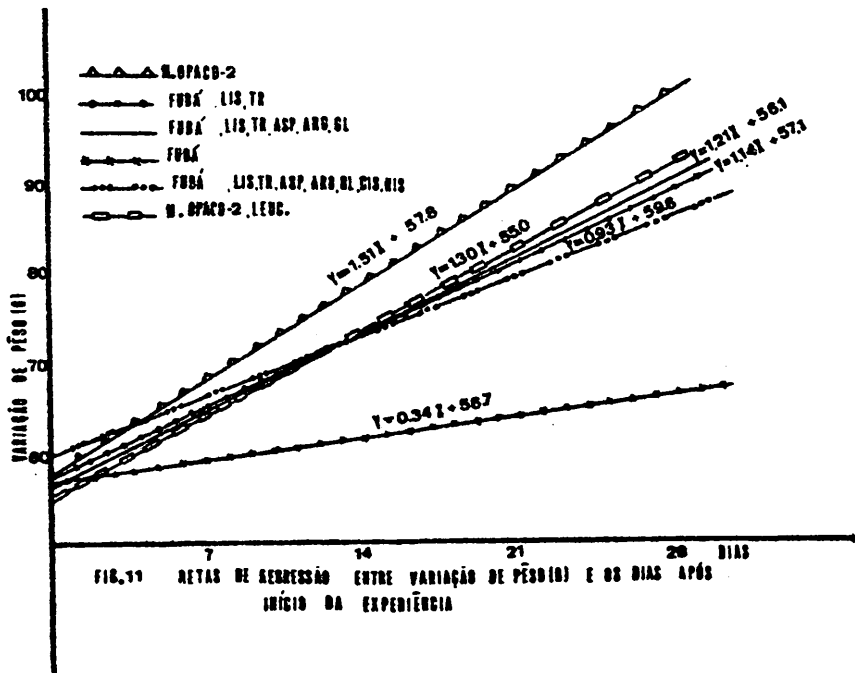
Nota - fubá (1) é fubá + (lisina e triptofano)

fubá (2) é fubá + (lisina, triptofano, ácido aspártico, arginina e glicina)

fubá (3) é fubá + (lisina, triptofano, ácido aspártico, arginina, glicina, cistina e histidina)

MO₂ (L) é milho opaco-2 + (leucina)

Os contrastes indicam que a variação de pêso de ratos alimentados com milho opaco-2 é superior àquelas apresentadas em qualquer dos tipos de suplementação.



Com o intuito de facilitar a interpretação desta parte do trabalho, na figura (12), resumimos todos os resultados médios das experiências realizadas em ratos.

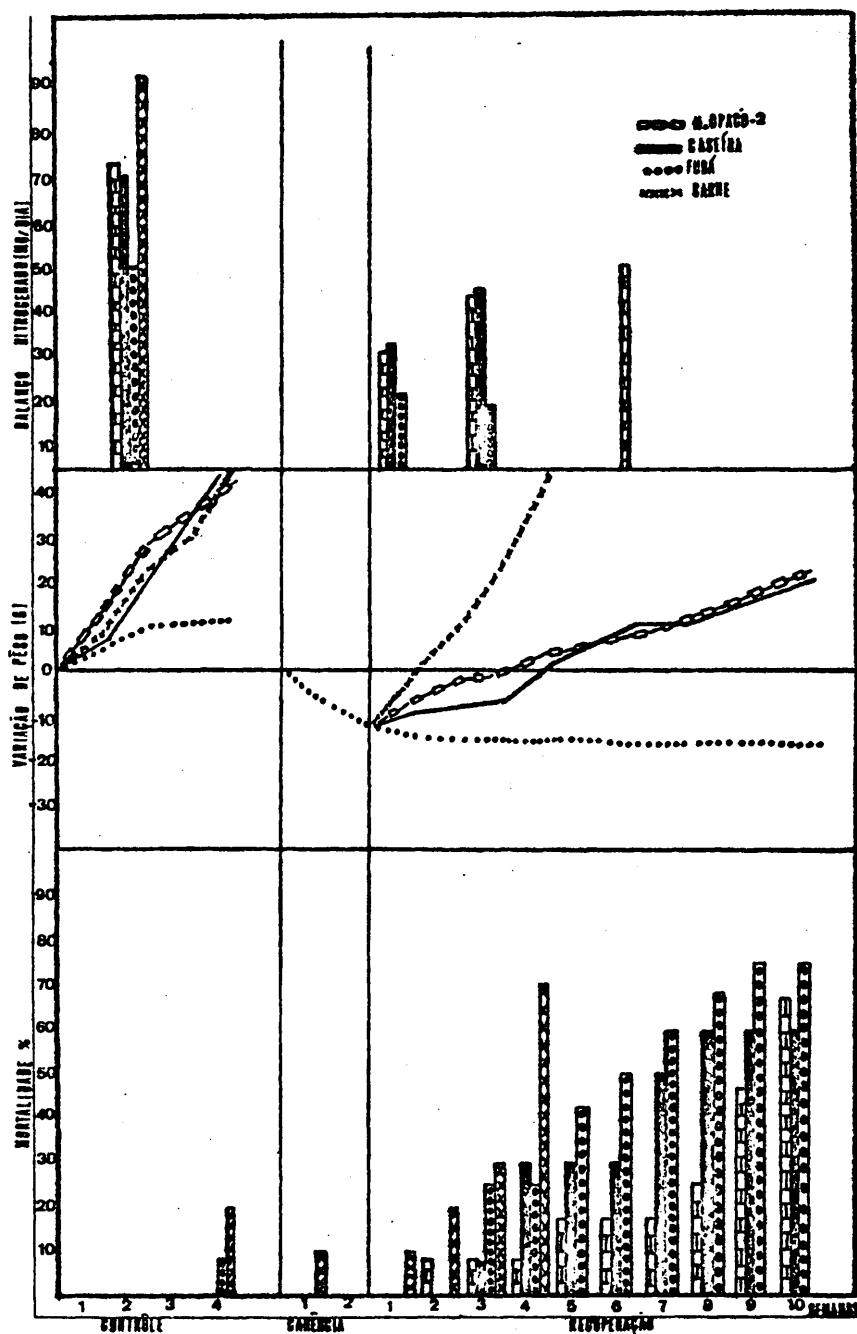


FIG. 12 - RESULTADOS DAS EXPERIÊNCIAS REALIZADAS EM OVINOS

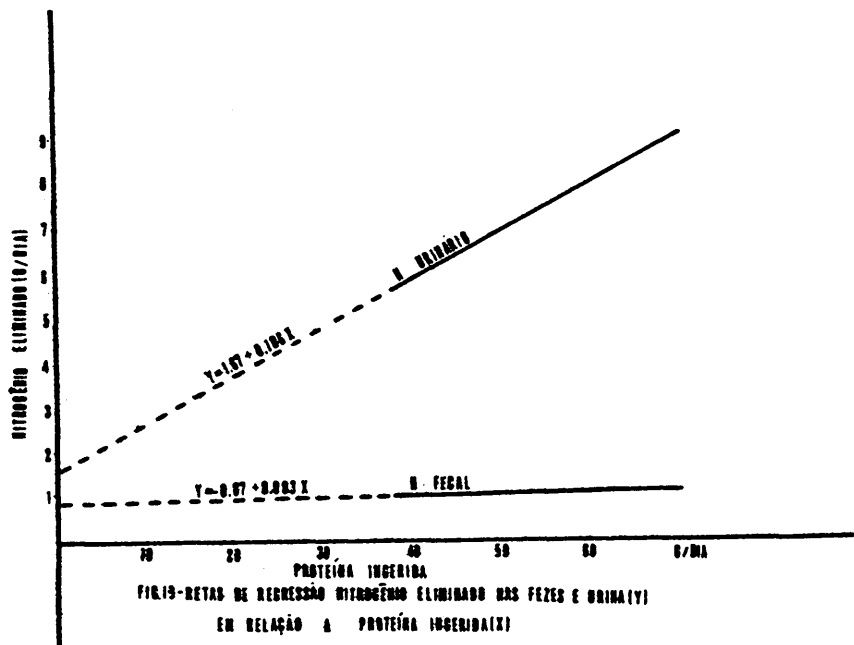
2 - Resultados das experiências em estudantes:

Experiência 2.1 - Cálculo do nitrogênio metabólico e endógeno. Os valores tabelados na tabela (26) são as médias dos valores obtidos no balanço nitrogenado das estudantes.

Tabela (26) - Balanço nitrogenado médio de estudantes, recebendo dietas contendo 3%, 5,8% e 10,6% de proteína.

% Proteína	Nitrogênio ingerido (g)	Nitrogênio urinário (g)	N. fecal (g)	Bal. N. (g)
3,0	5,99	5,51	0,97	-0,49
5,8	11,21	9,59	1,15	0,47
10,6	21,15	15,70	1,30	4,15

A reta de regressão para N fecal, em relação à proteína ingerida, é $y = 0,87 + 0,003x$. Traçada a reta e extrapolada para o ponto proteína zero, obtivemos para N metabólico, o valor de 0,87 g/dia. Para N urinário, em relação à proteína ingerida, a reta de regressão é $y = 1,67 + 0,106x$. Traçando a reta e extrapolando para proteína zero, obtivemos para N endógeno 1,67 g/dia, conforme podemos ver na figura (13).



Como o pêso médio das estudantes que participaram da experiência (1) era de 57 kg, determinamos o nitrogênio metabólico e endógeno por kg de pêso. O nitrogênio metabólico sendo 0,87 g/dia corresponde a 0,87/57, ou 0,015 g/kg pêso. O nitrogênio endógeno é 1,67/57 ou 0,029 g/kg pêso.

Experiência 2.2 - Com os dados obtidos nesta experiência, calculamos o balanço nitrogenado aparente e real, pelo mesmo método usado para os ratos. Na tabela (27), apresentamos os resultados dos balanços nitrogenados aparentes em estudantes.

Tabela (27) - Balanço nitrogenado aparente das estudantes alimentadas com milho opaco-2 (dieta N), fubá (dieta L) e carne (dieta D).

Alimento	Nome	Nitrogênio ingerido	N. eliminado		Balanço nitrogenado (g/dia)
			fezes	urina	
M. opaco-2	M.T.	5,02	1,31	4,01	-0,30
	O.G.H.	5,02	1,48	3,56	-0,02
	M.A.M.	5,02	1,43	3,27	0,32
	M.E.G.	5,02	1,47	4,16	-0,61
	Z.B.	5,02	1,63	3,46	-0,07
Média		5,02	1,46	3,69	-0,13
Fubá	M.T.	5,02	0,90	4,56	-0,44
	O.G.H.	5,02	0,99	4,40	-0,37
	M.A.M.	5,02	0,86	4,37	-0,21
	M.E.G.	5,02	1,05	4,86	-0,89
	Z.B.	5,02	1,27	4,52	-0,77
Média		5,02	1,01	4,54	-0,53
Carne + Macarrão	M.T.	5,80	0,89	5,75	-0,84
	O.G.H.	5,80	0,90	5,60	-0,70
	M.A.M.	5,80	0,81	5,55	-0,56
	M.E.H.	5,80	0,99	5,41	-0,60
	Z.B.	5,80	0,94	5,50	-0,64
Média		5,80	0,90	5,56	-0,66

Segundo SWENSEID e col. (1956), consideramos um balanço nitrogenado não em equilíbrio, quando o nitrogênio eliminado é superior a 5% do ingerido. De acordo com este critério, na experiência com milho opaco-2 (5,02 g/dia de N.), qualquer perda de N. maior que 0,25 g indicaria um desequilíbrio nitrogenado. Assim, as estudantes M.T. e M.E.G. não alcançaram o equilíbrio nitrogenado com 200 g de milho opaco-2.

Na experiência com fubá, só a estudante M.A.M. atingiu o equilíbrio o que não aconteceu na experiência com carne, onde nenhuma estudante conseguiu o equilíbrio.

Quadro (11) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste
Entre alimentos	0,76	2	0,38	F = 5,5*
Dentro grupos	0,83	12	0,07	
Total	1,59	14		

$$q_{2,12} = 5,10$$

$$T = 6,7$$

$$\hat{\Theta} \text{ MO}_2 \text{ e fubá} = 0,40^*$$

$$\hat{\Theta} \text{ Carne e fubá} = 0,13$$

$$\hat{\Theta} \text{ MO}_2 \text{ e carne} = 0,53^*$$

* significativa ao nível de 2,5%

Entre os balanços nitrogenados aparentes estudados, apenas os dos grupos de estudantes alimentadas com carne e fubá não apresentam diferença significativa.

Calculamos o balanço nitrogenado real usando, como já vimos, o nitrogênio endógeno e metabólico que correspondem respectivamente a 0,023 g/kg peso e 0,014 g/kg peso. Assim, a estudante M.T. pesando 41,5 kg conforme tabela (3) tem um nitrogênio metabólico $41,5 \times 0,015$ ou 0,63 g/dia, e um nitrogênio endógeno $41,5 \times 0,029$ ou 1,21 g/dia. Os resultados são encontrados na tabela (28).

Tabela (28) - Balanço nitrogenado real das estudantes alimentadas com milho opaco-2, fubá e carne.

Alimento	Nome	N. inger. (g)	N. eliminado				Balanço N.
			metab.	fecal	end.	urin.	
M. opaco-2	M.T.	5,02	0,63	1,31	1,21	4,01	1,54
	O.G.H.	5,02	0,89	1,48	1,71	3,56	2,64
	M.A.M.	5,02	0,66	1,43	1,27	3,27	2,25
	M.E.G.	5,02	0,95	1,47	1,83	4,16	2,17
	Z.B.	5,02	0,72	1,63	1,39	3,46	2,04
Média		5,02	0,77	1,46	1,48	3,69	2,12
Fubá	M.T.	5,02	0,63	0,90	1,21	4,56	1,40
	O.G.H.	5,02	0,89	0,99	1,71	4,40	2,23
	M.A.M.	5,02	0,66	0,86	1,27	4,37	1,72
	M.E.G.	5,02	0,95	1,05	1,83	4,86	1,89
	Z.B.	5,02	0,72	1,27	1,39	4,52	1,34
Média		5,02	0,77	1,01	1,48	4,54	1,72
Carne	M.T.	5,80	0,63	0,89	1,21	5,75	1,00
	O.G.H.	5,80	0,89	0,90	1,71	5,60	1,90
	M.A.M.	5,80	0,66	0,81	1,27	5,55	1,37
	M.E.G.	5,80	0,95	0,99	1,83	5,41	2,18
	Z.B.	5,80	0,77	0,90	1,48	5,56	1,58
Média		5,80	0,77	0,90	1,48	5,56	1,58

Fizemos também a análise de variância para os balanços nitrogenados reais, cujos resultados se acham no quadro (12).

Quadro (12) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste
Entre alimentos	0,79	2	0,39	F=2,23
Dentro grupos	2,08	12	0,17	
Total	2,87	14		

$$q_{2,12} = 5,10$$

$$T = 27,20$$

$$\hat{\sigma}^2_{MO_2 \text{ e fubá}} = 0,40$$

$$\hat{\sigma}^2_{MO_2 \text{ e carne}} = 0,54$$

$$\hat{\sigma}^2_{\text{fubá e carne}} = 0,14$$

A análise de variância levou-nos a concluir pela igualdade dos balanços nitrogenados reais ao nível de 2,5%.

Experiência 2.3 - Nesta experiência, comparamos os balanços nitrogenados de estudantes alimentadas com fubá sem suplementação (dieta N) e com suplementação de aminoácidos (dieta O).

Tabela (29) - Balanço nitrogenado aparente em estudantes alimentados com fubá (período controle, sem suplementação).

Nome	Nitrogênio (g/dia)		Nitrogênio ingerido (g/dia)	Balanço nitrogenado (g/dia)
	fezes	urina		
M.A.M.	0,96	3,63	5,11	0,52
Z.B.	1,26	4,10	5,11	-0,25
A.P.S.	0,84	4,34	5,11	-0,07
M.I.B.	1,47	6,22	5,11	-2,58
Média	1,13	4,57	5,11	-0,59

Tabela (30) - Balanço nitrogenado aparente em estudantes alimentados com fubá suplementado com lisina e triptofano.

Nome	Nitrogênio (g/dia)		Nitrogênio ingerido (g/dia)	Balanço nitrogenado (g/dia)
	fezes	urina		
M.A.M.	1,19	3,46	5,11	0,46
Z.B.	1,53	3,68	5,11	-0,10
A.P.S.	0,86	3,33	5,11	0,92
M.I.B.	1,00	5,83	5,11	-1,72
Média	1,14	4,07	5,11	-0,11

Usando o mesmo critério de SWENSEID e col. (1956), apenas a estudante M.I.B. não atingiu o equilíbrio com as duas dietas.

No quadro (13) temos a análise de variância para os balanços nitrogenados aparentes de estudantes alimentadas com fubá e com fubá suplementado com lisina e triptofano.

Apesar de termos só quatro observações, fize a análise de variância para seguir a mesma orientação das outras experiências.

Quadro (13) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste
Entre alimentos	0,47	1	0,47	F=0,29
Dentro grupos	9,55	6	1,59	
Total	10,02	7		

$$q_{1,6} = 8,81$$

$$T = 2,82$$

A análise de variância levou-nos a concluir pela igualdade dos balanços nitrogenados aparentes em estudantes alimentadas com fubá e fubá suplementado com lisina e triptofano.

Tabela (31) - Balanço nitrogenado real em estudantes alimentadas com fubá sem suplementação.

Nome	Nitrogênio (g/dia)				Nitrogênio ing. (g/dia)	Balanço nitroge nado (g/dia)
	Met.	Fecal	End.	Urin.		
M.A.M.	0,67	0,96	1,28	3,63	5,11	2,47
Z.B.	0,72	1,26	1,37	4,10	5,11	1,84
M.I.B.	0,98	1,47	1,87	6,22	5,11	0,27
A.P.S.	0,80	0,84	1,44	4,34	5,11	2,17
Média	0,79	1,13	1,49	4,57	5,11	1,69

Tabela (32) - Balanço nitrogenado real em estudantes alimentados com fubá suplementado com lisina e triptofano.

Nome	Nitrogênio (g/dia)				Nitrogênio ing. (g/dia)	Balanço nitroge nado (g/dia)
	Met.	Fecal	End.	Urin.		
M.A.M.	0,67	1,19	1,28	3,46	5,11	2,41
Z.B.	0,72	1,53	1,37	3,68	5,11	1,99
M.I.B.	0,98	1,00	1,87	5,83	5,11	1,13
A.P.S.	0,80	0,86	1,44	3,33	5,11	3,16
Média	0,79	1,14	1,49	4,07	5,11	2,17

No quadro (14) temos a análise de variância dos balanços nitrogenados reais.

Quadro (14) - Análise de variância

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste
Entre alimentos	0,47	1	0,47	F = 0,56
Dentro grupos	4,96	6	0,82	
Total	5,43	7		

$$q_{1,6} = 8,81$$

$$T = 15,44$$

A análise de variância levou-nos a concluir pela igualdade dos balanços nitrogenados reais das estudantes alimentadas com fubá e fubá suplementado com lisina e triptofano.

CAPÍTULO V

D I S C U S S Ã O

Visando a uma melhor coordenação da discussão de nossos resultados, dividimos o capítulo em:

- A - Discussão das análises
- B - Discussão dos resultados das experiências com ratos
- C - Discussão dos resultados das experiências com estudantes
- D - Síntese final

A - Discussão das análises

SCRIMSHAW e col. (1958) e KIES e col. (1967), trabalhando com jovens submetidos a dietas contendo milho comum, como fonte protéica, suplementado ou não com nitrogênio não essencial, verificaram que a lisina é o primeiro aminoácido limitante em níveis altos e baixos de nitrogênio total. BRESSANI e col. (1958), BRESSANI e col. (1963), KIES e FOX (1970) constataram que o segundo aminoácido limitante em níveis baixos (4gN/dia), é o triptofano e em níveis altos (13 g N/dia) é a metionina.

A vista das conclusões dos autores acima citados, nas nossas experiências com fubá, os aminoácidos limitantes são a lisina e o triptofano, pois trabalhamos em níveis baixos de nitrogênio total (5 g N/dia), o que está de acordo com os resultados por nós obtidos na determinação dos aminoácidos limitantes pelo índice químico, (tabela 11).

Pelo índice químico, o primeiro aminoácido limitante da carne é a valina (tabela 11) mas, se compararmos a quantidade de carne (85 g) com a de milho comum (240 g) usadas nas dietas das estudantes, o teor de triptofano é praticamente igual nas duas dietas e, inferior aos requisitos diários estabelecidos por ROSE (1949) e pela FAO (1965), (tabela 4). O teor de triptofano no milho opaco-2 é superior ao do fubá e da carne nas proporções usadas nas dietas das estudantes e quase atinge o valor

estabelecido por ROSE (1949), (tabela 4). O triptofano é mais alto no padrão FAO, mas, segundo trabalhos de SWENSEID (1956), LEVERTON e STEEL (1962), a combinação FAO em aminoácidos é muito alta em metionina, cistina e triptofano.

B - Discussão das experiências com ratos

A determinação do nitrogênio endógeno e metabólico em animais pode ser feita diretamente como muitos autores o fizeram, MITCHELL e CARMAN (1924), usando dietas aprotéicas. BARTH e col. (1969), afirmam que os resultados obtidos por este método não são corretos, porque o animal em uma dieta aprotéica tem seu apetite diminuído, ingerindo uma quantidade de alimento menor do que ingeriria com outra dieta.

O método de determinação de nitrogênio eliminado, usando dietas aprotéicas, parte da premissa de que o nitrogênio metabólico e endógeno não depende do conteúdo protéico do alimento. Neste trabalho, usamos os valores para nitrogênio endógeno e metabólico obtidos por extrapolação, pois assim obtemos esses valores em condições mais normais. Também achamos que os valores assim determinados são mais exatos, desde que em uma dieta aprotéica deve haver diminuição da secreção intestinal de nitrogênio, o que nos daria um nitrogênio metabólico mais baixo. Isto concorda com os nossos resultados, 3,8 mg/dia para o nitrogênio metabólico obtido por extrapolação, e 2,53 calculado com uma dieta aprotéica.

O crescimento de ratos alimentados com fubá, figuras (2) e (3), difere significativamente daqueles alimentados com milho opaco-2, carne e caseína.

Nesta altura, surgiu a dúvida de que o milho comum integral e o fubá se comportassem diferentemente. Pelas análises dos aminoácidos do fubá e do milho comum integral, (tabela 8), verificamos que, em conteúdo de aminoácidos por 100 g de proteína, os resultados se equivalem, e que, ao nível de 6% de proteína, têm o mesmo comportamento em relação ao crescimento e, recuperação de ratos.

O PER e o NPR para o milho opaco-2, foi superior ao do fubá e milho comum integral.

Segundo CHAPMAN e col. (1959), o PER varia com a idade, em dias, dos ratos que se submeteram à experiência. Essa experiência foi realizada com caseína ao nível de 10%, e obtiveram valores que variaram de 1,80 a 2,90, sendo tanto mais alto quanto mais jovem o animal.

A prova evidente das diferenças dos PER está documentada na fotografia (1), onde notamos nitidamente que o rato alimentado com milho opaco-2, apresenta um aspecto normal comparável ao alimentado com caseína. Porém, o rato que recebeu fubá apresenta sinais de carência: pêlo irregular e aspecto doentio.

Calculados os balanços nitrogenados reais, observamos que a retenção de nitrogênio em ratos tratados com carne, milho opaco-2, caseína, foi superior ao dos mantidos com fubá, sendo a ingestão, absorção e retenção no grupo alimentado com carne, maiores do que nos grupos que receberam qualquer outra fonte protéica. A retenção nos grupos alimentados com caseína e milho opaco-2 é semelhante e superior à do grupo do fubá (tabela 17).

A digestibilidade encontrada para a proteína da carne, milho opaco-2, fubá e caseína é respectivamente 92,6, 81,2, 82,2 e 87,3. Vemos que a digestibilidade do milho opaco-2 não pode ser responsável pelo melhor crescimento dos ratos, pois as duas variedades de milho têm aproximadamente a mesma digestibilidade. Embora a carne e a caseína tenham maior digestibilidade de que o milho opaco-2, a diferença de crescimento dos ratos alimentados com estas três fontes protéicas não é significativa.

Pelas figuras (6) e (7), verificamos que a recuperação de uma carência protéica com milho opaco-2 ou caseína foi mais rápida do que com fubá, desde que com este último praticamente não houve recuperação. O emprêgo de qualquer das fontes protéicas não possibilitou uma recuperação total; o balanço nitro

genado dos grupos em recuperação, não atingiu o dos grupos contrôles correspondentes (tabela 16).

Nos grupos alimentados com milho opaco-2 e caseína, a ingestão aumenta nas fases sucessivas, mas diminui nos grupos alimentados com fubá, o que indica que há uma diminuição do apetite com a continuidade da dieta (tabelas 19, 21 e 23).

A absorção mantém-se constante nas diversas fases de recuperação nos grupos alimentados com milho opaco-2 e caseína, mas aumenta no grupo do milho comum (tabelas 19, 21 e 23).

Na fotografia (2), podemos observar que a recuperação com milho opaco-2 e caseína é mais evidente pelo aspecto normal dos ratos.

Em outra série de estudos, onde tentamos verificar quais os aminoácidos limitantes no fubá, verificamos que êste, suplementado com lisina e triptofano, alcança valores intermediários entre fubá e milho opaco-2; e ainda que a suplementação com todos os aminoácidos carentes no fubá, em relação ao milho opaco-2, não melhora a situação (figura 10). Por outro lado, o acréscimo de leucina ao milho opaco-2 prejudica o crescimento dos ratos, fazendo com que a curva de crescimento do milho opaco-2 se desloque para a zona intermediária já citada.

Sabemos que a relação dos aminoácidos entre si é fundamental para haver balanceamento satisfatório. HARPER e KUMTA (1959) afirmaram que o desbalanço de aminoácidos provoca não só a diminuição da utilização da proteína, como também uma anorexia e inibição no crescimento. EVEHJEM (1956) constatou a importância da relação leucina, isoleucina e valina.

No nosso trabalho, obtivemos para a relação leucina-isoleucina, na caseína, milho opaco-2 e milho opaco-2 suplementado com leucina, respectivamente 1,5, 2,6, 3,7 e 4,4. O aumento da relação leucina-isoleucina, provocado pelo acréscimo de leucina ao milho opaco-2, provocou o desbalanço de sua proteína e conseqüente inibição de crescimento.

Êstes fatos nos levaram a supor que a diferença entre o valor biológico do milho opaco-2 e milho comum é devida à falta de lisina e triptofano e ao excesso de leucina neste último.

C - Discussão dos resultados com estudantes

Não existem na literatura muitos trabalhos sobre nitrogênio endógeno em seres humanos e os que existem foram realizados em pessoas submetidas a uma dieta apróteica. SMUTS (1935) verificou que nos primeiros dias de uma dieta apróteica, a perda de nitrogênio na urina é grande, diminuindo até alcançar um ponto de inflexão, que corresponde a 46 mg de N por kg de peso corporal. MURLIN e col. (1946), encontraram para jovens do sexo masculino, 1,48 mg N/kcal basal. YOUNG e SCRIMSHAW (1968), obtiveram para jovens do sexo masculino, 36,5 mg/kg peso corporal ou 1,6 mg N/kcal basal, ou seja, os mesmos valores que GOPALAN e NARASINGA RAO (1966) encontraram para indivíduos subnutridos. CALLOWAY e MARGEN (1971) constataram para jovens do sexo masculino, 2,41 g N/dia, 38 mg/kg peso corporal ou 1,44 mg N/kcal basal de nitrogênio endógeno, valores mais altos do que os por nós obtidos, 1,67 g N/dia, 29 mg N/kg peso corporal ou 1,2 mg N/kcal basal para jovens do sexo feminino.

BRICKER e SMITH (1951) determinaram o nitrogênio endógeno pela fórmula:

$$N \text{ endógeno (g/dia)} = \text{sup. corporal} \times 1137$$

Usando esta fórmula, encontramos para as nossas estudantes um nitrogênio endógeno médio de 1,8 g/dia.

Para nitrogênio metabólico em estudantes, obtemos 0,87 mg/dia ou 15 mg N/kg peso corporal. CALLOWAY e MARGEN (1971) encontraram para jovens do sexo masculino 0,96 g N/dia ou 14 mg N/kg de peso corporal, valores muito semelhantes aos obtidos por MUELLER e COX (1947) e por nós, e mais altos do que os obtidos por YOUNG e SCRIMSHAW (1968) 9 mg N/kg peso corporal.

Na análise dos resultados da experiência 2.2 com estudantes (tabela 27), verificamos que elas tiveram retenção de nitrogênio diminuída quando passaram da dieta de milho opa-co-2 para fubá. De acordo com o critério de SWENSEID e col. (1956), na primeira dieta, as estudantes M.E.G. e M.T. não atingiram o equilíbrio nitrogenado, enquanto que na dieta de fubá só a estudante M.A.M. atingiu o equilíbrio, o que sugere que o fubá é mais desbalanceado. Talvez a estudante M.A.M. precisasse de menos aminoácidos para atingir o equilíbrio.

Os resultados obtidos com carne são de difícil interpretação e demandam maiores estudos para a consecução de resultados significativos.

Pela análise de variância dos resultados da experiência 2.3 (quadros 13 e 14) vemos que não há diferença significativa entre os balanços nitrogenados das estudantes alimentadas com fubá e com fubá suplementado com lisina e triptofano. Todavia, as estudantes M.A.M. e Z.B. tiveram um balanço nitrogenado constante e as estudantes A.P.S. e M.L.B., um balanço nitrogenado diminuído quando passaram da dieta de fubá suplementado para o sem suplementação. No entanto, convém salientar que as estudantes que tiveram seu balanço nitrogenado diminuído foram as que passaram da dieta com, para a sem suplementação, enquanto que as que mantiveram o seu balanço nitrogenado iniciaram a experiência com a dieta sem suplementação. Talvez haja esta diferença porque, ao passar de uma dieta de fubá suplementada com lisina e triptofano para outra, carente nestes dois aminoácidos, houve um desbalanceamento e, em consequência, a retenção de nitrogênio diminuiu. No segundo caso, provavelmente, houve um desbalanço com o fubá no primeiro período e não houve tempo para uma recuperação.

D - Síntese final

Dos resultados de todas as experiências relatadas nesta tese, verificamos que:

- 1 + A proteína do milho opaco-2 é mais eficiente para o desenvolvimento normal de ratos (PER, NPR balanço nitrogenado e aspecto) e para a manutenção do equilíbrio nitrogenado em seres humanos.
- 2 - Quanto à capacidade de recuperação, o milho opaco-2 e a caseína são equivalentes; notamos, porém, que mesmo depois de quarenta e três dias de experiência, a recuperação não é completa.
- 3 - O fubá, suplementado por todos os aminoácidos de que carece para equiparar-se ao milho opaco-2, produz resultados semelhantes aos obtidos unicamente com a adição de lisina e triptofano, o que indica que apenas os dois últimos são limitantes.
- 4 - O milho opaco-2 é mais rico em lisina e triptofano do que o fubá, e este último caracteriza-se por um excesso de leucina. Estas diferenças na composição são responsáveis pela maior eficiência do milho opaco-2 como fonte proteica.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

1. O milho opaco-2, embora seja mais rico em lisina e triptofano, apresenta teor mais baixo de leucina.
2. Os aminoácidos limitantes do milho comum são a lisina e o triptofano.
3. O acréscimo de leucina ao milho opaco-2, até atingir a mesma proporção do milho comum, inibe o crescimento dos ratos.
4. O aminoácido limitante do milho opaco-2, determinado pelo método de Mitchell - (índice químico) - é a isoleucina.
5. Em ratos submetidos à dieta aprotéica, o nitrogênio metabólico e endógeno é menor do que o calculado por extrapolação.
6. A recuperação de ratos com caseína e milho opaco-2 é melhor do que a com milho comum, mas, em nenhum caso, a recuperação é total. Em 43 dias de experiência, o peso ou o balanço nitrogenado não atingiu os valores dos ratos controles sem carência prévia.
7. A retenção de nitrogênio é maior nas estudantes submetidas à dieta de milho opaco-2.
8. Nas estudantes, no nível protéico de 35 g/dia, a adição de lisina e triptofano ao milho comum não melhora o balanço nitrogenado.
9. A menor eficiência do milho comum, como fonte protéica, é devida ao baixo teor de lisina e triptofano e excesso de leucina.

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANESE, A.A., ed. - New methods of nutritional biochemistry. New York, Academic Press, 1963. v. I, p. 84.
- BARTH, K.M. & McCONNEL, J.A. - Performance of rats fed ings alternately fed diets higher and lower in energy or prote in. J. Nutr., 97 (1): 85-99, jan. 1969.
- BENDER, A.E. & DOELL, B.H. - Biological evaluation of prote ins: new aspect. Brit. J. Nutr., 11: 140, 1957.
- BERQUÓ, E., & MARQUES, R. - Análise de variância, Curso 5, 2. São Paulo, Departamento de Estatística Aplicada da Faculda de de Higiene e Saúde Pública da USP, 1963.
- BRESSANI, R. - Protein quality of opaque-2 maize in children. Proceedings of the High Lysine Corn Conference. Indiana, Purdue University, 1966. p. 34-39.
- BRESSANI, R. & ELIAS, L.G. & GOMEZ BRENES, R.A. - Prote in quality of opaque-2 corn evaluation in rats. J. Nutr., 97(2): 173-179, feb. 1969.
- BRESSANI, R. & SCRIMSHAW, N.S. & BEHAR, M. & VITERI, F. - Supplementation of cereal proteins with amino acids. II. Effect of amino acid supplementation of corn-mass at interme diate levels of protein intake on the nitrogen retention of young children. J. Nutr., 66: 501-513, 1958.
- BRESSANI, R. & WILSON, D.L. & BEHAR, M. & SCRIMSHAW, W.S. - Supplementation of cereal proteins with amino acids. III - Effect of amino acid supplementation of wheat flour as measured by nitrogen retention of young children. J. Nutr., 70: 176-186, 1960.

- BRESSANI, R. & WILSON, D. & CHUNG, M. & BEHAR, M. & SCRIMSHAW, N.S. - Supplementation of cereal proteins with amino acids. V - Effect of supplementing lime treated corn with different levels of lysine, tryptophan and isoleucine on the nitrogen retention of young children. J. Nutr., 80: 80-84, 1963.
- BRICKER, M.L. & SMITH, J.M. - A study of the endogenous nitrogen output of college women with particular reference to use of creatinine output in the calculation of the biological value of the proteins of eggs and sunflower seed flour. J. Nutr., 44: 553-573, 1951.
- CALLOWAY, D.H. & MARGEN, S. - Variation in endogenous nitrogen excretion and dietary nitrogen utilization as determinants of human protein requirement. J. Nutr., 101: 205-216, 1971.
- CHAPMAN, D.G. & CASTILLO, R. & CAMPBELL, J.A. - Evaluation on protein in foods. I-A method of determination of protein efficiency ratios. Canad. J. Biochem., 37: 679-685, 1959.
- CLARK, H.E. & ALLEN, P.E. & MEYERS, S.M. & TUCKETT, S.E. & YAMAMURA, Y. - Nitrogen balances of adults consuming opaque-2 maize protein. Amer. J. Clin. Nutr., 20: 823-833, 1967.
- CLARK, H.E. - Opaque-2 corn as a source of protein for adult human subjects. Proceedings of the High Lysine Corn Conference. Indiana, Purdue University, 1966. p. 40-44,
- EVEHJEM, C.A. - Amino acid balance in nutrition. J. Amer. Diet. Ass., 32: 305-308, 1956.
- F.A.O. - Amino acid content and biological data on proteins. Rome, FAO, 1970.
- GOPALAN, C. & NARASINGA RAO, B.S. - Effect of protein depletion on urinary nitrogen excretion in undernourished subjects. J. Nutr., 90: 213-218, 1966.

- HANSEN, D.W. & BRIMHALL, B. & SPRAGUE, G.F. - Relations hip of zein to the total protein in corn. Cereal Chem., 23: 329-331, 1946.
- HARPER, A.E. & KUMTA, V.S. - Amino acid balance and protein requirement. Fed. Proc., 18: 1136-1142, 1959.
- HORN, M.J. & JONES, D.B. - A rapid colorimetric method for determination of tryptophane in proteins and foods. J. Biol. Chem., 157: 153-160, 1969.
- KIES, C. & FOX, H.M. - Effect of level of total nitrogen intake on second limiting amino acid in corn for humans. J. Nutr., 100: 1275-1285, 1970.
- KIES, C. & FOX, H.M. & WILLIAMS, E.R. - Effect of nonspecific nitrogen intake on minimum corn protein requirement and first limiting amino acid in corn for humans. J. Nutr., 92: 377-383, 1965.
- LEVERTON, R.M. & STEEL, D.S. - FAO and oat pattern. J. Nutr., 78: 10-14, 1962.
- MATTOS, L.C. & DE ANGELIS, R.C. - Valor nutritivo do milho opaco-2 como fonte protéica: XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Salvador, Bahia. p. 334.
- MERTZ, E.T. & VERON, O.A. & BATES, L.S. & NELSON, O. E. - Growth of rats fed on opaque-2 maize. Science, 148: 1741-1742, 1965.
- MERTZ, E.T. - Growth of rats on opaque-2 maize. Proceedings of the High Lysine Corn Conference. Indiana, Purdue University. p. 12-18
- MERTZ, E.T. & BATES, L.S. & NELSON, D.E. - Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. Science, 145: 279-280, 1964.
- MERTZ, E.T. & BATES, L.S. - Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. Science, 150: 1469-1470, 1965.

- MITCHELL, H.H. & CARMAN, G.G. - The biological value of the nitrogen mixture of patent with flour and animal foods. J. Biol. Chem., 68: 183-215, 1926.
- MITCHELL, H.H. & BURROUGHS & BEADLES, J.R. - The significance and accuracy of biological values of proteins computed from nitrogen metabolism data. J. Nutr., 11: 257-274, 1936.
- MOSSE, J. - Alcohol soluble proteins of cereal grains. Fed. Proc., 25: 1663, 1966.
- MUELLER, A.J. & COX, W.M. - Comparative nutritive value of casein and lactalbumin for man. J. Nutr., 34: 285-294, 1947.
- MURLIN, J.R. & EDWARDS, L.E. & HAWLEY, E.E. & CLARK, L.C. - Biological value of proteins in relation to the essential amino acid which they contain. J. Nutr., 31: 533-554, 1946.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - Necessidades de proteína. Geneva, FAO/OMS, 1966. (Série de Informes Técnicos, nº301).
- OSBORNE, T.B. & MENDEL, L.B. - Nutritive properties of the maize kernel. J. Biol. Chem., 18: 1-4, 1914.
- OSBORNE, T.B. & MENDEL, L.B. & FERRY, E.L. - Method of expressing numerically the growth promoting value of proteins. J. Biol. Chem., 37: 223-229, 1919.
- PHILLIPS, P.H. & HART, E.B. - The effect of organic dietary constituents upon chronic fluorine toxicosis in the rat. J. Biol. Chem., 109: 657-663, 1935.
- PICKETT, R.A. - Opaque-2 corn in swine nutrition. Proceedings of the High Lysine Corn Conference. Indiana, Purdue University, 1966. p. 19-22.
- ROSE, W.C. - Amino acid requirements of man. Fed. Proc., 8: 546, 1949.
- SAUERLICH, H.E. & CHANG, W.Y. & SALMON, W.D. - The amino acid and protein content of corn as related to variety and nitrogen fertilization. J. Nutr., 51: 241-250, 1953.

- SCRIMSHAW, N.S. & BRESSANI, R. & BEHAR, M. & VITERI, F. - Supplementation of cereal proteins with amino acids. I - Effect of amino acid supplementation of corn-masa at high levels of protein intake on nitrogen retention of young children. J. Nutr., 66: 485-499, 1958.
- SMUTS, D.B. - The relation between the basal metabolism and the endogenous nitrogen metabolism with particular reference to the maintenance of requirement of protein. J. Nutr., 9: 403-408, 1935.
- SWENSEID, M.E. & HARRIS, C.L. & TUTTLE, J.G. - An evaluation of the FAO amino acid reference pattern in human nutrition. II-Studies with young women. J. Nutr., 77: 391-396, 1962.
- SWENSEID, M.E. & WILLIAMS, I. & DUNN, M.S. - Amino acid requirements of young women based on nitrogen balance data. I - The sulfur containing amino acid. J. Nutr., 58: 495-505, 1956.
- SWENSEID, M.E. & WATTS, J. & HARRIS, C. & TUTTLE, J. G. - An evaluation of the FAO amino acid reference pattern in human nutrition. I - Studies with young men. J. Nutr., 75: 295-302, 1961.
- SWENSEID, M.E. & FEELEY, R.J. & HARRIS, C.L. & TUTTLE, J.G. - Egg protein as source of essential amino acid. J. Nutr., 68: 203-211, 1959.
- WATSON, S.A. - Comparison of the dry milling properties of opaque-2 and normal dent corn. Proceedings of the High Lysine Corn Conference. Indiana, Purdue University, 1966. p. 117-120.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - Protein requirements. Geneva, FAO/WHO, 1965. Technical Report Series, n° 301). p. 10-22.
- YOUNG, V.R. & SCRIMSHAW, N.S. - Endogenous metabolism and plasma free amino acid in young adults given a protein free diet. Brit. J. of Nutr., 22: 9-20, 1968.