

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

ESTUDO COMPARATIVO DO VALOR BIOLÓGICO DAS
PROTEÍNAS DO LEITE DE VACA E DE SOJA EM
FÓRMULAS INFANTIS

Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida
por Cecília dos Santos Noronha e aprovada pela Comissão
Julgadora em 25.02.94.

CECÍLIA DOS SANTOS NORONHA

Nutricionista

DÉBORA DE QUEIROZ TAVARES

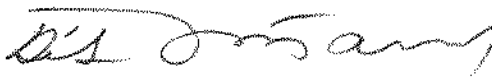
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência da Nutrição.

1994



BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Débora de Queiroz Tavares

(orientadora)



Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig

(membro)



Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan

(membro)



Prof. Dr. Antônio de Azevedo Barros Filho

(membro)

Campinas, *05* de *Fev* de 1994

Aos meus pais

-Dedico-

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Incentivo à Capacitação Docente (PICD/CAPES/MEC) pela bolsa concedida no decorrer do curso.

Ao Corpo Docente do Instituto de Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À Profa.Dra. Débora de Queiroz Tavares pela efetiva orientação e terna amizade.

À Yara Fagnani Honório pelo apoio técnico, dedicação e colaboração ímpar.

Ao querido Marco Antônio pelo companheirismo, incentivo e tolerância.

Aos antigos amigos Elaine, Normandis, Ilana, Myrian Thereza, Paula Andréa e Cleusa e aos novos amigos Erna, Ruth e Mariazinha pelo constante apoio.

À Maria Teresa e João pela amizade.

Aos profissionais técnicos do Laboratório de Bioquímica Nutricional da FEA, pela colaboração nas análises químicas e bioquímicas.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. OS FORMULADOS INFANTIS	2
2.1.1. Adequação espécie-específica do leite	2
2.1.2. Evolução das fórmulas para lactentes	7
2.2. ADEQUAÇÃO NUTRICIONAL DAS FÓRMULAS INFANTIS	10
2.2.1. Especificações dos produtos	10
2.2.2. Adequação das fontes protéicas ao uso infantil	11
2.2.3. Efeitos metabólicos da ingestão protéica elevada nos lactentes	16
2.3. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO IN VIVO DA UTILIZAÇÃO	
PROTEÍCA	22
2.3.1. Crescimento pondero-estatural	22
2.3.2. Parâmetros bioquímicos	25
2.3.3. Ensaíos biológicos	27
3. OBJETIVOS	31

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. FONTES PROTÉICAS.....	32
4.2. ANIMAIS.....	32
4.3. ENSAIO BIOLÓGICO.....	33
4.3.1. Preparo dos animais.....	33
4.3.2. Preparo das dietas.....	34
4.3.3. Testes aplicados.....	37
4.4. DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA BRUTA.....	39
4.5. DETERMINAÇÃO DO AMINOGRAMA PLASMÁTICO.....	39
4.6. DETERMINAÇÃO DO HEMOGRAMA.....	39
4.7. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	40
4.8. ANATOMIA DE ÓRGÃOS.....	40
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS.....	41
5.2. GANHO PONDERAL E COEFICIENTE DE EFICIÊNCIA.....	
ALIMENTAR (CEA).....	41
5.3. DIGESTIBILIDADE VERDADEIRA.....	45
5.4. QUOCIENTE DE EFICIÊNCIA PROTÉICA (PER) E PER.....	
RELATIVO (RPER).....	46
5.5. QUOCIENTE DE EFICIÊNCIA LÍQUIDA DE PROTEÍNA.....	
(NPR) E NPR RELATIVO (RNPR).....	48
5.6. ESCORE DE AMINOÁCIDOS CORRIGIDO PELA.....	

DIGESTIBILIDADE VERDADEIRA (PD-CAS)	49
5.7. AVALIAÇÕES ANATÔMICAS DO FÍGADO E INTESTINO	
DELGADO	52
5.8. AVALIAÇÃO DOS ELEMENTOS SANGÜÍNEOS	54
5.8.1. Parâmetros bioquímicos e hemograma	54
5.8.2. Aminograma plasmático	57
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICE	74

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Nomenclatura dos fabricantes e respectivas fórmulas infantis completas disponíveis no mercado brasileiro (valores em g/100Kcal).....	9
TABELA 2. Composição das fórmulas infantis de acordo com os diversos órgãos oficiais.....	12
TABELA 3. Osmolalidade urinária observada e calculada conforme o tipo de alimentação	17
TABELA 4. Alterações no aminograma plasmático de lactentes em uso de fórmulas lácteas quando comparados aos de lactentes amamentados	21
TABELA 5. Formulação da dieta láctea e controles utilizadas no ensaio biológico.....	34
TABELA 6. Formulação da dieta não-láctea e controles utilizados no ensaio biológico	35
TABELA 7. Mistura vitamínica AIN-76, segundo o AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977.....	36
TABELA 8. Mistura mineral AIN-76, segundo o AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977.....	37
TABELA 9. Ganho Ponderal e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) de ratos machos durante 14 dias de ensaio	42
TABELA 10. Digestibilidade verdadeira (Dv) de dietas à base de fórmulas infantis e caseína obtidos em bioensaios com ratos.....	46
TABELA 11. Coeficiente de Eficiência Protéica (PER) e PER relativo à caseína (RPER) de dietas à base de fórmulas infantis obtidas em bioensaios de 14 dias com ratos Wistar	47

TABELA 12. Coeficiente de Proteína Líquida (NPR) e NPR relativo à caseína (RNPR) de dietas à base de fórmulas infantis obtidos em bioensaios	48
TABELA 13. Escores de aminoácidos e valores de digestibilidade protéica corrigida pelo escore de aminoácidos (PD-CAS) dos Produtos 1 e 2 e das dietas derivadas.....	50
TABELA 14. Percentual de peso de fígado e intestino delgado sobre peso corpóreo de ratos machos Wistar após 14 dias em dietas à base de fórmulas infantis, caseína e aprotéica.....	53
TABELA 15. Valores de componentes sanguíneos de ratos obtidos após 14 dias de ensaio biológico.....	55
TABELA 16. Aminograma das fontes protéicas utilizadas nos ensaios biológicos (mg do aa/g de proteína).....	60
TABELA 17. Aminograma plasmático de ratos submetidos à dieta PSV, CTL/psv e ATP/psv, durante 14 dias.....	61
TABELA 18. Ingredientes utilizados na dieta não láctea e cocntroles empregados no ensaio biológico.....	75
TABELA 19. Ingredientes utilizados na dieta não láctea e cocntroles empregados no ensaio biológico.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Conteúdo de cálcio, lipídios, proteínas e lactose no leite humano e em outras sete espécies de mamíferos em relação com suas respectivas velocidades de crescimento.....	4
FIGURA 2. Crescimento cerebral em relação ao nascimento, de cinco espécies de mamíferos. Os intervalos de tempo variam para cada espécie (entre parênteses).....	5
FIGURA 3. Coagulação em pH 5,0 de três tipos de leite (microscopia eletrônica).....	6
FIGURA 4. Aminograma do leite de vaca comparado ao do leite humano.....	14
FIGURA 5. De cima para baixo, seguem-se os incrementos de peso, os valores totais de ingestão calórica e os gastos energéticos destinados ao crescimento. Todos relacionados aos períodos especificados na base de cada barra.....	23
FIGURA 6. Evolução estatural de crianças alimentadas com fórmulas à base de soja suplementada com metionina. Comparações entre os valores médios obtidos no estudo de SELLARS (1971) com os valores médios (± 1 desvio padrão) do "Padrão IOWA".....	26
FIGURA 7. Evolução ponderal de crianças alimentadas com fórmulas à base de soja suplementada com metionina. Comparação entre os valores de mediana (± 1 desvio padrão) do "Padrão IOWA".....	26
FIGURA 8. Evolução ponderal de ratos submetidos à dietas lácteas por 14 dias.....	43
FIGURA 9. Evolução ponderal de ratos submetidos à dietas não-lácteas por 14 dias.....	44

RESUMO

A quantidade e a qualidade protéica dos formulados infantis são pontos reavaliados constantemente. Duas fórmulas, designadas Produto 1 e Produto 2 foram submetidas a ensaio biológico. O Produto 1 continha uma mistura de proteínas de soro e caseína (razão 60:40) com 2,46g de proteína/100kcal, enquanto o Produto 2 continha isolado protéico de soja com 3,0g de proteína/100 kcal. Dieta com caseína suplementada com metionina (controle) e duas dietas elaboradas a partir dos Produtos 1 e 2 foram oferecidas a ratos como fonte única de proteína a 8% nas dietas. Foram calculados Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), Quociente de Eficiência Protéica relativo (RPER%), Quociente de Eficiência Líquida de Proteína relativo ((RNPR%), Digestibilidade verdadeira (Dv%) e ainda calculados Escore de Aminoácidos corrigido pela Digestibilidade verdadeira (PD-CAS%) e Digestibilidade verdadeira corrigida (TPDc-RAAR%). Amostras de sangue e fígado e o intestino delgado foram coletados para análises complementares.

O CEA, RPER%, RNPR% e Dv% foram similares para ambas as dietas. PD-CAS% e TPDc-RAAR% demonstraram melhores resultados para o Produto 1. Concluímos que a avaliação que incluiu a Dv% e a composição aminoacídica revelou diferenças entre os produtos.

As determinações de uréia, creatinina, lipídios totais e aminograma sanguíneos não variaram de acordo com as diferenças protéicas. É provável que a quantidade e qualidade das proteínas foram suficiente para garantir o adequado metabolismo dos ratos durante o curto período dos ensaios. O peso de fígados e intestino foi similar nos dois casos.

Nossos dados sugerem que a proteína do Produto 1 (soro:caseína) seria mais adequada para a alimentação de lactentes do que a do Produto 2 (isolado protéico de soja), quando os bioensaios são comparados com o perfil aminoacídico do produto. Entretanto, o alto conteúdo protéico do Produto 2 melhorou sua qualidade protéica.

ABSTRACT

The protein quantity and quality of infant formulae are continuously being reevaluated. Two formulae, designated Product 1 and Product 2 were under nutritional assays. Product 1 contained a whey/casein mixture (ratio 6:4), providing 2.46g protein/100kcal whereas Product 2 contained soybean protein isolate, providing 3.0g protein/100kcal. Methionine-enriched casein (control) and two diets derived from Product 1 and 2 were fed to weaning rats as the sole source of protein in diets containing 8% protein. Data allowed calculation of Food Efficiency, Relative Protein Efficiency Ratio (RPER%), Relative Net Protein Ratio (RNPR%), True Protein Digestibility (TPD%) Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PD-CAS%) and True Protein Digestibility-Corrected relative Amino Acid Rating (TPD-Corrected RAAR%). Blood, liver and small intestine were collected for complementary analyses.

The first set of assays, Food Efficiency, RPER%, RNPR% and TPD% were similar for both diets. PD-CAS% and TPD-Correct RAAR% conferred a better status to Product 1. It was concluded that an evaluation which includes both TPD and amino acid composition reveals fine differences between products.

The urea, creatinine and total lipids determinations did not vary according to the protein differences. It was likely that the performance of proteins were enough to assure an adequate metabolism to rats during the short period of the assays. Liver and small intestine weights were similar in both cases.

Our data suggests that Product 1 (Whey/casein) could be a more adequate protein for infant feeding than to Product 2 (soybean isolate) when the bioassays are compared with the amino acid profiles. However, the higher total protein content improved protein quality of Product 2.

1. INTRODUÇÃO

A indústria de formulados infantis cresceu e se especializou muito nestes últimos vinte anos e cada vez surgem mais produtos para atender às diferentes exigências fisiológicas ou patológicas do lactente. A aplicação de novos produtos exige supervisão e crítica constante, e os efeitos metabólicos de seu uso devem ser criteriosamente avaliados já que se trata de um grupo vulnerável à mais tênue interferência nutricional (CUSMINSKI & OJEDA, 1988).

O aproveitamento protéico de formulado lácteo comercial e de formulado comercial à base de soja, adaptados a condições experimentais será avaliado através de testes biológicos e bioquímicos procedidos com ratos. Serão também colocadas em discussão as propriedades e características dos testes empregados na avaliação do aproveitamento protéico.

Esperamos apresentar uma análise adequada que responda a algumas questões pertinentes à alimentação artificial de lactentes. Ressalva-se que devem ser levadas em consideração as limitações próprias dos métodos, dadas pelo uso de animais de laboratório (WADDELL & DESAI, 1981), pretendendo-se apresentar resultados experimentais para confronto com outros modelos de avaliação .

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção abordaremos sucintamente a questão da modificação qualitativa e quantitativa de fontes protéicas para a alimentação do lactente, assim como as implicações metabólicas de seu uso, discorrendo também sobre métodos de análise da adequação destas fórmulas.

2.1. OS FORMULADOS INFANTIS

2.1.1. Adequação espécie-específica do leite

O grau de maturidade variado com que nascem as crias dos mamíferos é um dos fatos que explicam a evolução distinta ocorrida nos leites produzidos pelas espécies que atendem especificamente às necessidades nutricionais e promovem crescimento e maturação das crias (JENNES & SLOAN, 1970). A FIGURA 1 demonstra a relação da taxa protéica, lipídica, de lactose e de cálcio dos leites de algumas espécies com a velocidade do ganho de peso de suas crias (BLANC, 1981). A alta quantidade de proteínas e lipídios, está associada às espécies de rápido crescimento apresentados, por exemplo pelos ratos e cães.

O surto de crescimento cerebral ocorre geralmente quando o número de neurônios alcança o padrão adulto. É um período vulnerável ao déficit nutricional, cujas sequelas poderão ser irreversíveis. No humano, o período compreende do terceiro trimestre intra-útero ao décimo oitavo mês de vida pós-natal. A FIGURA 2 demonstra o surto de crescimento cerebral de algumas espécies de mamífero. Para humanos, ratos e cães, o surto é muito pronunciado, diferindo em relação ao nascimento. A similaridade entre os padrões de desenvolvimento cerebral das espécies de mamíferos permite estudos experimentais (DOBBING, 1972).

A velocidade de crescimento do cérebro do ser humano é mais lenta do que a dos ratos de laboratório, mas ambos apresentam o mesmo grau de vulnerabilidade durante os períodos de surto de crescimento cerebral (DOBBING, 1972).

A difusão do leite de vaca em nosso meio foi generalizada, e é de conhecimento geral que o produto, "in natura" não é adequado: além das diferenças na quantidade e qualidade da proteína, na quantidade de lactose e cinzas, especial atenção deve ser voltada para as distintas concentrações de lactoferrina, imunoglobulinas, lisozima e na relação entre proteínas do soro/caseína e entre cálcio/fósforo.

O coágulo produzido à nível gástrico a partir de qualquer tipo de leite difere segundo a espécie, quanto à dureza, estrutura, textura e tamanho (FIGURA 3). O coágulo do leite humano é macio e finamente floculado enquanto que o do leite bovino é relativamente duro, com flóculos maiores. A fina floculação do leite humano, entre outros fatores, deve-se ao diâmetro menor das micelas de suas caseínas, o que favorece a digestão das proteínas pelas enzimas gastrointestinais do lactente (BLANC, 1981).

A má digestibilidade do leite de vaca tem sido contornada aumentando-se a quantidade de proteínas de soro de leite bovino nas fórmulas adaptadas para que alcancem o patamar próximo ao do leite humano: 60:40. Mas a manipulação ainda não atinge total benefício porque as diferenças entre espécies são muito acentuadas quando se trata das proteínas do soro do leite. Ocorrem proteínas específicas do leite, outras derivadas do sangue da mãe e outras de proveniência mista entre soro sanguíneo e biossíntese mamária; α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (ausente na espécie humana) e a maioria das enzimas são específicas do leite. Albumina sérica, transferrina e ceruloplasmina aparecem na mama provindas do sangue arterial, mas as imunoglobulinas e a lactoferrina são de origem mista; é portanto compreensível que as proteínas do soro do leite tenham características funcionais e fisiológicas diferentes inter e intra espécies (BLANC, 1981). Apesar destas características específicas do soro, deve-se notar que a manobra tecnológica de aumentar a quantidade de proteínas do soro

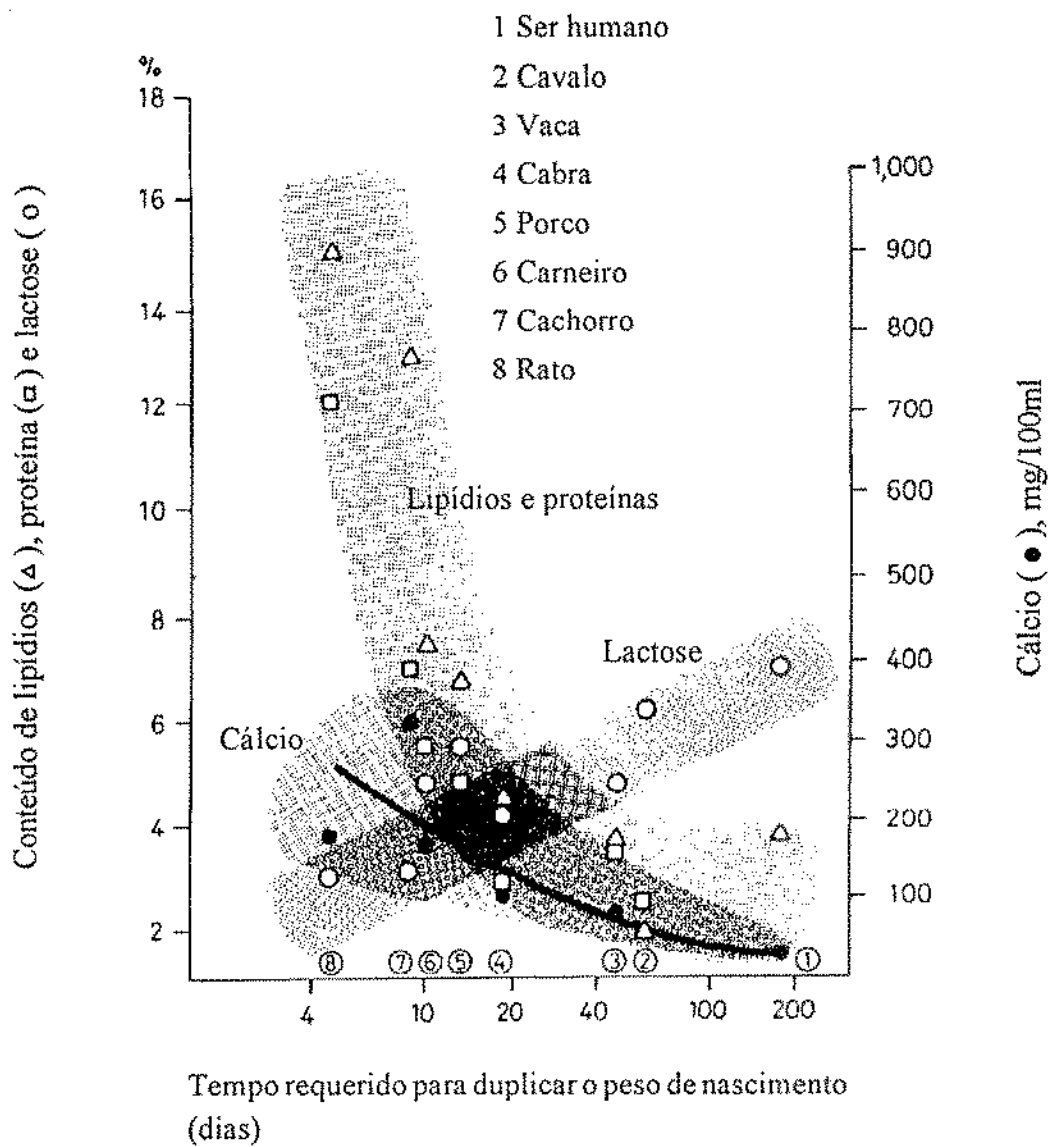


FIGURA 1. Conteúdo de cálcio, lipídios, proteínas e lactose no leite humano e em outras sete espécies de mamíferos em relação às respectivas velocidades de crescimento (BLANC,1981).

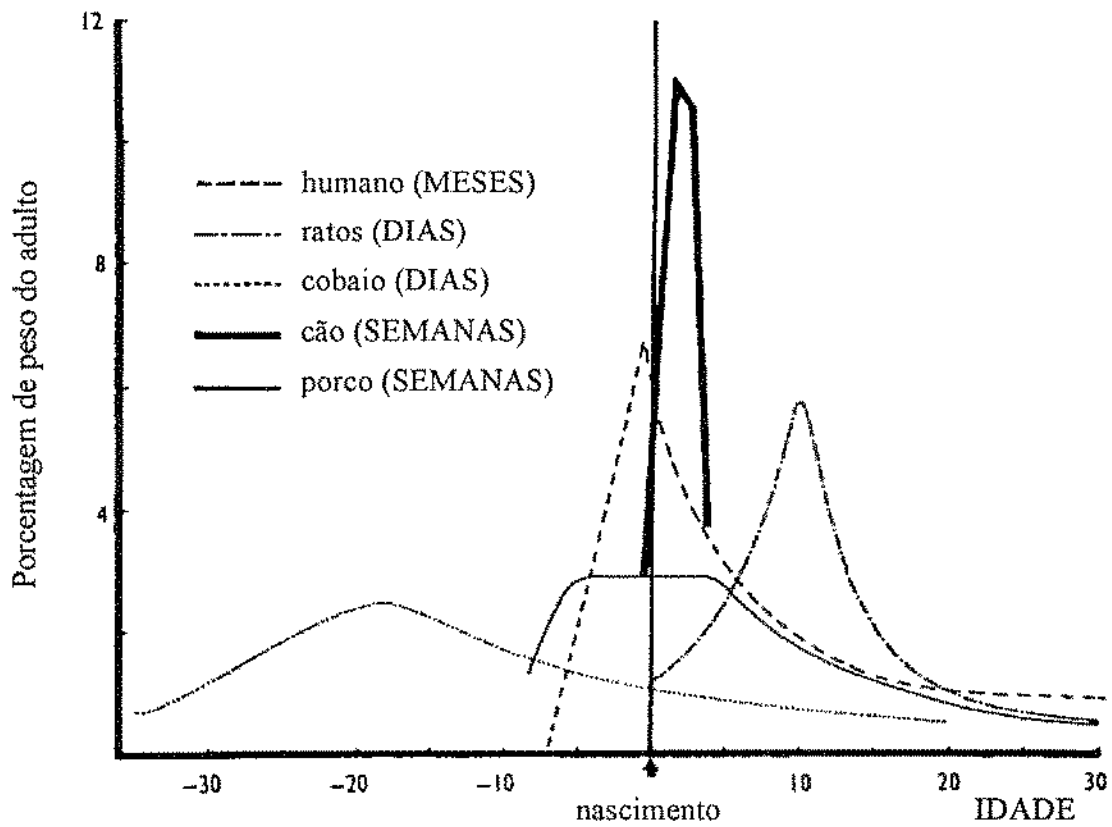
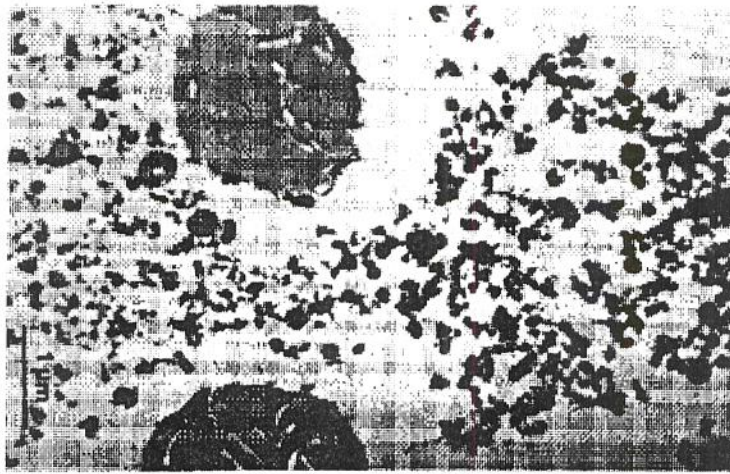
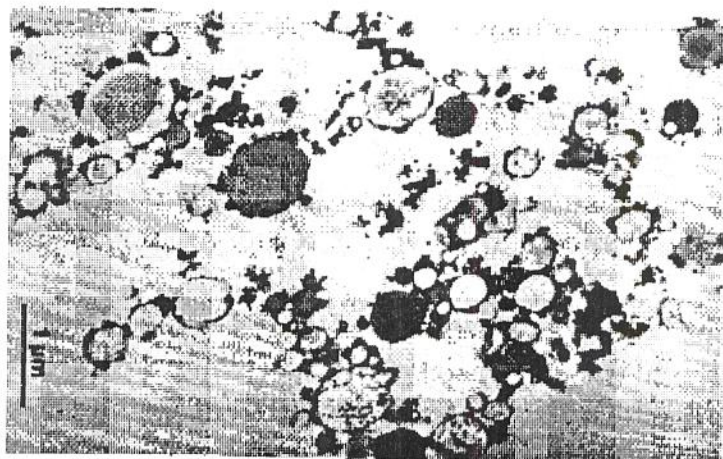


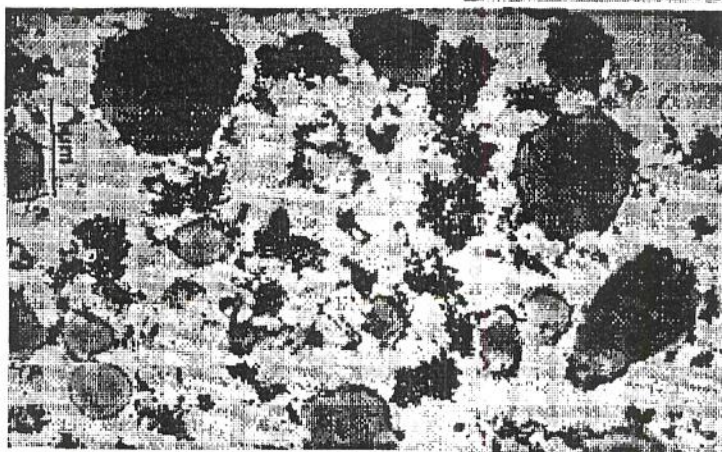
FIGURA 2. Crescimento cerebral em relação ao nascimento, de cinco espécies de mamíferos; os intervalos de tempo variam para cada espécie (entre parênteses), (DOBBING,1972)



A



B



C

FIGURA 3. Coagulação em pH 5,0 de três tipos de leite (microscopia eletrônica). RÜEGG & BLANC, citado por BLANC, 1981: A- Leite bovino, B- Fórmula adaptada e C- Leite humano. Os flocos de precipitação das proteínas diminuem no leite humano e sobretudo no formulado. A segunda diferença apresentada é a aparência micelar e não compactada que apresenta o leite humano.

em relação às caseínas do leite bovino resulta em maior oferta de cistina e menor oferta de aminoácidos aromáticos, os quais em excesso seriam danosos ao sistema nervoso central (HURRELL *et alii*, 1989).

As pesquisas, ao demonstrarem a superioridade do leite humano, auxiliaram o arrefecimento da oferta de fórmulas infantis no último decênio. As ações governamentais na área de Saúde Pública e o interesse contínuo da comunidade científica na questão da amamentação veicularam os aspectos nutricionais e imunológicos do leite humano, e abrangeram ainda questões de aspecto psico-sociais.

Quando a amamentação não é possível ou a quantidade do leite for insuficiente, o uso da fórmula adaptada é preconizada como substituta ou suplementar e sua formulação deve seguir especificações do Ministério da Saúde - Normas para Comercialização de Alimentos para Lactentes (1989) as quais baseiam-se nas normas internacionais (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1982).

2.1.2. Evolução das fórmulas para lactentes

FILER Jr. (1993), apresentou um breve histórico da evolução das fórmulas na alimentação dos lactentes. Segundo PACKARD (1982), nos Estados Unidos em 1919, batizaram como Leite Adaptado Sintético (SMA), um produto em base líquida que encerrava 4,6% de uma mistura de gordura animal e vegetal, 6,5% de hidratos de carbono e 0,9% de proteínas. A partir deste produto, a composição das fórmulas infantis sofreu modificações e ajustes ao longo do tempo consequentes às necessidades que emergiram de seu uso. PACKARD (*loc cit*) descreve a existência de quatro categorias de fórmulas para lactentes cujas bases são: leite de vaca; leite de vaca acrescido de soro de leite de vaca; extrato de soja ou isolado protéico de soja (IPS) e hidrolisado de caseína. No presente trabalho analisam-se duas categorias: uma à base de IPS e outra à base de leite/soro de leite de vaca.

Na Europa, o Comitê de Nutrição da Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição (ESPGAN), tem elaborado manuais utilizados na regulamentação da industrialização e aplicação dos alimentos infantis. De acordo com este órgão, fórmula infantil é um termo amplo referente a um grupo de produtos adequados nutricionalmente para substituir completa ou parcialmente o leite humano. A ESPGAN descreve três tipos: fórmula infantil completa que pode ser usada até um ano de idade; fórmula infantil adaptada, indicada para lactentes até os seis meses de vida e a fórmula de "seguimento", recomendada para a fase após 4 a 6 meses, quando há a introdução de outros tipos de alimentos (ESPGAN, 1977; ESPGAN, 1981).

No Brasil, a realidade depende mais do mercado produtor, cujo resumo de orientação coloca as seguintes opções:

- a) Fórmulas para 1ª fase, a serem utilizados até os 6 meses;
- b) Fórmulas para 2ª fase, para uso a partir de 5 a 6 meses de vida;
- c) Fórmulas completas, podendo ser usadas de 0 a 12 meses.
- d) Uso do leite integral o qual é diluído nos primeiros meses.

Na TABELA 1, apresentamos as fórmulas disponíveis no mercado brasileiro. A variedade de fórmulas infantis no Brasil ainda é pequena frente ao mercado americano, por exemplo, sendo que as fórmulas terapêuticas completas ou especiais são ainda em menor número. Dentre as formuladas à base de soja, somente uma dentre seis é constituída por extrato hidrossolúvel de soja, fonte protéica menos purificada do que a proteína isolada. A sacarose compõe somente duas delas sendo substituída por carboidratos menos fermentescíveis, diminuindo o risco de exacerbar a diarreia que acompanha os lactentes com intolerância/alergia ao leite de vaca.

As opções de fórmulas à base de leite de vaca, incluem os leites que se compõem de soro desmineralizado de leite com leite integral e os compostos por leite parcialmente desnatado. A partir daí observam-se as diferentes relações entre proteínas do soro e caseína. A lactose é o carboidrato mais constante em todas estas e a sacarose é adicionada a três

TABELA 1: Nomenclatura dos fabricantes e respectivas fórmulas infantis completas disponíveis no mercado brasileiro (valores em g/100kcal).

COMPONENTES	NESTLÉ										WYETH Nursoy	
	NAN 1	NAN 2	Nestogeno 1	Nestogeno 2	Pelargon	Alsoy	Sobbe	Prosobbe	NUTRÍCIA Isolac	ABBOTT Isomil		
PROTEÍNA												
Leite de vaca	2,5	3,3	4,0	4,1	3,6	-	-	-	-	-	-	-
soro caseína	60:40	60:40	18:82	18:82	18:82	-	-	-	-	-	-	-
Isolado de soja	-	-	-	-	-	2,8	3,0	3,0	-	2,9	-	2,7
Farinha de soja integral	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9	-	-	-
GORDURA												
Animal:vegetal	5,07	4,32	3,28	4,68	3,75	-	4,20	5,4	6,8	5,2	-	5,3
Vegetal	80:20	80:20	80:20	80:20	80:20	-	-	-	-	-	-	-
soja	-	-	-	-	-	4,9	+	+	+	+	+	+
côco	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
milho	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
CARBOIDRATO												
Lactose	11,04	11,79	13,59	10,74	12,6	11,04	12,5	9,9	11,0	10,0	-	10,2
Sacarose	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Dextrino-maltose	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Oligossacarídeos	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+

1 - uso até 6 meses

2 - acima de 6 meses até 1 ano

a - consta no rótulo do produto somente "óleo vegetal"

+ presença

- ausência

fórmulas. Somente a fórmula acidificada (Pelargon) sofre acréscimo de amido, o que facilitaria sua digestão.

Em relação às gorduras, todas as fórmulas apresentam fração vegetal para garantir veiculação de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis, havendo acréscimo de linoleato, variando de 0,4 a 0,6g/100kcal naquelas à base de leite de vaca. Particularmente nas fórmulas à base de soja, o uso do óleo de côco é observado em todas exceto em uma, o Isolac (NUTRÍCIA). Na composição deste tipo de óleo encontramos uma média de 60% de triglicérides de cadeia média (SENIO, 1968), os quais apresentam características de digestão, absorção e utilização que favorecem aos que apresentam diarreia no caso de intolerância/alergia ao leite de vaca.

Os produtos industrializados alcançaram excelente qualidade, mas o custo limita o uso às classes econômicas média e alta, fazendo com que a classe baixa adapte o leite de vaca "in natura" à alimentação infantil.

2.2. ADEQUAÇÃO NUTRICIONAL DAS FÓRMULAS INFANTIS

2.2.1. Especificações dos produtos

A Comissão de CODEX ALIMENTARIUS (1982) define como FÓRMULA INFANTIL o "produto baseado em leite de vaca ou de outros animais e/ou em outros constituintes comestíveis de origem animal, incluindo peixe, ou de origem vegetal, que tenham sido provados adequados para a alimentação infantil".

A obtenção do estado eutrófico da criança alimentada à base de fórmulas industrializadas é o objetivo de seus fabricantes e dos órgãos normatizadores (ESPGAN, FAO, WHO, FDA), os quais respaldam-se no Informe Técnico de Peritos da FAO/WHO/UNU de 1985. Nele estão definidas as necessidades nutricionais dos lactentes

baseadas na formação de tecidos e no gasto para manutenção orgânica dentro do ritmo de crescimento esperado, tomando-se por base o crescimento de lactentes amamentados.

Dentre os produtos à disposição do consumidor, as fórmulas infantis são as mais regulamentadas e melhor controladas nos Estados Unidos (FILER Jr, 1993). O volume IX do CODEX ALIMENTARIUS (1982) ressalta a importância do leite materno como o ideal durante os seis primeiros meses de vida e discrimina quantidades mínimas e máximas dos macro e micronutrientes que devem encerrar as fórmulas adaptadas, assim como o uso de aditivos, medidas de higiene, empacotamento e rotulagem dos produtos. Os métodos de análise da composição e de avaliação da qualidade protéica também encontram-se especificados.

No Brasil a regulamentação da formulação de leites infantis é ditada por normas do Ministério da Saúde (1989) que tomou por base as regras da Organização Mundial de Saúde (Codex Alimentarius, 1982). Os comitês de nutrição dos órgãos ESPGAN (europeu) e FDA (americano) apresentam quantidades-limites para a formulação industrial das fórmulas à base de leite de vaca, os quais diferem pouco entre si (TABELA 2).

2.2.2. Adequação das fontes protéicas ao uso infantil

O leite de vaca é a fonte protéica mais utilizada nas fórmulas infantis sendo a de melhor aceitabilidade. A soja surgiu como alternativa para a intolerância ao leite de vaca, tanto na hipersensibilidade às proteínas do leite quanto na intolerância à lactose, tendo sido introduzido em 1909 com esta finalidade (NICHOLS, 1988). Em 1983 a estimativa do uso do leite de soja na alimentação dos lactentes chegava a cerca de 10 a 15% do total de fórmulas nos Estados Unidos (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1983).

As fórmulas à base de soja evoluíram gradativamente e o refinamento industrial permitiu a eliminação de alguns fatores associados à soja. O adequado processamento

TABELA 2: Composição das fórmulas infantis de acordo com os diversos órgãos oficiais

Por 100kcal		À BASE DE LEITE DE VACA*			À BASE DE SOJA**
		ESPGAN (1977)	CODEX (1982)	FDA (1985)	ESPGAN (1990)
PROTEÍNAS (g)	min	1,8	1,8	1,8	2,25
	máx	2,8	4,0	4,5	3,0
LIPÍDIOS (g)	min	4,0	3,3	3,3	4,0
	máx	6,0	6,0	6,0	6,0
ÁCIDO LINOLÉICO (g)		a	0,3	0,3	0,3
VITAMINA A (UI)	min	250	250	250	250
	máx	500	500	750	500
VITAMINA D (UI)	min	40	40	40	40
	máx	80	80	100	80
VITAMINA E (UI)		0,7	0,7	0,7	0,7
VITAMINA K (UI)		4	4	4	4
TIAMINA (µg)		40	40	40	40
RIBOFLAVINA (µg)		60	60	60	60
VITAMINA B6 (µg)		35	35	35	35
VITAMINA B12 (µg)		0,15	0,15	0,15	0,15
NIACINA (µg)		250	250	250	250
ÁCIDO FÓLICO (µg)		4	4	4	4
ÁCIDO PANTOTÊNICO (µg)		300	300	300	300
VITAMINA C (mg)		8	8	8	8
COLINA (mg)		7	7	7	7
BIOTINA (µg)		1,5	1,5	-	1,5
INOSITOL (mg)		-	-	4,0	-
CÁLCIO (mg)		60	50	60	60
FÓSFORO (mg)		30	25	30	máx 30 min 50
MAGNÉSIO (mg)		6	6	6	-
FERRO (mg)	min	0,15	0,15	0,15	1,0
	máx	1,0	1,0	3,0	2,0
ZINCO (mg)		0,3	0,5	0,5	0,75
MANGANÊS (µg)		5	5	5	-
COBRE (µg)		30	60	60	-
IODO (µg)	min	5	5	5	-
	máx	30	60	60	-
SÓDIO (mg)	min	22	20	20	-
	máx	40	60	60	-
POTÁSSIO (mg)	min	b	80	80	-
	máx	b	200	200	-
COLORO (mg)	min	b	55	55	-
	máx	b	150	150	-

a - O ácido linoleico deve compor de 3 a 5% da ingesta calórica total

b - A soma das quantidades de sódio, cloro e potássio não deve exceder 50 mEq/l

* HURRELL *et alii*, 1989

** ESPGAN, 1990

industrial do isolado protéico de soja (base das fórmulas), culmina em um produto com score de aminoácidos corrigido pela digestibilidade, da ordem de 89% (ESPGAN, 1990).

A suplementação das fórmulas com L-metionina recomendada pelos órgãos oficiais (ESPGAN, 1990; ACADEMIA AMERICANA DE PEDIATRIA, 1983) foi necessária para a manutenção das concentrações da albumina plasmática e do balanço nitrogenado, assim como para garantir o crescimento (FOMON *et alii*, 1979). Em 1979, YOUNG & SCRIMSHAW demonstraram que a suplementação com L-metionina incrementava a retenção de nitrogênio em adultos se a ingesta total de proteínas da soja fosse insuficiente.

A ausência de lactose na composição das fórmulas à base de soja direciona o seu uso aos lactase-deficientes (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1983). É reconhecido que lactentes sadios e sem restrições dietéticas alimentados com fórmulas à base de soja suplementadas com metionina apresentam crescimento corpóreo, níveis de albumina plasmática e uréia sanguínea semelhantes aos de lactentes alimentados com fórmulas à base de leite de vaca (FOMON & ZIEGLER, 1979, citados por AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1983).

Na regulamentação das fórmulas com soja, a ESPGAN (1990) estabelece as situações específicas para seu uso: "reações adversas ao leite de vaca, necessidade do uso de dietas livres de lactose e/ou galactose e alternativa para os que evitam alimentação com proteína animal".

A composição das fórmulas base-soja diferem das base-leite de vaca por encerrarem maior quantidade protéica (2,25 a 3,0g/100Kcal), serem suplementadas com metionina (30mg/100Kcal) e não incluírem lactose. A taxa de hidratos de carbono é a mesma preconizada para outras fórmulas (8 a 12g/100Kcal). Os polímeros de glicose presentes na fórmula no lugar da lactose, desempenham a mesma facilitação na absorção de minerais à nível intestinal.

A fração protéica da maioria das fórmulas à base de soja é o isolado protéico de soja (IPS), produto com proteína purificada a 90% ou mais e isento de lipídios. A ESPGAN (1990)

oferece amplo limite de manipulação qualitativa das gorduras permitindo a adição de óleo vegetal de diversas fontes: girassol, algodão, milho, de côco, etc., com limites máximo e mínimo.

O leite de vaca "in natura" é inadequado para alimentação do lactente. Alguns fatores se destacam, quais sejam: baixa quantidade de Fe, perfil aminoacídico inadequado, alta taxa de

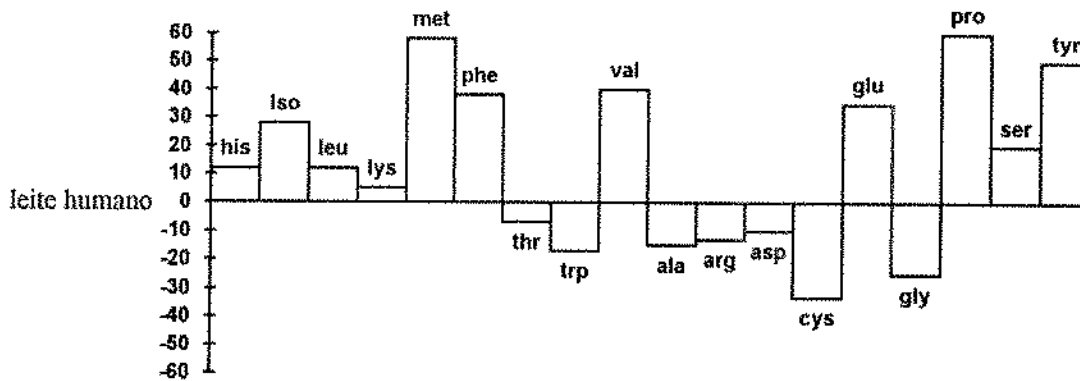


FIGURA 4: Aminograma do leite de vaca comparado ao do leite humano (FORSYTH, 1992)

proteínas e alta carga de solutos que requer trabalho renal extra (NICHOLS, 1988).

Conforme a FIGURA 4, as quantidades de aminoácidos essenciais do leite de vaca, à exceção do triptofano e treonina, são superiores às do leite humano em até 55% (MET). A toxicidade de certos aminoácidos não está clara mas há relação da hiperfenilalaninemia e hipermetioninemia com retardo mental e alterações neurológicas (DUTRA DE OLIVEIRA *et alii*, 1991).

Para compor a fórmula infantil, o leite de vaca deve sofrer alterações quantitativas nas taxas de proteínas, lipídios, hidratos de carbono e minerais, assim como um incremento nas quantidades de vitaminas e elementos traço. Também se modificarão qualitativamente os lipídios e a fração protéica (HURRELL *et alii*, 1989).

A restrita capacidade digestiva e absorptiva do lactente, a imaturidade renal para excretar os produtos do catabolismo protéico assim como para produzir álcalis e diminuir a ocorrência de acidose, são razões suficientes para induzir à diminuição da taxa protéica do leite de vaca quando se compõem as fórmulas infantís (ESPGAN, 1977; HURRELL *et alii*, 1989).

Com o conhecimento destes fatos, o leite de vaca "in natura" ou em pó, poderá ser modificado mesmo a nível doméstico. É recomendado que seja fervido (quando "in natura") e diluído "ao meio" ($\frac{1}{2}$ leite / $\frac{1}{2}$ água fervida) para lactentes até um mês de vida; a partir de então, poderá ser utilizado a $\frac{2}{3}$ ($\frac{2}{3}$ leite / $\frac{1}{3}$ água) até os 5 meses de idade. O leite de vaca em pó, integralizado a 15% (peso/volume), deve ser inicialmente utilizado na diluição de 7,5% até um mês de vida e a 10% de um a cinco meses. Após o quinto mês de vida, é prescrito leite integral. Deve haver a complementação do leite com 4 a 5% (peso/volume) de hidratos de carbono (dextrino-maltose ou sacarose e amido) e 1 a 2% (peso/volume) de óleo vegetal. A suplementação de minerais e vitaminas não é necessária quando o lactente está em uso de fórmula industrializada, sendo desejável que ocorra quando da alimentação com leite de vaca "in natura" diluído (CARRAZZA, 1991).

Não existem dados disponíveis sobre a frequência do uso de fórmulas no Brasil, e tampouco da utilização do tipo caseiro de leite de vaca "modificado", embora sua prescrição seja bastante disseminada.

Quanto ao formulado com leite modificado, o uso do soro desmineralizado nas fórmulas diminui o risco de desidratação e hipernatremia principalmente nos casos de maior demanda hídrica (febre, diarreia, etc) e/ou ingestão de água inferior a 150ml/Kg/dia (ESPGAN, 1977; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1979). Com a adição do soro, há a desejável reversão da relação entre proteínas do soro e caseína de 20:80 (originalmente no leite de vaca) para 60:40 (similar à do leite materno).

A fração lipídica do leite de vaca geralmente é substituída por uma mistura de óleos vegetais, objetivando assegurar fácil absorção, atendendo à recomendação da ESPGAN (1977) de suprir 3 a 6% das calorías em ácido linoléico.

2.2.3. Efeitos metabólicos da ingestão protéica elevada nos lactentes

A adequação quantitativa e qualitativa do percentual protéico das fórmulas tem sido objeto de preocupação de alguns autores que consideram a taxa protéica do leite humano como o limite mínimo aceitável para as fórmulas adaptadas. A preocupação dos pesquisadores com a alta oferta protéica nas fórmulas para lactentes advém da verificação de que as crianças alimentadas com estas fórmulas apresentam padrão aminoacídico e uréia do soro, distintos daqueles obtidos em crianças amamentadas (VOLTZ *et alii*, 1983; JANAS *et alii*, 1985; JÄRVENPÄÄ *et alii*, 1982; RÄIHÄ *et alii*, 1986).

O Simpósio sobre os "Limites Máximos de Nutrientes em Fórmulas Infantis", ocorrido em novembro de 1988 em Iowa, aborda a questão do alto aporte protéico a que são submetidos os lactentes em uso de fórmulas adaptadas. YOUNG and PELLETIER (1989) sustentaram que ocorre uma acomodação orgânica com aumento da produção de uréia e aumento do catabolismo de aminoácidos, devido ao incremento do "pool" enzimático decorrente da maior oferta protéica.

Se por um lado não se observam prejuízos no padrão de crescimento de crianças com ingesta protéica alta, também não há vantagem neste excesso (JÄRVENPÄÄ *et alii*, 1982; AXELSSON *et alii*, 1988). Os efeitos adversos a longo prazo da sobrecarga protéica em lactentes não são conhecidos na íntegra mas, de modo geral, destaca-se a ocorrência de alterações na maturação dos néfrons e na integridade da função renal. A acidose pode ocorrer nestes casos, sendo os aminoácidos sulfurados os principais responsáveis por grande parte do ácido não metabolizável que chega aos rins, os quais apresentam capacidade tamponante limitada. (ESPGAN, 1977).

O nitrogênio ureico urinário é o principal componente da carga de soluto renal que inclui também outras substâncias nitrogenadas como ácido úrico, creatina e creatinina, assim como sódio, cloro, potássio e fósforo. ZIEGLER & FOMON (1989) demonstraram que lactentes até 3 meses em uso de leite materno ou de fórmula adaptada apresentaram urina hipotônica (<280mOsm/kg) enquanto que os alimentados com leite de vaca a "2/3" produziram urina com 396 mOsm/Kg, considerada alta (TABELA 3).

A carga potencial de soluto renal calculada para fórmula contendo taxa protéica máxima de 4,5g/100kcal, permitida pela FDA, é de 41 mOsm para cada 100kcal ingeridas (41mOsm/100kcal), o que afeta o balanço hidro-eletrolítico (ZIEGLER & FOMON, 1989). Os autores recomendam que o limite superior da taxa protéica, estipulado pela FDA, para fórmulas à base de leite de vaca seja diminuída para 3,2g/100Kcal, com concomitante menor aporte de fósforo. Neste caso, a carga potencial de soluto renal seria de 33mOsm/100kcal ingeridas, menor do que a atual mas ainda maior do que a observada após alimentação com fórmula à base de soja (26mOsm/100kcal ingeridas).

YOUNG & PELLETIER (1989) também propõem a diminuição do máximo protéico de 4,5g/100Kcal para 3,5g/100Kcal nas fórmulas, já que a menor taxa protéica permite crescimento adequado e determina menor concentração plasmática de aminoácidos.

TABELA 3 - Osmolalidade urinária observada e calculada conforme o tipo de alimentação*

	OSMOLALIDADE URINÁRIA		
	CPSR ¹ mOsmol/l	Calculada ² mOsmol/kg	Observada ³
Leite humano	93	120	157
Fórmula base leite de vaca ^a	155	244	235
Fórmula base soja ^b	177	288	-
Leite de vaca diluído à "2/3"	204	342	396
Limite máximo da FDA	277	488	-
Leite de vaca integral	308	550	-

*ZIEGLER & FOMON, 1989

1 - Carga potencial de soluto renal

2 - Cálculo considerando ingestão de 0,82l/dia, solutos para crescimento de 27mOsmol/dia, perda hídrica extrarenal de 0,37 l/dia e diurese de 0,41 l/dia.

3 - Dados obtidos a partir de crianças de 30 a 90 dias de idade (JANOVSKY *et alii*, citado por ZIEGLER & FOMON, 1989)

a - 2,2g de proteína/100kcal

b - 2,8g de proteína/100kcal

RÁIHÁ (1985) já havia sugerido a reavaliação dos requerimentos de proteína pelos órgãos oficiais, principalmente até o 6º mês de vida. O autor refere trabalhos de WHITEHEAD e HOFVANDER os quais demonstram diminuição na ingestão de leite materno de 180 ml/kg/dia para 130ml/kg/dia do 1º para o 3º mês de vida, diminuindo ainda

mais no 5º mês (115ml/kg/dia). Partindo da premissa que a quantidade de proteína nutricional disponível no leite humano seja de 0,7g/100ml, RÄIHÄ (1985) pressupõe um consumo aproximado de 1,3 a 0,9g de proteína/kg/dia durante o 1º e o 3º mês respectivamente.

As fórmulas adaptadas encerram em média 1,5g de proteína/100ml, o que, em um lactente que ingere 170 a 180ml/kg/dia durante os primeiros meses de vida (RÄIHÄ, 1985), significa o aporte de 2,7g de proteína/kg/dia, aparentemente excessivo.

A elevação da uréia sérica foi relatada por FOMON (1976), no soro de lactentes com até seis meses de idade quando alimentados com fórmulas contendo 20% das calorias provenientes de proteínas. Este dado metabólico pode ser encarado como variável relacionada com ingesta protéica excessiva ou como inadequação da biodisponibilidade da proteína do leite de vaca, sendo um parâmetro mais confirmatório do que definitivo da qualidade/quantidade protéica ingerida (DAVIES & SAUNDERS, 1973; JANSEN, 1981; AXELSSON *et alii*, 1987).

A quantidade e a qualidade da proteína dietética influenciam de modo diverso a resposta da uréia sanguínea. EGGUM (1970) demonstrou correlação inversa entre o balanço nitrogenado de ratos jovens e os níveis de uréia sanguínea. TAYLOR *et alii*, (1974) encontraram também a mesma relação entre a uréia sanguínea e o NPU em experimentos com humanos adultos jovens cujo consumo protéico variou de 0,2 a 0,7g/kg/dia de proteínas de qualidades diversas.

JANSEN (1981) relata experimento em humanos de BODWELL no qual as dietas eram isonitrogênicas de diversas fontes, e houve correlação negativa entre o NPU (Utilização Líquida de Proteína) e a uréia sanguínea, confirmando os trabalhos anteriores. A adição de metionina à fórmula à base de soja (2,25 g de proteína/100 Kcal) resultou em menor taxa uréica sanguínea em lactentes de 28 a 112 dias de vida quando comparada com a de grupo não suplementado (FOMON *et alii*, 1979). Neste mesmo estudo o crescimento e a retenção de nitrogênio não variou entre os dois grupos, ressaltando a uréia sérica como o indicador de qualidade protéica mais viável em estudos de pequena duração.

A relação entre proteínas do soro e caseína nas fórmulas adaptadas determinam perfis diferentes de uréia sanguínea em lactentes. JÄRVENPÄÄ *et alii* (1982) estudaram a resposta urêmica de 60 recém-nascidos a termo a dietas com 2,2g de proteína /100Kcal. Um grupo recebeu fórmula cuja relação entre proteínas do soro:caseína era 60:40 e o outro, 18:82. Na 12ª semana a ureia sérica do segundo grupo foi maior, tendo havido uma tendência ao declínio a partir da 8ª semana do experimento, sendo que nos lactentes em uso de leite humano, o decréscimo iniciou-se na segunda semana.

JANAS *et alii* (1985) demonstraram aumento da uréia sérica nos lactentes em uso de fórmulas à base de soro de leite e à base de caseína. A diferença foi de 37% e 30% respectivamente quando comparava-se a 8ª semana com a 2ª semana de alimentação. No grupo em uso de leite materno houve um decréscimo de 26,41% no mesmo período. Este comportamento que varia pouco (JANAS *et alii*, 1985, RÄIHÄ *et alii*, 1986) baseia-se na fisiologia da lactação que determina pequena flutuação dos níveis protéicos do leite humano ao longo do período de lactação (NOMMSEN *et alii*, 1991).

Os valores de nitrogênio uréico plasmático não mostraram diferença estatística significativa na 4ª e 8ª semana de vida de lactentes em uso de fórmulas à base de leite de vaca (1,8g de proteína/100Kcal) cujas relações entre proteínas do soro e caseína eram 18:82, 34:66 e 50:50 (JANAS *et alii*, 1987).

O perfil de aminoácidos livres no plasma sofre influências do sexo, idade, exercício físico, taxa de hidratos de carbono da dieta, taxa protéica, qualidade protéica, período do dia (JENSEN, 1981), assim como da maturidade fisiológica e da velocidade de crescimento (SCOTT *et alii*, 1985). A concentração dos aminoácidos no plasma é resultado da ingesta dietética e de complexo controle interno, hormonal e enzimático (YOUNG & PELLETIER, 1989).

A manipulação da quantidade e qualidade protéica de fórmulas infantis acarreta variações nos níveis de aminoácidos no plasma de lactentes cujas consequências a longo prazo ainda são desconhecidas. O limite de aceitação para os diferentes tipos de resposta à esta manipulação é influenciado por questões tais como repercussão no sistema nervoso central,

comprometimento da função renal e desbalanço hormonal com possível modificação na taxa de crescimento tissular e maturação celular (YOUNG & PELLETIER 1989).

O padrão aminoacídico do soro de crianças alimentadas com leite humano é considerado o ideal e os estudos que envolvem oferta protéica variada, qualitativa e quantitativamente, realizados com lactentes, mantêm esse grupo como referência. Na TABELA 4 são apresentados alguns dados de literatura que traduzem as alterações nos perfis de aminoácidos plasmáticos de lactentes em uso de fórmulas, as quais diferem na taxa e no tipo de proteína. Todos os autores compararam o aminograma plasmático de jejum deste grupo com o de crianças alimentadas com leite humano.

As quantidades de aminoácidos livres presentes no leite de vaca e no leite humano diferem, espelhando respostas plasmáticas diferentes. No leite humano a taurina é o terceiro aminoácido mais abundante na forma livre e o que se observa na maior parte dos trabalhos são baixos valores plasmáticos de taurina nos lactentes em uso de fórmulas. A alimentação artificial oferece taxas superiores de fenilalanina, metionina e isoleucina e menores de triptofano quando comparados ao leite humano o que, segundo JANAS *et alii*, (1987) reflete no soro. As explicações para a baixa quantidade de triptofano passam pela menor ingestão e absorção das proteínas ricas neste aminoácido presentes nas fórmulas e o efeito da insulina sobre os níveis plasmáticos (LONNERDAL & ZETTERSTRÖM, 1988).

As taxas séricas elevadas de aminoácidos ramificados e treonina, são explicadas por JANAS *et alii*, (1985) pela capacidade limitada de captação da pequena massa muscular do lactente. Segundo SCOTT *et alii*, (1985), as taxas de treonina e alanina elevadas deveram-se às quantidades 20% e 19% superiores, respectivamente, presentes nas fórmulas pesquisadas.

TABELA 4 - Alterações no aminograma plasmático de lactentes em uso de fórmulas lácteas quando comparados aos de lactentes amamentados.

Quantidade protéica g/100ml	Relação entre proteínas do soro e caseína	Alteração individual dos aminoácidos	período de idade estudado	período de jejum	Autor/Ano
1,5	60:40	↑ THR, TYR, PHE, VAL, LEU, ILE ↓ TAU	5 dias	2h	JÄRVENPÄÄ <i>et alii</i> , 1982
1,57	18:82	↑ THR, TYR, PHE, VAL, LEU, ILE ↓ ↓ TAU	12 semanas		
	60:40	Não existiram diferenças significativas	3 dias a 16 semanas	1h	VOLTZ <i>et alii</i> , 1983
1,5	60:40	↑ THR, ácido aspártico, ALA ↓ aminoácidos ramificados	0 a 7 semanas	4h	SCOTT <i>et alii</i> , 1985*
	18:82	↑ PHE, HIS			
1,5	60:40	↑ VAL, ILE, LEU, MET, PHE, THR, LYS	2 a 8 semanas	2h	JANAS <i>et alii</i> , 1985
	18:82	↑ VAL, MET, PHE ↓ TAU			
1,25	60:40	↑ HIS, LYS, THR, VAL, LEU, ILE ↓ TAU	0 a 12 semanas	2-3h	RAIHÄ <i>et alii</i> , 1986
1,65	60:40	↑ HIS, LYS, THR, VAL, LEU, ILE ↓ TAU			
	18:82	↑ PHE, MET, ILE ↓ LEU, TAU, TRP	0 a 8 semanas	2-3h	JANAS <i>et alii</i> , 1987
1,2	34:66	↑ PHE, MET, ILE ↓ LEU, TAU, TRP			
	50:50	↑ PHE, MET, ILE ↓ LEU, TAU, TRP			
1,9	50:50	↑ VAL, LEU, ILE ↑ PHE, TYR, MET, PRO, LYS, TRP, THR ↓ TAU	16 a 24 semanas	3-4h	AXELSSON <i>et alii</i> , 1988
2,7	20:80	↑ VAL, LEU, ILE ↑ PHE, TYR, MET, PRO, LYS, TRP, THR ↓ TAU			
1,3	50:50	↑ ARG, LYS, PHE, VAL, ILE, THR	16 a 24 semanas	1h	AXELSSON <i>et alii</i> , 1988
1,8	50:50	↑ ARG, LYS, LEU, PHE, VAL, ILE, THR			
1,3	55:45	↑ THR	0 a 8 semanas	3h	LÖNNERDAL & CHEN, 1990
1,4		↑ THR, ↑ VAL, ILE, ALA, GLY			
1,2		↑ THR			
1,3	60:40	↑ THR			
1,2	20:80	↑ ALA, GLY ↓ TRP			

*A comparação foi feita entre os aminogramas plasmáticos consequentes à alimentação com as duas fórmulas e não com o do leite humano.

A dificuldade na interpretação dos valores aminoacídicos do plasma tem pouca confiabilidade quando se avalia a adequação protéica da dieta. YOUNG & PELLETIER (1989) questionam se o aumento da concentração de aminoácidos no plasma de lactentes alimentados com fórmulas representa uma adaptação metabólica sem consequências adversas ou uma acomodação, estado que garante a sobrevivência do lactente mas podendo acarretar danos ou perdas de algumas funções.

2.3. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO IN VIVO DA UTILIZAÇÃO PROTÉICA

2.3.1. Crescimento pondero-estatural

O crescimento infantil é um critério universalmente utilizado na avaliação da adequação da dieta. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o uso de cartões nos quais percentis de peso e altura são facilmente localizados: o ideal é que um lactente evolua dentro ou acima dos percentis nos quais se enquadrava ao nascimento (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1991).

A demanda potencial de nutrientes essenciais é alta nos seis primeiros meses de vida, quando a velocidade de crescimento é acelerada, fazendo com que as necessidades calórica e protéica sejam as mais altas de todos os períodos de vida. O custo energético do crescimento dependerá tanto da composição do tecido em formação quanto da velocidade do próprio crescimento (O'DONNELL, 1986).

Os requerimentos energéticos para o crescimento consomem, até os quatro primeiros meses de idade, um terço de toda a ingestão calórica pois 40% do peso ganho é composto por lipídios, cujo custo energético para formação é cerca de cinco vezes o custo para síntese de tecido magro (O'DONNELL, 1986). De forma esquemática, FOMON (1976) demonstra o declínio do percentual calórico destinado ao crescimento, desde o nascimento até os três anos de idade (FIGURA 5) levando em consideração os diferentes custos de produção de proteínas

e lipídios. Mesmo com o aumento progressivo da ingestão calórica, a parcela desta para o crescimento vai paulatinamente diminuindo.

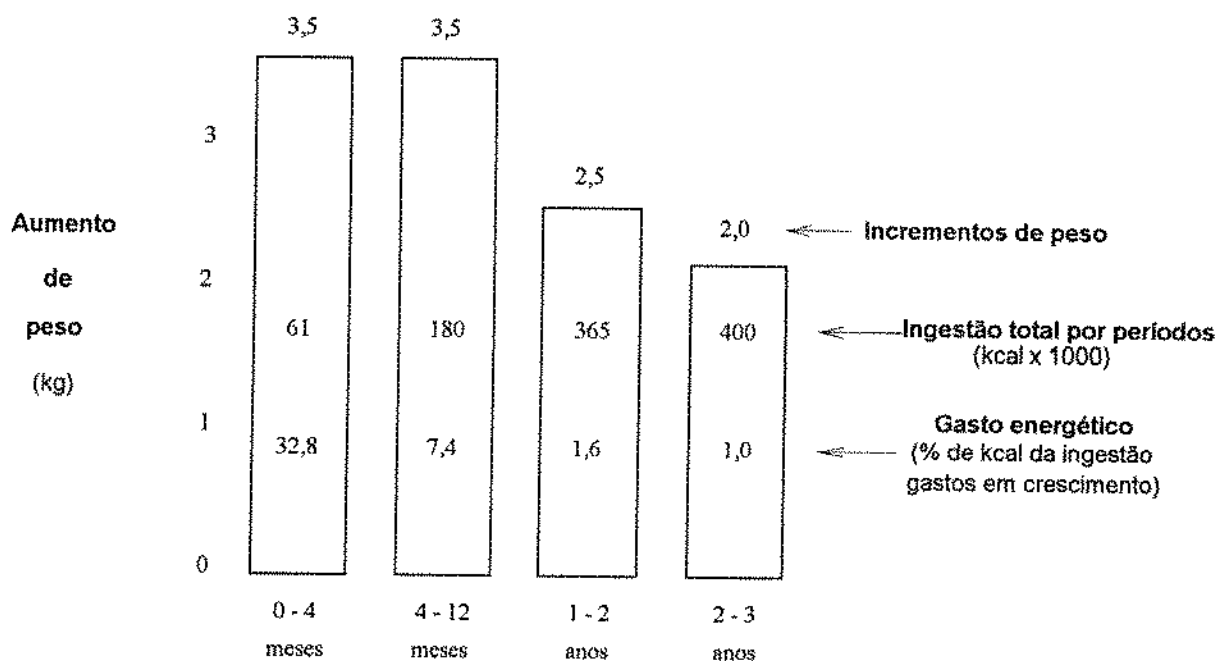


FIGURA 5. De cima para baixo, seguem-se os incrementos de peso, os valores totais de ingestão calórica e os gastos energéticos destinados ao crescimento, todos relacionados aos períodos especificados na base de cada barra (FOMON, 1976).

Seguindo o mesmo raciocínio, o percentual da proteína ingerida que será requerido para o crescimento diminui com a progressão da idade, sendo da ordem de 45% para a faixa de 0-4m e de 11% no período de 12 a 24m (O'DONNELL, 1986). A taxa de aumento ponderal e o próprio tamanho corporal são variáveis às quais o requerimento protéico está vinculado (FOMON, 1976).

A alimentação com fórmula adaptada pode ser responsável por 95% a 100% da ingestão calórica total do lactente até os 3,5 meses de vida (KÖHLER *et alii*, 1984), fato que justifica a preocupação quanto à adequada composição dos produtos em relação ao crescimento ótimo.

A comparação entre o crescimento de crianças alimentadas com leite humano com o de crianças alimentadas com fórmulas adaptadas é empregado como base de avaliação da

qualidade destas fórmulas. A ingestão de proteínas é um determinante maior do potencial de crescimento do que a ingestão calórica (MOTIL, 1988); a qualidade protéica tem portanto papel fundamental na manutenção e regulação do processo de desenvolvimento.

Em estudo clássico com lactentes de 8 a 112 dias de idade, FOMON *et alii* (1970) demonstraram que não houve diferença significativa entre os ganhos de peso e estatura de crianças alimentadas ao seio materno em relação às crianças alimentadas com fórmulas que encerravam 67kcal/100ml e com conteúdo protéico variando de 1,1 a 2,1g/100ml.

VOLTZ *et alii* (1983) também não acharam diferenças significativas (ao nível de 5%) quando estudaram a taxa de crescimento de lactentes de 3 a 112 dias de idade, nascidos a termo e alimentados com leite humano ou com fórmulas à base de proteínas do soro de leite (relação 60:40). Anteriormente JÄRVENPÄÄ *et alii* (1982), utilizando fórmula com a mesma proporção de proteínas (60:40) e mesma taxa protéica (1,5g proteína/100ml), relataram não haver diferença estatisticamente significativa entre ganho ponderal, circunferência cefálica e estatura de crianças nascidas a termo em uso deste tipo de fórmula ou em aleitamento.

Outros autores, entretanto, ao compararem a evolução antropométrica de crianças submetidas a diferentes regimes dietéticos mostraram taxas de crescimento maiores nas crianças alimentadas com fórmulas lácteas derivadas do leite de vaca, com 1,8g de proteína/100ml (RÄIHÄ *et alii*, 1986; AXELSSON *et alii*, 1989). As fórmulas foram comparadas a outras com menor taxa protéica, isocalóricas. O fato de encerrarem maior quantidade de aminoácidos insulino-estimulantes (ARG, LYS, VAL, LEU, ILE, THR) pode explicar o melhor desempenho das mesmas devido ao papel anabólico da insulina.

LÖNNERDAL & CHEN (1990) relataram similaridade no perfil de crescimento de crianças alimentadas com leite humano e com fórmulas adaptadas. A taxa protéica variava entre 1,3 e 1,5g/100ml e a relação proteína do soro e caseína foi 55:45. O melhor índice de peso ganho (em g) por estatura foi observado em lactentes alimentados com fórmulas contendo 1,4g de proteína/100ml.

As fórmulas cuja fonte protéica é a soja, demonstraram ser substitutas aceitáveis do leite materno e das fórmulas à base de leite de vaca. No gráfico (FIGURAS 6 e 7) elaborado a partir de estudo de crescimento de lactentes até 6 meses em uso de leite materno, leite de vaca e leite de soja suplementado com metionina, apresentado por SELLARS *et alii* (1971), não se demonstram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, sendo seus dados comparáveis aos do padrão de crescimento utilizados à época (Iowa Growth Norms) elaborados com medidas tomadas entre 1926 e 1940 (SELLARS *et alii*, 1971).

Mesmo que alguns trabalhos apontem para uma velocidade de ganho de peso menor por unidade de energia consumida nos lactentes em uso de leite à base de soja (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1983), seu crescimento é satisfatório, demonstrando ser o isolado protéico de soja suplementado, equivalente às fórmulas adaptadas à base de leite de vaca na promoção do crescimento (JUNG & CARR, 1977; KÖHLER *et alii*, 1984).

2.3.2. Parâmetros bioquímicos

A avaliação completa do status protéico no organismo requer a conjunção das medidas antropométricas, bioquímicas e clínicas, assim como indicadores indiretos do estado nutricional. Cada indicador oferece vantagens e limitações, o que restringe o seu uso isolado na determinação do perfil nutricional. A avaliação bioquímica é objetiva e quantitativa (YOUNG *et alii*, 1990), sendo importante na detecção precoce de carências nutricionais específicas, o que favorece a adequada intervenção nutricional (O'DONNELL, 1986).

A uréia é um indicador clínico útil na determinação da ingestão protéica recente pelo lactente, como já discutido anteriormente. A influência do percentual calórico da dieta proveniente de proteínas na taxa da uréia sanguínea foi demonstrada por FOMON (1976) através de dados de uréia sérica inferiores em lactentes amamentados quando comparadas com o de crianças alimentadas com fórmulas à base de leite de vaca. FOMON concluiu que tanto a

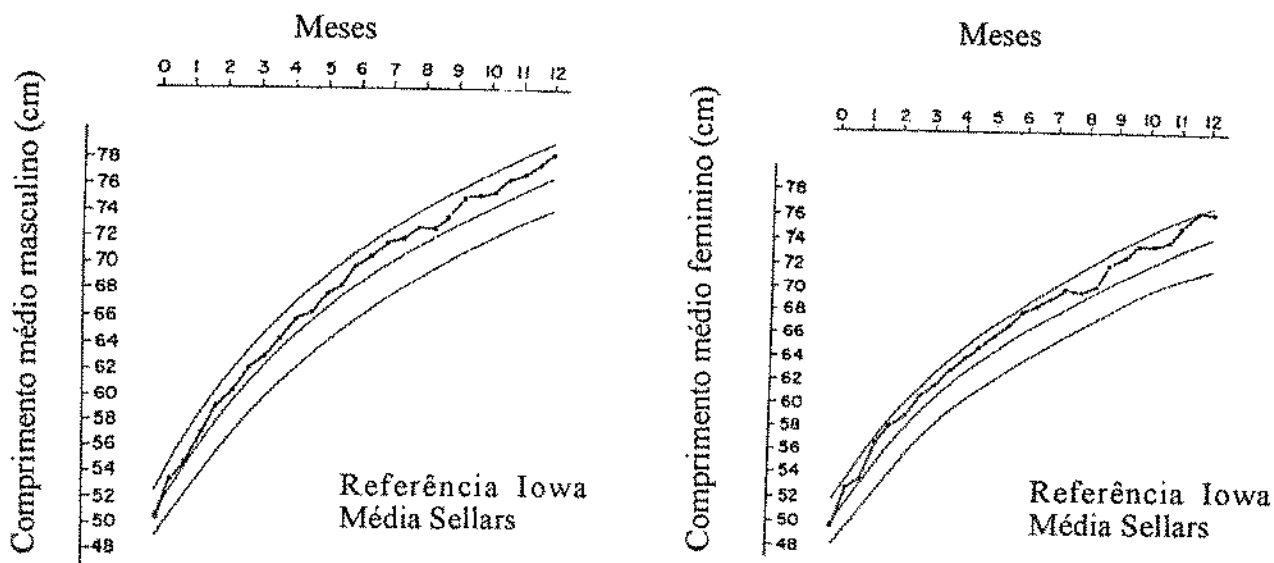


FIGURA 6. Evolução estatural de crianças alimentadas com fórmula à base de soja suplementada com metionina. Comparação entre os valores de médios obtidos no estudo de Sellars (1971) com os valores médios da "Referência Iowa".

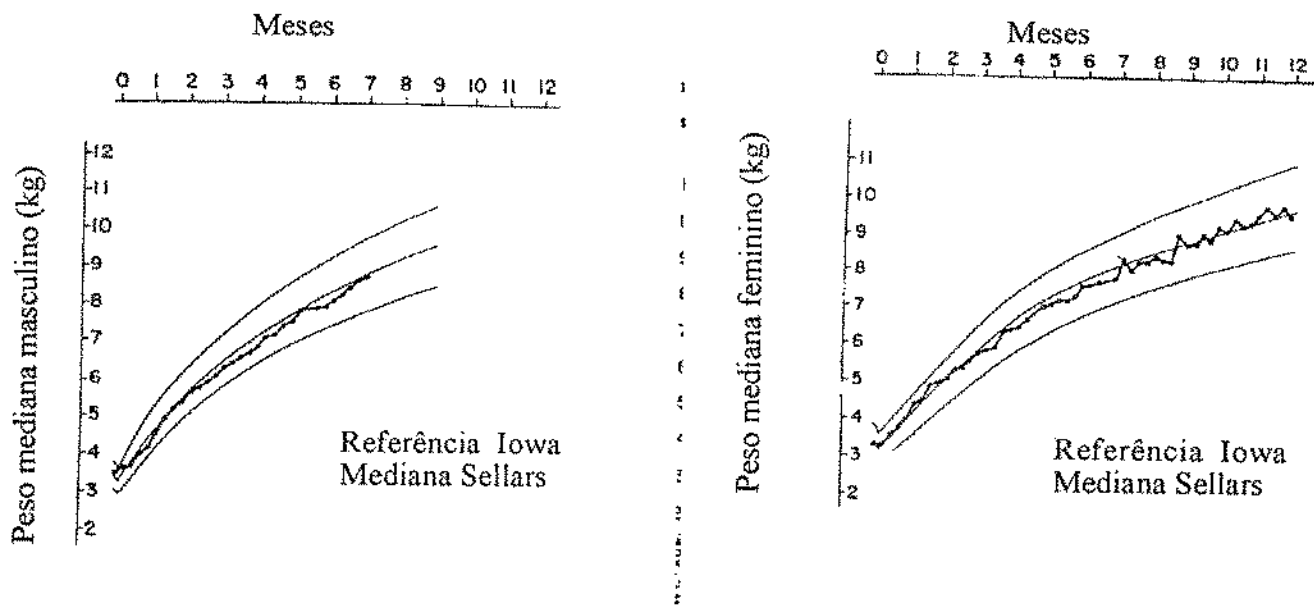


FIGURA 7. Evolução ponderal de crianças alimentadas com fórmula à base de soja suplementada com metionina. Comparação entre os valores de mediana obtidos no estudo de Sellars (1971) com os valores de mediana da "Referência Iowa".

menor quantidade protéica do leite humano quanto sua qualidade (espécie-específica) exercem influência na taxa sanguínea de uréia, fato corroborado por outros autores (LÖNNERDAL & CHEN, 1990).

Já em 1959, LONGENECKER & HAUSE publicaram que as flutuações nos níveis dos aminoácidos plasmáticos são diretamente dependentes da composição da proteína ingerida. Hoje é de domínio geral que as concentrações plasmáticas dos aminoácidos refletem a qualidade e também a quantidade de proteína ingerida havendo ainda influência da velocidade de crescimento (YOUNG & PELLETIER, 1989).

2.3.3. Ensaio biológico

Os ensaios biológicos com animais compõem a bateria de testes realizada com fórmulas infantis, os quais, naturalmente precedem os testes com lactentes. Dentre os modelos de ensaios, a Razão de Eficiência Protéica ou PER (Protein Efficiency Ratio) é o recomendado pela A.O.A.C (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS) (1975) e avalia a qualidade da proteína dietética através da medida do ganho ponderal relativo à ingestão protéica (NICHOLS, 1988). Outra avaliação pode ser feita com a Razão de Proteína Líquida ou NPR (Net Protein Ratio), um método modificado do PER que inclui a perda de peso de um grupo de animais em dieta aprotéica. A quantidade de proteínas necessária para evitar determinada perda ponderal é equivalente àquela utilizada pelo organismo para manutenção (McLAUGHLAN, 1972).

O método PER enfatiza o crescimento, enquanto que o NPR considera também as necessidades protéicas para manutenção, o que faz do NPR um método mais adequado de avaliação quando se trabalha com ratos, os quais apresentam taxa de velocidade de crescimento maior do que a de crianças. Quantidades maiores de aminoácidos essenciais são requeridas pelos animais para atender a esta necessidade, podendo assim haver uma superestimação quando se faz a análise do PER de determinada proteína.

As críticas ao uso do PER como indicador da qualidade protéica repousam na desconsideração da quantidade de proteína utilizada para manutenção, na desproporcionalidade entre os valores de PER de proteínas de diversas fontes, na pouca precisão, na má reprodutibilidade e alto custo (PELLET & YOUNG, 1980; SARWAR *et alii*, 1984; SARWAR *et alii*, 1989b). Ainda assim é o método oficial da A.O.A.C. (1975), adotado pela FDA (YOUNG & PELLET, 1991) e pela FAO para avaliar fórmulas infantis (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1982).

A utilização de outros métodos de avaliação protéica com ensaio biológico permite melhor acuidade e menor variabilidade dos resultados (SARWAR & McLAUGHLAN, 1981). RPER e RNPR são respectivamente valores de PER e NPR relacionados com controles alimentados à base de caseína, os quais representam o valor máximo referencial (100%). O método RPNR tem sido adotado por vários autores (HAPPICH *et alii*, 1984 e SARWAR *et alii*, 1984) os quais demonstraram ser mais econômico, permitindo dados mais precisos e tendo melhor reprodutibilidade do que o PER. Segundo os autores, são razões suficientes para que o recomendem à adoção oficial pela A.O.A.C. como alternativo ao PER (JANSEN, 1981, SARWAR & McDONOUGH, 1990).

O RPER mínimo recomendado para fórmulas infantis pela FAO/WHO (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1982), é 85%, utilizando-se a caseína como proteína de referência. A mesma Comissão permite que as legislações regionais modifiquem o valor mínimo para qualidade de proteína (RPER) e o máximo para quantidade de proteínas nas fórmulas, segundo condições e necessidades locais. Nos Estados Unidos, por exemplo, proteínas com valores de RPER (caseína referência) abaixo de 70% não podem ser utilizadas na elaboração de fórmulas infantis (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1976). Os padrões canadenses estipulam 85% como ponto de corte para o PER de fórmulas infantis, relativo à caseína. As fórmulas à base de proteína de soja só se enquadram no perfil da FAO/WHO quando suplementadas com metionina.

A diminuição no tempo de ensaio para 2 semanas na determinação do PER (oficialmente executado em 28 dias) foi recomendado por alguns autores (KEITH *et alii*,

1977; HACKLER, 1977) sem prejuízo na precisão e com ganho no custo operacional e no tempo. Em ensaio utilizando fórmulas infantis como fonte protéica, HARRIS & BURNS (1988) mostraram resultados de PER de 2 semanas e PER oficial similares, principalmente quando comparados os respectivos RPER.

A Digestibilidade é um método que se baseia em balanço metabólico, já que considera a ingestão e a excreção de nitrogênio. SARWAR (1987) elaborou uma revisão acerca da Digestibilidade protéica e da biodisponibilidade dos aminoácidos e demonstrou, através da compilação de alguns trabalhos, que a digestibilidade de proteínas como caseína e isolado protéico de soja medidas em ensaios com humanos e com animais eram similares.

Como método complementar, a Digestibilidade verdadeira foi escolhida por SARWAR *et alii* (1989b) para avaliar a qualidade de proteínas de fórmulas infantis, líquidas e em pó. O propósito do trabalho foi o de averiguar a adequação das taxas protéicas das fórmulas visto que o processamento térmico afeta a biodisponibilidade de alguns aminoácidos. As maiores perdas nutricionais foram observadas nos preparados em base líquida pois sofrem tratamento térmico mais acentuado, quando comparados com as fórmulas em pó.

Quanto diminuir em proteína de uma fórmula a ponto de não prejudicar a oferta de aminoácidos essenciais para o crescimento infantil foi o objetivo de SARWAR *et alii* (1989b). As fórmulas utilizadas foram as disponíveis nos mercados canadense e norte-americano. Eles concluíram que tanto a Digestibilidade como o RPER e RNPR foram inferiores para as fórmulas líquidas, indício de dano protéico pela provável ocorrência da reação de Maillard.

Os pesquisadores seguem à busca de formas adequadas para a determinação da qualidade da proteína de uma dieta. O Comitê Codex de Proteínas Vegetais (CCVP) da FAO/WHO recomendou em 1989 o índice de Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos (PD-CAS) para avaliar a qualidade de proteínas de origem vegetal. O Comitê de Peritos da FAO/WHO (citado por YOUNG & PELETT, 1991) concluiu em 1990 que o PD-CAS representa o método mais adequado para avaliar a qualidade protéica dos alimentos em geral e das fórmulas infantis. A maior vantagem do método está na detecção do aminoácido limitante da proteína em estudo, permitindo uma intervenção tecnológica e

nutricional mais precisa. Para as fórmulas infantis, o padrão de requerimentos de aminoácidos sugeridos pela FAO/WHO/UNU para lactente deve ser a referência para o cálculo do escore químico (SARWAR & McDONOUGH, 1990).

As limitações qualitativas das proteínas à base de leite de vaca ou de proteína vegetal são sobrepujadas pela maior quantidade de proteína nas fórmulas. O questionamento sobre as consequências desta compensação alerta os pesquisadores do ramo industrial para o fato de que qualquer tentativa na alteração da taxa protéica das fórmulas infantis deve ser criteriosamente avaliada e que ensaios biológicos com animais de laboratório devem ser realizados e repetidos antes dos testes clínicos com lactentes (HANSEN *et alii*, 1988).

3. OBJETIVOS

Avaliar a qualidade protéica de duas fórmulas infantis disponíveis no mercado brasileiro, uma à base de proteínas do soro de leite de vaca e outra à base de proteína isolada de soja, aplicando testes nutricionais oficiais e coadjuvantes através de ensaio biológico com ratos.

Determinar uréia, creatinina e lipídios totais séricos, aminograma plasmático e hemograma dos animais ao final do experimento como exames complementares à avaliação protéica.

Apresentar, através de revisão bibliográfica, o estado da arte das fórmulas infantis e analisar em que pontos da nutrição o produto industrializado distancia-se do leite da espécie humana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. FONTES PROTÉICAS

Seguindo o objetivo de testar a qualidade protéica de duas fórmulas comerciais para lactentes, foram material de estudo os seguintes produtos:

- Uma fórmula láctea comercial à base de soro desmineralizado de leite de vaca integral, com proporção proteínas do soro e caseína de 60:40* . Esta fórmula comercial será denominada Produto 1 neste trabalho.

- Uma fórmula não láctea comercial à base de isolado protéico de soja suplementada com L-metionina e taurina. Será nominada Produto 2** .

As fontes protéicas das duas dietas experimentais provieram unicamente dos dois produtos acima descritos. A caseína comercial foi empregada como fonte proteica para as dietas controle de cada grupo experimental.

4.2. ANIMAIS

No ensaio com as dietas lácteas utilizou-se 30 ratos machos albinos isogénéticos, da linhagem Wab-Not, SPF (Specific Pathogen Free), com 25 dias de idade e peso médio de

* Trata-se do produto comercial NAN1, destinado a lactentes de 0 a 6 meses de idade, produzido pela NESTLÉ Industrial e Comercial Ltda, Porto Ferreira, São Paulo, Brasil.

** O produto em questão é o PROSOBEE, produzido pela Mead-Johnson & Company, Belleville, Canadá, importado e rotulado no Brasil.

45,3g±8,2, oriundos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, procedentes de matrizes de Nottingham, Inglaterra.

No ensaio com as dietas não lácteas foram utilizados 30 ratos machos albinos heterogênicos, da linhagem Wistar, SPF, com 23 dias de idade, peso médio de 53,3g±8,5, também provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP. Foram originados de matrizes do Instituto Central de Acasalamento de Animais de Laboratório, Hanover, Alemanha, chegando à UNICAMP em 1987.

4.3. ENSAIO BIOLÓGICO

4.3.1. Preparo dos animais

Um lote de 30 animais recém desmamados foi recebido, pesado e colocado em gaiolas metálicas individuais. Os ratos foram adaptados durante dois dias, com água e alimento *ad libitum*; a seguir foram distribuídos primeiramente em grupos com médias de peso semelhantes, recebendo as respectivas dietas do experimento. Após o período de adaptação, selecionou-se grupos de 10 animais por dieta de modo que os pesos de cada grupo fossem semelhantes pelo valor do desvio-padrão da média de peso do lote. A temperatura do ambiente foi mantida a $\pm 22^{\circ}\text{C}$ e a iluminação foi de ciclos de luz/escuridão de 12 horas. O peso e o consumo alimentar dos animais foi registrado a cada dois dias. Ao final do período, as fezes foram coletadas, secas em estufa, pesadas, moídas e analisadas quanto ao teor de nitrogênio.

4.3.2. Preparo das dietas

As formulações apresentadas nas TABELAS 5 e 6 foram construídas de modo a constituírem as dietas testes destinadas a aplicação dos testes nutricionais: PER (RPER%), NPR (RNPR%) e Dv%. Para tanto foram ajustadas de modo a conterem 8% das proteínas teste e os demais ingredientes acompanharam a composição básica de formulados para lactentes.

Neste trabalho, PSV denominará a dieta experimental formulada com o Produto 1 e IPS com o Produto 2. Os apêndices 18 e 19 discriminam as quantidades de ingredientes utilizadas em cada dieta.

TABELA 5 - Formulação da dieta láctea e controles utilizadas no ensaio biológico*

COMPONENTE	PSV ^a	CTL/psv ^b	ATP/psv ^c
		g/%	
Proteína	8	8	-
Carboidratos			
Lactose	39	39	39
Sacarose	12,0	10,9	20,9
Amido	10,4	10,4	10,4
Gorduras			
Óleo de milho	10,0	10,0	10,0
Gordura de côco	10,0	10,0	10,0
Mistura mineral AIN-76	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica AIN-76	1,0	1,0	1,0
Bitartarato de colina	0,2	0,2	0,2
L-metionina	0,2	0,2	-
Celulose	5,0	5,0	5,0
Energia (kcal)	460,0	460,0	460,0

*SARWAR *et alii*, (1989b)

a - PSV: dieta cuja fonte protéica constou do produto 1, à base de soro desmineralizado de leite de vaca e leite de vaca integral.

b - CTL/psv: dieta controle, à base de caseína suplementada com metionina.

c - ATP/psv: dieta aprotéica.

TABELA 6. Formulação da dieta não-láctea e controles utilizados no ensaio biológico*

<i>COMPONENTE</i>	<i>IPS^a</i>	<i>CTL/ips^b</i> g/%	<i>APT/ips^c</i>
Proteína	8	8	-
Carboidratos			
Dextrino-maltose	19,7	19,03	19,76
Sacarose	19,7	19,04	23,78
Amido	19,7	19,03	23,76
Gorduras			
Óleo de milho	14,0	14,0	14,0
Óleo de côco	14,0	14,0	14,0
Mistura mineral AIN-76	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica AIN-76	1,0	1,0	1,0
L-metionina	0,2	0,2	-
Bitartarato de colina	0,2	0,2	0,2
Energia (kcal)	520,0	520,0	520,0

* As taxas lipídicas seguiram orientação de MITCHELL & JENKINS, (1985).

a - IPS: dieta cuja fonte protéica é o produto 2, à base de isolado protéico de soja suplementado com metionina.

b - CTL/ips: dieta controle, à base de caseína suplementada com metionina.

c - APT/ips: dieta aprotéica.

TABELA 7. Mistura vitamínica AIN-76, segundo o AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977.

<i>Vitamina</i>	<i>Quantidade por quilograma de mistura</i>
Tiamina.HCl, mg	600
Riboflavina, mg	600
Piridoxina.HCl, mg	700
Ácido nicotínico ^a , g	3
D-Pantotenato de cálcio, g	1,6
Ácido fólico, mg	200
D-Biotina, mg	20
Cianocobalamina (vitamina B ₁₂), mg	1
Retinil palmitato ou acetato (vitamina A)	+b
DL- α -tocoferil acetato (vitamina E)	+c
Colecalciferol (vitamina D ₃), mg	2,5 ^d
Menaquinona (vitamina K) ^e , mg	5,0
Sacarose, q.s.p.	1000g

a - ou Nicotinamida.

b - Como pó estabilizado para prover 400.000 UI de atividade de vitamina A ou 120.000 equivalentes de retinol.

c - Como pó estabilizado para prover 5.000 UI de atividade de vitamina E.

d - 100.000 UI. Pode ser na forma de pó.

e - Menadiona.

TABELA 8. Mistura mineral AIN-76, segundo AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977.

<i>Ingrediente</i>	<i>g/kg de mistura</i>
Fosfato de cálcio dibásico (CaHPO ₄)	500,0
Cloreto de sódio (NaCl)	74,0
Citrato de sódio monohidratado (K ₃ C ₃ H ₅ O ₇ .H ₂ O)	220,0
Sulfato de potássio (K ₂ SO ₄)	52,0
Óxido de magnésio (MgO)	24,0
Carbonato manganoso (43-48% Mn)	3,5
Citrato férrico (16-17% Fe)	6,0
Carbonato de zinco (70% ZnO)	1,6
Carbonato cúprico (53-55% Cu)	0,3
Iodato de potássio (KIO ₃)	0,01
Selenito de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O)	0,01
Sulfato de cromo-potássio <CrK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O>	0,55
Sacarose, q.s.p.	1000,0

4.3.3. Testes aplicados

- Quociente de Eficiência Proteica (PER), segundo procedimentos 44.184 - 44.187 da A.O.A.C. (1975).

$$PER = \frac{\text{Ganho de peso do animal (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}}$$

- Digestibilidade Verdadeira (Dv) (PELLET & YOUNG, 1980):

$$Dv = \frac{Ni - (Nf - Nfe)}{Ni} \times 100$$

onde: Ni = nitrogênio ingerido

Nf = nitrogênio fecal

Nfe = nitrogênio fecal de origem endógena

- Quociente de Eficiência Líquida de Proteína (NPR) (BENDER & DOELL, 1957):

$$\text{NPR} = \frac{\text{Ganho de peso do animal teste (g)} + \text{Média de perda de peso do grupo em dieta apróteica (g)}}{\text{Proteína consumida pelo animal teste (g)}}$$

- Quociente de Eficiência Proteica Relativa (RPER) (SARWAR *et alii*, 1984):

$$\text{RPER} = \frac{\text{PER do animal teste}}{\text{Média do PER do grupo referência}} \times 100$$

- Quociente de Eficiência Líquida de Proteína Relativo (RNPR) (PELLET & YOUNG, 1980):

$$\text{RNPR} = \frac{\text{NPR do animal teste}}{\text{Média do NPR do grupo referência}} \times 100$$

- Escore de Aminoácidos Corrigidos pela Digestibilidade Protéica (PD-CAS) (SARWAR & McDONOUGH, 1990):

$$\text{PD-CAS} = Dv \times \text{escore de aminoácido}$$

- Avaliação Aminoacídica de Proteína (AAR)

- $\text{AAR} = \text{Escore Químico} \times \text{Proteína Total}$

- Digestibilidade verdadeira corrigida (TPDc-RAAR%) (SARWAR *et alii*, 1989a):

$$\text{TPDc-RAAR}\% = \frac{\text{AAR teste} \times Dv}{\text{AAR do leite humano}} \times 100, \text{ onde:}$$

Escore químico do leite humano = 100

Proteína Total do leite humano = 1,5 g/100 Kcal

4.4. DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA BRUTA

Através do Método semi-micro Kjeldahl (%N×6,25), conforme procedimento 2055 da Associação Oficial dos Químicos Analíticos (A.O.A.C., 1975).

4.5. DETERMINAÇÃO DO AMINOGRAMA PLASMÁTICO

Foi realizada com 2 ratos de cada dieta: PSV, CTL/psv e APT/psv, após jejum de 12 a 14 horas. Os animais em dieta aprotéica permaneceram com alimento até o dia da coleta de sangue. Ao final do 15º dia de experimento os animais foram sacrificados e o sangue cardíaco foi puncionado e coletado em tubos Eppendorf com 75 µl de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), centrifugado a 6000 rpm por 8 min em centrífuga refrigerada a 4°C (Sorvall RC5C - Instruments Du Pont). O plasma foi filtrado (filtro Millipore GSWPO1300) para tubo Eppendorf com 20 mg de SSA (ácido sulfosalicílico), e centrifugado sob as mesmas condições. Ao sobrenadante já isolado foi adicionado tampão citrato de sódio pH 2,2 e congelado a -20°C até a análise. Para a determinação do aminograma utilizou-se 0,1ml da amostra e foi realizada em Analisador Beckman 119CL. Foram utilizadas duas amostras de cada dieta.

4.6. DETERMINAÇÃO DO HEMOGRAMA

O sangue cardíaco foi colhido em lâminas para esfregaço e em capilares de micro-hematócitos, centrifugado por 5 min a 50-60 ciclos/s (Micro Hematocrit Centrifuge; Clay-Adams Inc., NY, série nº AC 11244). A leitura foi feita através do cartão de leitura de hematócitos.

4.7. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

O sangue utilizado para estas análises foi retirado por punção cardíaca, centrifugado por 10 min a 8000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C (centrífuga refrigerada SORVALL RC5C - Instruments Du Pont). As determinações foram efetuadas em "kits" comercializados para análises bioquímicas.

Uréia - Determinada através de método colorimétrico. Reação com diacetil modificado (FEARON, 1939).

Lípidios Totais - Determinados por método colorimétrico. Reação com sulfosfovanilina (HENRY, 1974).

Creatinina - Dosagem através de métodos colorimétricos. Reação de Jaffé (HENRY, 1974).

4.8. ANATOMIA DE ÓRGÃOS

Após 14 horas de jejum, os ratos foram anestesiados com Tiopental intra-peritoneal (6mg/100g de peso corpóreo), seguido de atmosfera de éter etílico. Foram retirados o intestino delgado e o fígado dos animais e imediatamente pesados.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram efetuadas médias aritméticas e desvio padrão, seguindo à análise de variância com aplicação do Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O processamento dos dados foram efetuados através do sistema SAS® - Statistical Analysis System, versão 6.04.

5. RESULTADOS

5.1. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS

As dietas foram preparadas de forma a possibilitarem a avaliação da qualidade protéica e para tanto continham 8% da proteína das respectivas fórmulas para lactentes (TABELA 5).

Os demais elementos das dietas sofreram modificações mínimas de forma a manterem a composição original das fórmulas. Esta conduta é generalizada entre os autores que efetuaram avaliações protéicas de fórmulas para lactentes (SARWAR *et alii*, 1989b; MITCHELL & JENKINS, 1985 e HARRIS & BURNS, 1988).

A dieta controle protéica também continha 8% de proteína oriunda de caseína, adequadamente suplementada com L-metionina. Nas dietas aprotéicas o nível calórico foi mantido com o acréscimo de carboidratos.

A fórmula infantil láctea em estudo contém 56,2% de lactose. Foi seguida a adaptação empregada por SARWAR *et alii* (1989b) onde a lactose foi rebaixada para 39% na dieta PSV. A fórmula não láctea continha sacarose, malto-dextrinas e amido.

No trabalho de SARWAR *et alii* (*loc cit*) não ocorreu menção do efeito da lactose na dieta dos ratos. No presente trabalho registraram-se cinco dias de evacuações diarréicas com ingesta diminuída, seguindo-se à adaptação plena até o término dos ensaios.

5.2. GANHO PONDERAL E COEFICIENTE DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR (CEA)

O ganho de peso dos grupos de animais mostrou-se diretamente proporcional ao consumo da respectiva dieta (TABELA 9). O consumo alimentar foi menor nos grupos PSV e CTL/psv quando comparados aos grupos IPS e CTL/ips, devido provavelmente ao conteúdo

de lactose das primeiras (39%), desencadeando diarreia nos 5 dias iniciais do experimento. Como consequência, o ganho de peso médio diário para PSV e CTL/ips foi de 2,1 g, considerado baixo para ratos Wistar, cuja média de ganho de peso deve ser de 5g/dia durante as três primeiras semanas após o desmame (PIAU-VIEIRA, 1982). As médias de ganho de peso e consumo alimentar dos animais em dietas PSV e CTL/psv não apresentaram diferença significativa, demonstrando boa qualidade da fórmula testada (PSV). A FIGURA 8 mostra a evolução ponderal de ratos em dietas PSV, CTL/psv e APT/psv. O comportamento das duas primeiras dietas foi similar, havendo ligeira superioridade no perfil de crescimento dos animais na dieta à base de caseína (CTL/psv).

TABELA 9. Ganho Ponderal e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) de ratos machos durante 14 dias de ensaio.

<i>Dietas</i>	<i>Ganho de Peso (g)</i>	<i>Consumo (g)</i>	<i>CEA</i>
PSV	29,69 ^c	105,63 ^b	0,28 ^b
CTL/psv	30,46 ^c	106,52 ^b	0,28 ^b
IPS	43,26 ^b	155,38 ^a	0,27 ^b
CTL/ips	58,71 ^a	166,80 ^a	0,35 ^a

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A FIGURA 9 apresenta a evolução ponderal dos ratos sob as dietas IPS, CTL/ips e APT/ips. Novamente a dieta à base de caseína, CTL/ips, demonstrou melhor desempenho em relação à IPS. A densidade calórica calculada das duas dietas era igual (5,2 Kcal/g) e assim mesmo os animais consumiram mais a dieta à base de caseína. Os resultados obtidos com as dietas controles foram semelhantes a vários ensaios efetuados neste mesmo laboratório (PIAU-VIEIRA, 1992), e da mesma forma todas as dietas experimentais ensaiadas

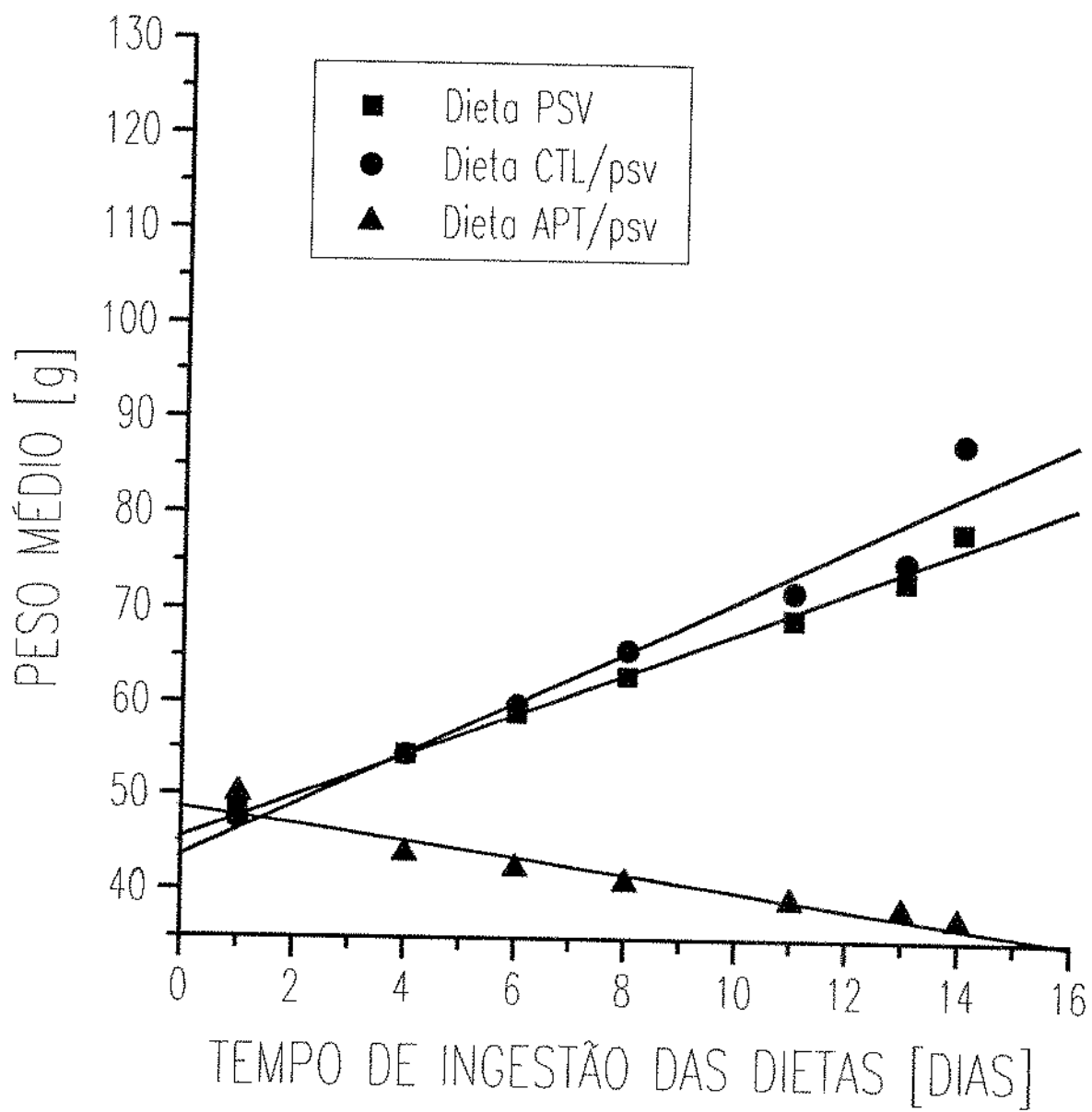


FIGURA 8. Evolução ponderal de ratos submetidos a dietas lácteas por 14 dias.

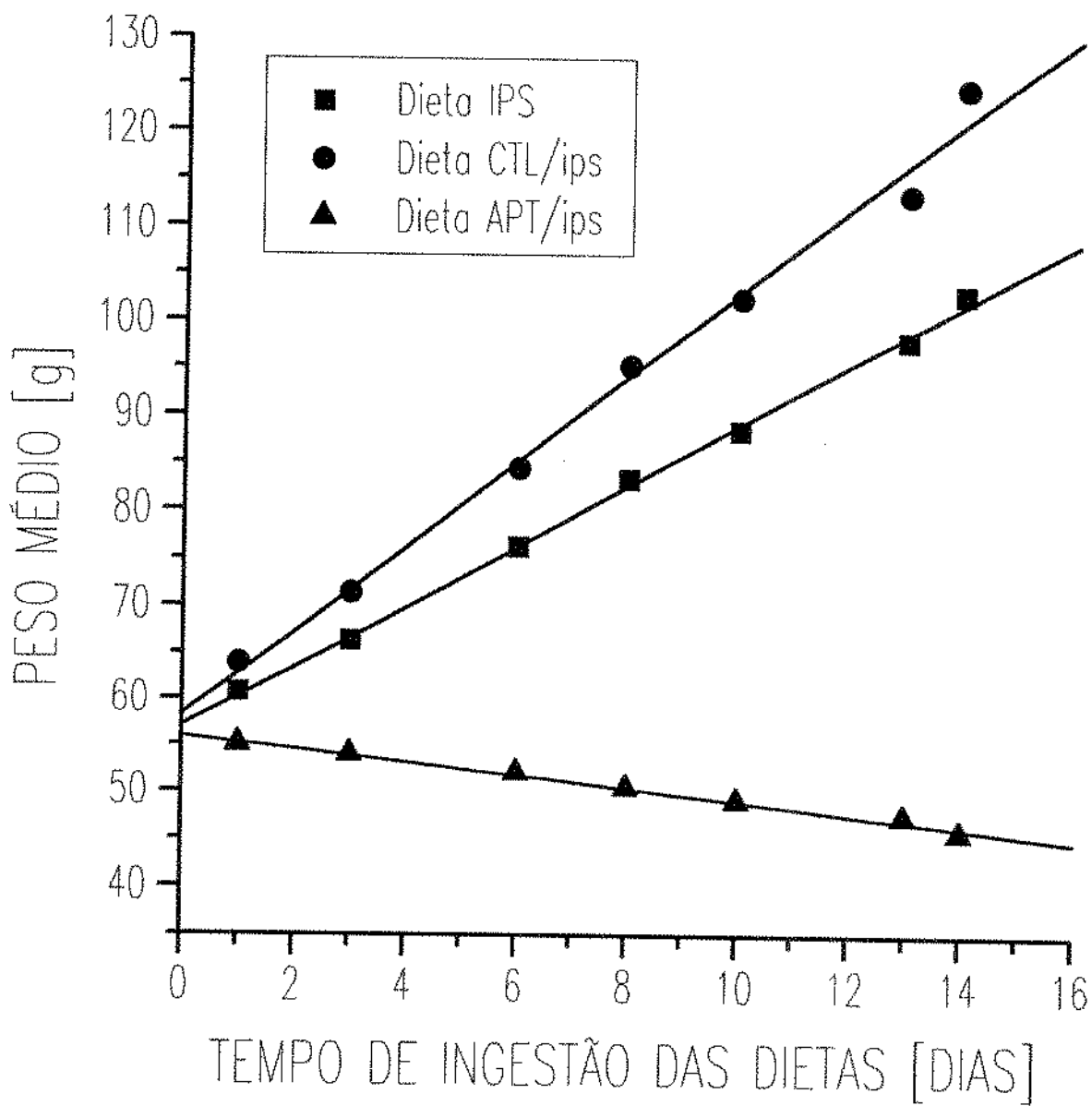


FIGURA 9. Evolução ponderal de ratos submetidos a dietas não lácteas por 14 dias

anteriormente e no presente trabalho aproximam-se da reta de regressão obtida para caseína sem entretanto ultrapassá-la.

Após a análise das dietas teste em relação aos controles, é necessário que se realce que, no que concerne ao CEA, as dietas teste demonstraram o mesmo valor (TABELA 9) não havendo portanto quanto a este índice diferença qualitativa entre PSV e IPS.

5.3. DIGESTIBILIDADE VERDADEIRA

As dietas PSV e IPS apresentaram Dv% estatisticamente semelhantes (TABELA 10). O valor de 90,7% de Dv% para PSV está de acordo com os valores obtidos por SARWAR *et alii* (1989b) e SARWAR (1991) quando, trabalhando com fórmulas análogas a deste trabalho, obteve quatro valores entre 87% e 97% de Dv.

Anteriormente em 1987, SARWAR tinha apresentado uma revisão sobre digestibilidade das proteínas correntes na alimentação onde afirmou que em ensaios com humanos ou com ratos para as proteínas de alto valor biológico, os valores de digestibilidade verdadeira obtidos com ratos (96-100%) foram similares aos obtidos com humanos (94-104%), onde é evidente que alguma restrição a esta relação deveria ser guardada no que tange a fórmulas destinadas à lactentes humanos.

O valor de 91,6% de Dv alcançado pela dieta IPS está de acordo com valores referenciados por SARWAR em 1991 para fórmulas infantis comerciais à base de isolado protéico de soja. Tratando quatro destes produtos encontrou entre 92 a 95% de Dv.

Com relação às Dv obtidas para os controles à base de caseína, os resultados de 99,8% (CTL/psv) e 95,3% (CTL/ips) eram esperados visto que o desempenho com caseína suplementada com L-metionina são reconhecidamente ideais (SARWAR *et alii*, 1989b; PIAUVIEIRA, 1992) para ratos.

TABELA 10 - Digestibilidade verdadeira (Dv) de dietas à base de fórmulas infantis e caseína obtidos em bioensaios com ratos.

<i>Dietas</i>	<i>Nitrogênio Consumido (g)</i>	<i>Dv (%)</i>
PSV	1,358 ^b	90,7 ^c
CTL/psv	1,355 ^b	99,8 ^a
IPS	1,927 ^a	91,6 ^c
CTL/ips	2,17 ^a	95,3 ^b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Resumindo, quanto à Dv dos produtos à base láctea e a base de proteína vegetal, as dietas preparadas de forma similar aos produtos destinados a lactentes, demonstraram idêntico desempenho quanto à digestibilidade. O IPS da fórmula comercial é suplementado em sulfúrios conforme esclarecimento do fabricante, o que explicaria os resultados acima. A análise do perfil aminoacídico será apresentada no item 5.8.2 deste trabalho.

5.4. QUOCIENTE DE EFICIÊNCIA PROTÉICA (PER) E PER RELATIVO (RPER)

Os autores que reavaliam com insistência o PER afirmam entre outros fatos que o PER estimado no período de 14 dias deverá substituir a duração atual estipulada em 28 dias. HACKLER (1977) obteve uma correlação de 0,996 entre PER de 14 dias e de 28 dias.

Com respeito a fórmulas infantis, HARRIS & BURNS (1988), ensaiaram PER relativos a produtos lácteos e produtos à base de proteína de soja com 14 e 28 dias. Os autores concluíram que os resultados nos dois períodos de tempo foram similares, especialmente quando referenciados ao valor obtido pelos controles (RPER%) em caseína.

TABELA 11. Coeficiente de Eficiência Protéica (PER) e PER relativo à caseína (RPER) de dietas à base de fórmulas infantis obtidas em bioensaio de 14 dias com ratos wistar

<i>Dietas</i>	<i>PER</i>	<i>PER dos Controles (CTL)</i>	<i>RPER</i>
PSV	3,4a	3,8b	89,17a
IPS	3,5a	4,7a	74,75b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os resultados de PER e RPER% expressos na TABELA 11 são elevados e esperados para dietas com proteínas de bom valor biológico. SARWAR *et alii* (1989b) relatam PER de 2 semanas de 4,16 para dietas à base de formulados lácteos não fazendo consideração sobre a diarreia inicial nos experimentos, causada pela lactose.

MITCHELL & JENKINS (1985) descrevem o quadro de diarreia inicial também devido à lactose, e determinaram PER de 14 dias no valor de 2,2 para fórmula láctea infantil.

Para HARRIS & BURNS (1988) não ocorreu episódio diarreico com formulados infantis lácteos e à base de soja tendo determinado PER de 4,18 e 3,22, respectivamente.

Devido à faixa ampla de valores de PER encontrados na literatura surgiu a recomendação de referenciar o PER do ensaio-teste com o PER obtido por controles (RPER%), contendo a mesma composição, à exceção da substituição pela caseína (HARRIS & BURNS, 1988 e SARWAR *et alii*, 1989b).

Em nossos resultados, um PER relativamente alto do controle (CTL/ips) faz resultar em uma diferença aparente entre o RPER das dietas PSV e IPS. Todavia os valores por nós apresentados de RPER% para PSV estão de acordo com os dados obtidos, por SARWAR *et alii* (1989b), na faixa de 88 a 98% para fórmulas infantis à base de soro desmineralizado de leite de vaca. O RPER% determinado para fórmula IPS (TABELA 11) encontra-se dentro da faixa relatada em literatura, de 69% (MITCHELL & JENKINS, 1985) a 94% (HARRIS & BURNS, 1988).

Os órgãos normativos do Canadá e a FAO/WHO determinam limite mínimo de 85% para RPER% de fórmulas infantis, considerado alto pelo Comitê de Nutrição da Academia Americana de Pediatria (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1976), que recomenda valor mínimo de 70%.

5.5. QUOCIENTE DE EFICIÊNCIA LÍQUIDA DE PROTEÍNA (NPR) E NPR RELATIVO (RNPR)

Na TABELA 12 estão os valores de NPR e RNPR encontrados no presente estudo. SARWAR *et alii* (1989b) apresentam NPR de dietas lácteas de 5,65 a 5,31, superiores aos nossos valores. MITCHELL & JENKINS (1985) relatam NPR de 4,0 para dietas com fórmulas lácteas à base de soro desmineralizado de leite de vaca e HARRIS & BURNS (1988), NPR de 4,96 para o mesmo tipo de dieta. Quanto aos seus controles, ambos os trabalhos determinaram NPR das dietas à base de caseína inferiores aos obtidos em nosso trabalho mas também inferiores aos próprios NPR de suas fórmulas em teste.

TABELA 12. Coeficiente de Proteína Líquida (NPR) e NPR relativo à caseína (RNPR) de dietas à base de fórmulas infantis obtidos em bioensaios

<i>Dietas</i>	<i>NPR</i>	<i>NPR dos controles (CTL)</i>	<i>RNPR</i>
PSV	4,32 ^a	4,54 ^b	95,15 ^a
IPS	4,28 ^a	5,42 ^a	78,96 ^b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os NPR das dietas controles mostraram-se superiores aos das dietas PSV e IPS, determinando valores de RNPR inferiores a 100%. RNPR para a dieta PSV (95,15%) vai de

encontro ao relatado por SARWAR *et alii* (1989b) cujos valores estão entre 94 e 100%. As fórmulas à base de isolado protéico de soja descritos variam entre 81% e 93% (MITCHELL & JENKINS, 1985 e HARRIS & BURNS, 1988, respectivamente), sendo o valor determinado em nosso trabalho próximo ao limite inferior. Existem dois fatos a serem considerados nas comparações de nossos dados com os da literatura. À exceção do trabalho de SARWAR *et alii* (1989b), as taxas protéicas das dietas em estudo pelos autores acima foi 10%, dois pontos percentuais superiores à taxa utilizada no presente trabalho. À semelhança do PER, o NPR também pode sofrer incremento quando a taxa protéica aumenta três pontos percentuais (SGARBIERI, 1987).

Comparando os resultados das TABELAS 11 e 12 pode-se concluir que neste trabalho a contribuição do NPR foi confirmar os valores obtidos com a aplicação do PER.

5.6. ESCORE DE AMINOÁCIDOS CORRIGIDO PELA DIGESTIBILIDADE VERDADEIRA (PD-CAS)

A determinação do PD-CAS fornece dados mais reais acerca da disponibilidade dos aminoácidos. A taxa de proteína bruta não é espelho da proteína utilizável ou disponível. No leite humano, cerca de 25% do total do nitrogênio é composto por nitrogênio não protéico do qual a uréia responde por 50% (FOMON, 1976; SARWAR *et alii*, 1989a). FOMON *et alii* (1987) relataram pequena utilização do nitrogênio uréico pelos lactentes para síntese de aminoácidos essenciais. Proteínas como a imunoglobulina A secretora (IgA) e lactoferrina foram encontradas intactas nas fezes de lactentes (DAVISON & LÖNNERDAL, 1987), garantindo apenas a atividade imunológica, e não cumprindo papel nutricional.

TABELA 13. Escores de aminoácidos e valores de digestibilidade protéica corrigida pelo escore de aminoácidos (PD-CAS) dos Produtos 1 e 2 das dietas derivadas.

Aminoácido	Padrão FAO para lactente ^a (mg/g ptm)	Aminograma dos produtos (mg/g ptm) ^b		Escore químico ^c		PD ^d -CAS das dietas	
		PRODUTO 1	PRODUTO 2	PRODUTO 1	PRODUTO 2	PSV	IPS
HIS	26	26	23	100	88,4		
ILE	46	52	46	100	100,0		
LEU	93	118	76	100	81,7		
LYS	66	100	60	100	90,9		
MET + CYS	42	40	27	95,2	64,3	86,3	58,9
PHE + TYR	72	77	83	100	100,0		
THR	43	57	32	100	74,4		
TRP	17	17	12	100	70,6		
VAL	55	58	46	100	83,6		

a. FAO/WHO/JUNU, 1985, p.121.

b. Aminograma fornecido pelos fabricantes.

c. Valores superiores a 100, foram considerados como 100.

d. Digestibilidade verdadeira das dietas foram 90,7 para PSV e 91,6 para IPS.

As taxas protéicas das fórmulas utilizadas no presente trabalho foram 2,46g/100kcal e 3,0g/100kcal das dietas PSV e IPS, respectivamente. Mesmo suplementada com metionina, a fórmula IPS apresenta nível 35% inferior de aminoácidos sulfurados quando comparada com a recomendação da FAO/WHO/UNU (1985). À exceção de ILE e PHE + TYR, todos os aminoácidos essenciais encontram-se abaixo do recomendado (TABELA 13), fato também atestado por SARWAR *et alii* (1989a) que estudaram fórmulas comercializadas nos Estados Unidos. Quanto à dieta PSV, pôde ser observada a adequação de todos os aminoácidos, havendo superioridade marcante nas taxas de LYS, THR e LEU, com valores de 151%, 132% e 126% mais elevadas do que o recomendado (FAO/WHO/UNU, 1985). SARWAR *et alii* (1989a) também relataram altos níveis de THR, aminoácido presente em abundância no soro do leite de vaca (TABELA 16).

O escore químico das duas fórmulas em estudo provém da limitação dos aminoácidos sulfurados. A TABELA 13 apresenta valores de 95,2% e 64,28% de escore químico para as fórmulas PSV e IPS, respectivamente, superiores aos relatados por SARWAR *et alii* (1989a), cujas faixas variam de 77% a 90% para fórmulas infantis à base de proteínas de soro de leite de vaca e de 59% a 63% para fórmulas à base de isolado protéico de soja. POMPEI *et alii* (1987) mostram escores químicos na faixa de 44 a 73,2% para fórmulas lácteas em pó, cujo aminoácido limitante foi a lisina. Na TABELA 13, os cálculos dos PD-CAS% das fórmulas demonstraram similaridades com aqueles do trabalho de SARWAR *et alii* (1989a). Estes determinaram 74,69 a 85,5% para dietas à base de soro desmineralizado de leite de vaca, enquanto que determinamos 86,30% para dieta análoga (PSV). Para a dieta IPS, o PD-CAS% foi 58,9, valor que se enquadra na faixa relatada por aqueles autores, isto é, de 56,0 a 67,4%, para fórmulas à base de isolado protéico de soja.

As deficiências de aminoácidos específicos nas fórmulas à base de soja são em geral compensadas por suplementação de, por ex., taurina e metionina, ou por aumento do conteúdo protéico total. Deste modo, não se observam sinais específicos de deficiências de aminoácidos nos estudos clínicos, os quais, apresentam excelentes resultados de crescimento (JUNG & CARR, 1977; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1983).

Considerando também a taxa protéica de fórmulas infantis, SARWAR *et alii* (1989a) elaboraram um índice que é o produto do escore de aminoácidos com o conteúdo protéico da fórmula (g/100kcal), intitulado Razão de Aminoácidos, o qual é ainda corrigido pela Digestibilidade verdadeira (TPD correted RAAR%).

Para fins comparativos, calculamos este índice para as dietas PSV e IPS, que foram 141,6 e 117,8%, respectivamente, compatíveis com as faixas relatadas pelos autores supra citados, quais sejam 110 a 127% para fórmulas à base de proteínas do soro do leite de vaca e 104 a 135% para as fórmulas à base de IPS. Acreditamos que o valor obtido por nós para dieta PSV deva-se ao fato de que a fórmula brasileira apresenta maior razão de aminoácidos e maior conteúdo protéico (2,46g/100kcal) do que as fórmulas utilizadas pelos autores acima citados.

Com respeito à avaliação protéica dos Produtos 1 e 2, após os vários ensaios e após correlacionarem-se os valores obtidos com o perfil aminoacídico e/ou com a quantidade de proteína de cada produto podemos concluir que:

- Embora estes produtos apresentem oferta protéica superior à do leite humano, o escore químico calculado pela referência Padrão FAO/1985 é inferior no Produto 2.
- Mas, ao se relacionarem quantidade protéica veiculada, com o escore químico e com Dv%, a qualificação das proteínas excedem neste caso aos 100% relativos ao leite humano. Conclui-se que diante da limitação que os formulados base-soja têm em preencher a qualificação aminoacídica, os fabricantes se obrigam a elevar a taxa protéica.

5.7. AVALIAÇÕES ANATÔMICAS DO FÍGADO E INTESTINO DELGADO

O intestino delgado reflete com fidelidade o estado eutrófico do indivíduo. Da mesma forma a condução normal do metabolismo proporciona um volume hepático adequado. Optamos por avaliar esta relação no tocante ao fígado e ao intestino delgado, órgãos de intensa atividade e "turnover" celular. Pela TABELA 14 pode-se concluir que tanto as dietas

quanto seus controles mantiveram o valor relativo do fígado. Para o intestino os valores relativos são também semelhantes. A pequena discrepância ocorrida se deve à dificuldade de excisar o tubo intestinal por vezes não vazio de secreções.

TABELA 14 - Percentual de peso de fígado e intestino delgado sobre peso corpóreo de ratos machos Wistar após 14 dias em dietas à base de fórmulas infantis, caseína e aprotéica.

Dietas	Peso corpóreo (g)	Fígado (g)	Peso Corpóreo / Fígado (%)	Intestino delgado (g)	Peso Corpóreo/ Intestino delgado (%)
PSV	89,29 ^b	3,20 ^b	3,5 ^a	4,13 ^a	4,6 ^a
IPS	101,00 ^b	3,15 ^b	3,1 ^a	3,23 ^b	3,2 ^b
CTL/ips	121,25 ^a	3,97 ^a	3,3 ^a	3,91 ^b	3,2 ^b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na literatura, encontramos dados de animais da linhagem Sprague-Dawley em uso de dieta AIN-76 (base caseína) por 28 dias. Os dados são 5,1% de peso do fígado e 4,02% de peso de intestino delgado relativos ao corporal (BATTLES *et alii*, 1991). Estes valores aproximam-se dos obtidos em nosso trabalho. A pequena diferença deve estar relacionada com a linhagem que é distinta das nossas, mas sobretudo pelo fato de que os valores de BATTLES *et alii* (1991) foram tomados após 28 dias de teste. As determinações dos pesos de intestino delgado aproximaram-se do relatado por BATTLES *et alii* (1991), demonstrando boa adequação das dietas.

5.8. AVALIAÇÃO DOS ELEMENTOS SANGÜÍNEOS

5.8.1. Parâmetros bioquímicos e hemograma

Os dados bioquímicos oferecidos pelos elementos sangüíneos de modo geral contribuem para a avaliação do perfil nutricional os quais são os últimos a sofrerem com uma depleção nutricional (CARRAZZA, 1991).

As adaptações à alta ou baixa ingesta protéica incluem aumento na produção de enzimas de degradação ou de síntese. No rato ocorre aumento das enzimas participantes da biossíntese da uréia quando há aumento da oferta de proteínas (YOUNG & PELLETIER, 1989), garantindo maior excreção dos metabólitos protéicos. A maior capacidade enzimática de degradação de aminoácidos também é observada quando a ingestão destes ou de proteínas é aumentada (YOUNG & PELLETIER, 1989).

Na TABELA 15 estão descritos os valores medidos de uréia plasmática nos 4 grupos. Na literatura encontramos os seguintes valores médios para ratos Wistar adultos: 34 mg/dl (ALTMAN & DITTMER, 1966); 33,26 mg/dl (MITRUKA & RAWNSLEY, 1978); e 34,35mg/dl (JADOT, 1981). À exceção dos ratos em dieta PSV, os outros grupos apresentaram uremia mais baixa do que o reportado em literatura. A diferença de cinco unidades entre o valor de uréia do grupo PSV e os dados de literatura não confere gravidade pois JADOT (1981) encontrou valores extremos de 18,36 a 106,5 mg/dl e MITRUKA & RAWNSLEY (1978) relatam faixa de 62,23 a 100,7 mg/dl. A avaliação é difícil e no presente estudo pode ser que o pequeno aumento da uremia nos ratos em dieta PSV se explique pela menor utilização ou disponibilidade protéica; o aumento é ainda pequeno para que se caracterize um excesso de oferta protéica na fórmula.

JÄRVENPÄÄ *et alii* (1982) relatam maior taxa de uréia plasmática em crianças alimentadas com fórmulas à base de proteínas de soro de leite em relação à crianças alimentadas com fórmulas à base de caseína. Em nosso estudo ocorreu também este fato.

JANAS *et alii* (1987) determinaram uremia de crianças amamentadas e com fórmula à base de caseína, sem encontrar diferença estatística significativa entre ambos.

TABELA 15. Valores de componentes sanguíneos de ratos obtidos após 14 dias de ensaio biológico.

<i>Dietas</i>	<i>Uréia</i> (g/dl)	<i>Creatinina</i> (g/dl)	<i>Lipídios totais</i> (g/dl)	<i>Hematócrito</i> (%)
PSV	39,45 ^a	0,37 ^b	336,59 ^a	40,60 ^b
IPS	24,29 ^b	0,56 ^a	297,58 ^b	45,00 ^a
CTL/ips	25,68 ^b	0,61 ^a	201,49 ^c	47,40 ^a
APT/ips	16,42 ^b	0,44 ^b	267,82 ^b	37,00 ^c

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A uremia dos grupos em dieta IPS e CTL/ips foi cerca de 9 pontos inferiores à média relatada em literatura e parece representar a boa utilização protéica pelos animais. A aproximação dos valores das duas dietas pode ser devida à suplementação do isolado protéico de soja (IPS) com metionina. Em estudo de comparação entre fórmulas à base de IPS suplementada ou não, FOMON *et alii* (1979) atestam que o acréscimo de metionina diminui a uréia sérica de 17,5 a 20,2%, de acordo com a idade da criança.

A creatinina é produto do catabolismo da creatina, importante reserva energética muscular, já que é potencial receptora de fosfato. A cada 24h, há a conversão de cerca de 2% da creatina em creatinina, tornando-se esta uma rotina fisiológica constante e proporcional à massa muscular. A constância da massa magra e do ritmo de conversão, fazem da creatinina sérica um parâmetro fidedigno para avaliação da filtração glomerular (CARRAZZA, 1991). No presente estudo, a determinação sérica da creatinina nos serviu de base de comparação das massas musculares dos grupos de ratos em diferentes tipos de dietas. Na TABELA 15, observamos que o grupo aprotéico e o grupo PSV apresentaram taxas iguais estatisticamente,

mais baixas do que os outros dois grupos. Resultados já esperados a partir de um ganho de peso pequeno para o período (PSV) e perda de peso importante (APT/ips) observados. Os valores encontrados para os grupos IPS e CTL/ips estão de acordo com a literatura que dita valores médios normais (mg/dl) para ratos Wistar de 0,61 (JADOT, 1981); 0,46 (MITRUKA & RAWNSLEY, 1978) e 0,66 (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, informação não publicada).

A taxa plasmática de lipídios é resultado de intrincada regulação orgânica na qual estoque e "pool" metabólicos são componentes importantes. No sangue é expressa somente uma pequena fração das reservas lipídicas orgânicas (LO, 1985), as quais chegam a constituir de 13,7 a 25,4% e de 14,9 a 26,4% do peso corpóreo de meninos e meninas, respectivamente na faixa de 0 a 12 meses (FOMON, 1982).

Quando ocorre desnutrição, há diminuição da lipemia por menor síntese hepática de apo- β -lipoproteínas, induzindo à infiltração gordurosa hepática (VITERI, 1985), a qual também é reflexo da alta oferta de carboidratos na dieta em detrimento da oferta protéica.

Deve-se lembrar que a composição de nossas dietas experimentais e controle possuíam taxas lipídicas altas (20 e 28%) porque são estes valores empregados em fórmulas infantis. Entretanto a lipemia parece não ter sido afetada pela oferta nestes experimentos e os valores de lipídios plasmáticos (TABELA 15) estão abaixo da taxa de 350mg/dl apresentada por JADOT (1981).

A reserva de ferro corporal do lactente se mantém até os 4 meses quando é alimentado com fórmula não suplementada ou até os 6 meses caso seja amamentado. A suplementação das fórmulas é um meio de prevenção da anemia ferropriva mas a idade em que se deve oferecer à criança permanece em dúvida. Alguns pontos contra a precoce introdução das fórmulas suplementadas são a deficiente absorção de ferro durante os primeiros meses de vida e o maior risco teórico de infecções entéricas, por saturação das enzimas carreadoras do mineral que perderão sua propriedade bacteriostática. Por outro lado, é desejável ofertar a mesma fórmula

durante os primeiros seis meses (NICHOLS, 1988) e se fosse seguida por uma suplementada, deveria ocorrer ao redor dos 3 meses de idade.

O Comitê de Nutrição da Academia Americana de Pediatria recomenda fórmulas enriquecidas com ferro quando não houver possibilidade do uso de leite humano. As fórmulas infantis utilizadas nos dois ensaios apresentam 1,19 mg/100Kcal (PSV) e 1,78 mg/100Kcal (IPS), de acordo com o preconizado pela Academia Americana de Pediatria, de 1 a 2 mg/100Kcal (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1979).

A rapidez da determinação do hematócrito confere praticidade na avaliação populacional do estado orgânico do ferro, mesmo sendo impreciso quando usado isoladamente, dada sua pouca sensibilidade. O objetivo neste trabalho foi aliar mais um dado na avaliação global dos animais submetidos às dietas.

Na TABELA 15 podemos observar valor baixo de hematócrito para os ratos em dieta aprotéica (APT/ips), esperado pela desnutrição que se instalou. Os dados séricos dos ratos em dieta IPS e CTL/ips encontram-se dentro dos limites observados em literatura para ratos Wistar, quais sejam 44,4% a 50,4% (MITRUKA & RAWNSLEY, 1978; JADOT, 1981). A dieta PSV conferiu valor de 40,6% (TABELA 16), apesar de ter sido observada hígidez dos animais. Os hematócritos foram acompanhados por esfregaços sangüíneos em lâmina. Os animais sob as dietas experimentais e seus controles não apresentaram qualquer alteração morfológica na série branca ou vermelha. Os animais aprotéicos não estavam apresentando ainda qualquer alteração em lâmina, onde se conclui que para ratos os padrões clássicos de alteração, sobretudo eritrocitária na má nutrição ou desnutrição não são bons índices de avaliação durante a realização de ensaios de 14 dias.

5.8.2. Aminograma plasmático

O aminograma dos Produtos 1 e 2, utilizados como fontes protéicas das dietas PSV e IPS, respectivamente, é apresentado na TABELA 16. Como visto na TABELA 13, o

aminograma da fórmula do Produto 1 aproxima-se muito do leite humano. Por razões operacionais procedemos somente à análise dos aminoácidos do plasma dos ratos do ensaio PSV, seus controles (CTL/psv) e aprotéicos (APT/psv).

A análise das TABELAS 16 e 17 demonstra que o perfil aminoacídico das fórmulas tende a se refletir diretamente no plasma dos animais que as utilizaram. FOMON (1976) e LO (1985) concordam que este tipo de análise representa mais a ingestão protéica recente do que o "pool" dos aminoácidos.

Comparando-se o aminograma das fontes caseína e Produto 1 (TABELA 16), observamos que a primeira é superior em HIS, PHE, TYR, VAL, MET, em 8%, 16%, 16,4%, 16,8%, e 26% respectivamente. A TABELA 17 nos mostra que o nível plasmático destes aminoácidos está aumentado nos ratos em dieta CTL/psv quando comparados àqueles em uso de dieta PSV, sem contudo terem sido observados aumentos proporcionais entre as taxas. O consumo de dieta dos dois grupos foi similar (TABELA 9), ratificando a relação direta entre a taxa de ingestão de aminoácidos e o nível plasmático.

SCOTT *et alii* (1985) também determinaram valores superiores de HIS, PHE, TYR, VAL e MET em fórmula à base de caseína quando comparada com a fórmula à base de proteínas do soro de leite de vaca e observaram que os níveis plasmáticos destes aminoácidos igualmente mostram-se superiores nos lactentes que fizeram uso daquela fórmula.

Quanto aos sulfúridos temos a esclarecer que a caseína comercial foi suplementada em 2g/Kg de dieta controle (CTL/psv), passando a conter 60,8mg de sulfúridos/g de proteína enquanto o Produto 1 apresentou 40mg de sulfúridos/g de proteína. A resposta plasmática dos animais em ambos os grupos não mostrou diferença acentuada (TABELA 17).

Quanto à CYS isoladamente, a baixa concentração encontrada no plasma poderia ser devido à eficiente utilização. De fato SCOTT *et alii* (1985) concordam que os baixos níveis de CYS e de aminoácido ramificados encontrados no plasma de lactentes prematuros não sejam sinais de desnutrição mas, pelo contrário, se relacionam à rápida velocidade de crescimento.

Lembramos em especial que os ratos apresentam, por unidade de tempo, maior taxa de crescimento e retenção de nitrogênio do que o ser humano.

Para alguns aminoácidos, as diferenças nas ofertas dietéticas não explicam o comportamento plasmático. É o caso dos ramificados ILE e LEU, superiores em relação à caseína em 5,7 e 16,15% na dieta com Produto 1 (TABELA 16) e cujos níveis plasmáticos forma inferiores. Segundo JONXIS (citado por SCOTT *et alii*, 1985), isto pode ser resultante do desbalanço energético-protéico da dieta.

A taxa de THR 18% superior no Produto 1 (TABELA 16) determinou valor plasmático cinco vezes superior ao da caseína. JÄRVENPÄÄ *et alii* (1982) encontraram igual comportamento plasmático em crianças alimentadas com fórmulas à base de proteínas de soro de leite de vaca. SCOTT *et alii* (1985), também relataram perfil similar, o qual atribuíram à imaturidade das crianças em metabolizar a THR.

PETERS & HARPER (1985) estudaram o aminograma de ratos submetidos a dietas que encerravam de 5 a 75% de caseína. De modo geral, a soma dos aminoácidos não essenciais do plasma mostrou-se inversamente proporcional à oferta protéica. Em nosso estudo observamos que a soma dos não essenciais foi superior nos ratos em dieta APT/psv quando comparados com os dois outros grupos (TABELA 17).

Os ratos alimentados com dieta aprotéica apresentaram taxas plasmáticas elevadas de SER, GLY, ALA e ARG quando comparadas com os outros dois grupos (CTL/psv e PSV). ARROYANE (1969) descreveu este mesmo comportamento no sangue de lactentes alimentados com dietas aprotéicas, comparando-os aos de lactentes bem nutridos durante 7 dias. Aumentos plasmáticos de GLY e SER foram observados por SNYDERMAN *et alii* (1968) em lactentes alimentados com dieta hipoprotéica (1,1g proteína/Kg/dia), tendo a GLY, o aumento mais importante, o que também ficou claro em nosso estudo (TABELA 17).

PETERS & HARPER (1985) relatam decréscimo de 47 a 73% da taxa de ALA, SER e GLY, conforme foi aumentado o percentual protéico das dietas oferecidas a ratos. GLY e SER são aminoácidos interconvertíveis (HARPER *et alii*, 1982) e é possível que, compondo

um grupo de aminoácidos glicogênicos, ele se apresentem em quantidades elevadas no plasma para suprir a escassez calórica advinda do decréscimo de consumo alimentar.

TABELA 16. Aminograma das fontes protéicas utilizadas nos ensaios biológicos (mg do aa/g de proteína)

<i>Aminoácido</i>	<i>Caseína comercial¹</i>	<i>Produto 1²</i>	<i>Produto 2²</i>
HIS	28,27	26,0	23,0
ILE	48,99	52,0	46,0
LEU	98,94	118,0	76,0
LYS	80,56	100,0	60,0
MET	(25 +)** 29,68	22,0	18,0
CYS	6,15	18,0	9,0
PHE	45,69	38,0	49,0
TRYR	46,63	39,0	34,0
THR	46,65	57,0	32,0
TRP	*	17,058,0	12,0
VAL	69,71	58,0	46,0
ARG	34,38	38,0	*
ALA	45,69	38,0	*
ASP	73,50	109,0	*
GLU	198,84	221,0	*
GLY	34,85	19,0	*
SER	70,68	74,0	*

1. Análise realizada no Centro de Proteínas da FMRP/USP.

2. Fornecido pelo fabricante

* Não fornecido

** Complementado com 2g/kg de dieta CTL/psv perfazendo desta forma 60,8mg de aminoácidos sulfurados.

TABELA 17. Aminograma plasmático dos ratos submetidos às dietas PSV, CTL/psv e APT/psv, durante 14 dias.

<i>Aminoácido</i>	<i>Concentração de aminoácidos ($\mu\text{mol/dl}$)</i>		
	PSV ¹	CTL/psv ²	APT/psv ³
ASP ^c	4,89 ^a	1,43 ^a	0,63 ^a
THR [*]	26,89	4,84	-
SER	15,08 ^a	32,18 ^a	43,26 ^a
GLU	6,02 ^a	8,64 ^a	5,37 ^a
PRO	13,63 ^b	8,21 ^b	3,55 ^c
GLY	6,83 ^b	8,72 ^b	20,54 ^a
ALA	33,48 ^a	29,2 ^a	29,10 ^a
½CIS [*]	0,82	0,81	-
VAL	3,71 ^b	4,03 ^b	2,35 ^b
MET	1,37 ^b	3,27 ^a	1,78 ^{ab}
ILE	1,17 ^b	1,84 ^b	1,16 ^b
LEU	2,27 ^{ab}	3,02 ^b	1,47 ^a
TYR	1,41 ^a	2,10 ^a	1,57 ^a
PHE	1,26 ^a	1,40 ^a	0,72 ^b
LYS	15,14 ^a	7,15 ^a	11,01 ^a
HIS	2,48 ^a	8,15 ^a	3,36 ^a
ARG	2,98 ^{ab}	2,71 ^b	4,19 ^a

* não houve dados suficientes para realizar teste de Tukey

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

1 - PSV: dieta cuja fonte protéica constou do produto I, à base de soro desmineralizado de leite de vaca e leite de vaca integral.

2 - CTL/psv: dieta controle, à base de caseína suplementada com metionina.

3 - APT/psv: dieta aprotéica.

A LYS plasmática mostrou-se alta em ratos com dieta aprotéica (TABELA 17), podendo ser explicada pelo baixo requerimento deste aminoácido para a manutenção, ou seja, 58% menor do que para o crescimento (JANSEN, 1978), cuja desaceleração é evidente em estados de privação protéica.

Neste trabalho, a análise do perfil aminoacídico plasmática não se contrapõe às duas dietas de boa qualidade protéica; a análise foi facilitada quando se comparou ambas com a situação extrema de catabolismo do grupo aprotéico. Entretanto, observando a TABELA 17 se encontra que apenas PRO, GLY e VAL são significativamente distintas das duas anteriores. Conclui-se que neste limitado número de amostragem não se deve inferir relações de adequacidade protéica com perfil de aminoácidos plasmáticos. Ressalva-se entretanto que nosso trabalho com ratos Wab/Not/SPF, a exemplo de trabalho anterior (PIAU-VIEIRA, 1992) primou por levantar dados metabólicos dos animais para ampliar o quadro de índices desejados pela nossa equipe de trabalho.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho analisou o desempenho nutricional de ratos submetidos a duas dietas experimentais formuladas com dois produtos comerciais (Produto 1 e 2), destinados a lactentes. A proteína do Produto 1 deriva de leite e soro de leite de vaca e a proteína do Produto 2 deriva de isolado protéico de soja .

O CEA, RPER%, RNPR% e a Dv% demonstraram boa qualificação protéica dos produtos sem distinção entre ambos.

Quando foi considerada a composição aminoacídica no cálculo do PD-CAS% surgiram diferenças entre os produtos: 86,3% para o Produto 1 e 58,9% para o Produto 2; este valor mais baixo decorre do Escore Químico (64,3%) onde os sulfurados são os aminoácidos limitantes no Produto 2.

Entretanto, calculando o TPDc-RAAR% que relaciona o Escore Químico e a quantidade protéica do produto (2,46 g/ 100 Kcal para o Produto 1 e 3,0 g/ 100 Kcal para o Produto 2) com o leite humano (1,5 g/ 100 Kcal), cujo escore químico é 100, os valores obtidos (141,6% para o Produto 1 e 117,8% para o Produto 2) sugerem que a taxa protéica de ambos foi suficiente para compensar os valores de Escore Químico. A pequena porém melhor qualificação do Produto 1, proteína láctea, foi confirmada neste índice.

Os parâmetros bioquímicos obtidos enquadraram-se nos dados da literatura mas a variabilidade entre os valores obtidos quer da literatura ou entre os nossos, não indicaram uma clara relação com as diferenças de qualidade protéica das dietas, dentro do prazo experimental. O mesmo juízo se aplicou ao perfil de aminoácidos livres plasmáticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMAN, P.L. & DITTMER, D.S. (eds.) **Blood and other body fluids**. Maryland, Federation of American Societies for Experimental Biology. 1966. 540p.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Nutrition. Commentary on breast-feeding and infant formulas, including proposed standard for formulas. **Pediatrics**, 57:278-285, 1976.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Nutrition. Soy protein formulas: recommendations for use in infant feeding. **Pediatrics**, 72: 359-363, 1983.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. **Pediatric Nutrition Handbook**. Illinois, American Academy of Pediatrics, 1979, p.120-138.
- ARROYAVE, G. Proposed methodology for the biochemical evaluation of protein nutrition in children. In: von MURALT (ed.). **Protein-Calorie Malnutrition**. Berlin, Springer-Verlag, 1969. p.48-56.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Biological evaluation of protein quality. In: **Official Methods of Analysis**, 12th ed, 1975, p.857. A.O.A.C. Washington, D.C.
- AXELSSON, I; BORULF, S.; ABILDSKOV.; HEIRD, W.; RÄIHÄ, N.C.R. Protein and energy intake during weaning. II - effects on plasma amino acids. **Acta Paediatrica Scandinavica**, 77:42-48, 1988.
- AXELSSON, I; BORULF, S.; RÄIHÄ, N. Protein and energy intake during weaning. I - metabolic responses. **Acta Paediatrica Scandinavica**, 76:457-462, 1987.
- AXELSSON, I; IVARSON, S.A.; RÄIHÄ, N.C.R. Protein intake in early infancy: effects on plasma amino acid concentrations, insulin metabolism and growth. **Pediatric Research**, 26:614-617, 1989.

- AXELSSON, I.; IVARSON, S.A. ; RÄIHÄ, N.C.R. Protein and energy in early infancy: effects on plasma amino acid concentrations, insulin metabolism and growth. **Pediatric Research**, 26:614-617, 1989.
- AXELSSON, I.; JAKOBSON, I.; RÄIHA, N. Formula with reduced protein content: effects on growth and protein metabolism during weaning. **Pediatric Research**, 24:297-301, 1988.
- BATTLES, A.H.; KNAPKA, J.T.; LEWIS, L.; LANG, M.T.; GRUENDEL, D.J. High-moisture diet for laboratory rats: nutrient analysis, growth and organ weights. **Laboratory Animal Science**. 41:237-241, 1991.
- BENDER, A.E. & DOELL, B.H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **The British Journal of Nutrition**, 11:138-143, 1957.
- BLANC, B. Biochemical aspects of human milk: comparisons with bovine milk. **World Review of Nutrition and Dietetics**, 36: 1-89, 1981.
- BURNETTE III, M.A. & RUSOF, I.I. GMA test protocol for protein quality assays. 32:66-68, 1978.
- CARRAZZA, F.R. Prática da Alimentação Infantil: parte II. Em: CARRAZZA, F.R. & MARCONDES, E.(eds). **Nutrição Clínica em Pediatria**, São Paulo, Ed. Sarvier, 1991, p.147-153.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex Standards for Foods for Special Dietary Uses Including Foods for Infants and Young Children and Related Code of Hygienic Practice**. Joint FAO/WHO. Food Standards Programme, 1982, FAO, Rome p. 16-18.
- CUSMISNSKI, M. & OJEDA, E.N.S. Crecimiento y desarrollo, saúde del niño y calidad de vida del adulto. En: **Crecimiento y Desarrollo: Hechos e Tendencias**. Publicación Científica nº 510. Oficina Panamericana de la Salud, 1988. p.3-19.

- DAVIDSON, L.A.; LÖNNERDAL, B. Persistence of human milk proteins in the breast-fed infant. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 76: 733-740, 1987.
- DAVIES, D.P. & SAUNDERS, R. Blood urea: normal values in early infancy related to feeding practices. *Archives of Diseases in Childhood*, 48:563-564, 1973.
- DE ANGELIS, R.C. & CTENAS, M. L. B. Biodisponibilidade de ferro na alimentação infantil. Em: Nestlé (ed): *Temas de Pediatria*, nº 52, 1993, 53p.
- DOBBING, J. Vulnerable periods of brain development. In: Ciba Foundation Symposium (ed.). *Lipids, Malnutrition & Developin Brain*. Amsterdam. Elsevier. 1972. p. 9-29.
- DUTRA DE OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S.; DEMONTE, A. Proteínas. Em CARRAZZA, F.R. & MARCONDES, E. (EDS). *Nutrição Clínica em Pediatria*. São Paulo, Ed. Sarvier, 1991, p.85-100.
- EGGUM, B.O. Blood urea measurement as a technique for assessing protein quality. *The British Journal of Nutrition*, 24:983-988, 1970.
- EUROPEAN SOCIETY FOR PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION (ESPGAN), Committee on Nutrition. Guidelines on Infant Nutrition - I - Recommendations for the composition of an adapted formula. *Acta Paediatrica Scandinavica* (Suppl. 262), 1977.
- EUROPEAN SOCIETY FOR PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION (ESPGAN), Committee on Nutrition. Guidelines on Infant Nutrition - II - Recommendations for the composition of follow-up formula and beikost. *Acta Paediatrica Scandinavica* (Suppl. 287), 1981.
- EUROPEAN SOCIETY FOR PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION, (ESPGAN), Committee on Nutrition. Comment on the composition of soy protein based infant formula and follow-up formulas. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 79:1001-1005, 1990.

- FAO/WHO/UNU. Expert Consultation. **Energy and Protein Requirements**. Geneva. World Health Organization, 1985. 206p.(World Health Organization). Technical Report Series, n° 724.
- FEARON, W.R. The carbamino diacetyl reaction - A test for citrulline. **Biochemical Journal**, **33**:902-907, 1939.
- FILER Jr, L.J. Safe foods for infants. The regulations of milk, infant formula and other infant foods. **Journal of Nutrition**, **123**:285-288, 1993.
- FOMON, S.J.; FILER Jr, L.J.; THOMAS, L.N.; ROGERS, R.R. Growth and serum chemical values of normal breastfeed infants. **Acta Paediatrica Scandinavica** (Suppl.202), 1970.
- FOMON, S.J.; HASCHRE, F.; ZIEGLER, E.E.; NELSON, S.E. Body composition of reference children from birth to age 10 years. **The American Journal of Clinical Nutrition**, **35**:1169-1175, 1982.
- FOMON, S.J.; MATTEWS ,D.E.; BIER, D.M.; ROGERS, R.R.; REBOUCHE, C.J.; EDWARDS, B.B. & NELSON, S.E. Bioavaibility of dietary urea nitrogen in the infant. **Journal of Pediatrics**, **111**:221-224, 1987.
- FOMON, S.J.; ZIEGLER, E.E.; FILER Jr., L.J.; NELSON; S.E.; EDWARDS, B.B. Methionine fortification of a soy protein formula fed to infants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, **53**: 457-465, 1991.
- FOMON, S.J. **Nutrición infantil**. México, Ed. Interamericana, 1976. 537p.
- FORSYTH, J.S. Is it worthwhile breast-feeding? **European Journal of Clinical Nutrition**, **46**(Suppl. 1):519-525, 1992.
- HACKLER, L.R. Methods of measuring protein quality: a review of bioassay procedures. **Cereal Chemistry**, **54**: 984-995, 1977.
- HANSEN, J.W.; COOK, D.A.; CORDANO, A.; MIGUEL, S.G. Human milk substitutes. In: TSANG, R.C. & NICHOLS, B.L. (eds.) **Nutrition During Infancy**. Philadelphia. Hanley & Belfus, 1988. p. 378-398.

- HAPPICH, M.L.; BODWELL, C.E.; HACKLER, L.R.; PHILIPS, J.G.; DERSE, P.H.; ELLIOT, J.G.; HARTNAGEL Jr, R.E.; HOPKINS, D.T.; KAPISZKA, E.L.; MITCHELL, G.V.; PARSONS, G.F.; PRESCHER, E.E.; ROBAIDEK, E.S.; WOMACK, M. Net protein ratio data: AACC-ASTM collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 67:255-262, 1984.
- HARPER, H.A.; RODWELL, V.W. & MAYES, P.A. *Manual de Química Fisiológica*. São Paulo, Ed. Atheneu, 1982, 736p.
- HARRIS, D.A.; BURNS, R.A. Evaluation of infant formula protein quality: comparison of in vitro with in vivo methods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71:353-357, 1988.
- HENRY, R.J. *Clinical Chemistry: Principles and Technics*. 2nd. ed. Harper & Row, 1974, 196p.
- HURRELL, R.F. ; BERROCAL, R.; NESSER, J.R.; SCHWEIZER, T.F.; HILPERT, H.; TRAITLER, H.; COLAROW, L. & LINDSTRAND, K. Micronutrients in infant formula. In: RENNER, E.(ed.), *Micro nutrients in milk and milk based food products*. London. Elsevier Science Publishers Ltd., 1989, p.239-303.
- JADOT, G. *Le rat de Laboratoire Réactif Biologique*. Paris, 1981, p. 81-109.
- JANAS, L.M.; PICCIANO, M.F.; HATCH, T.F. Indices of protein metabolism in term infants fed human milk, whey predominant formula or cow's milk formula. *Pediatrics*, 75:775-784, 1985.
- JANAS, L.M.; PICCIANO, M.F.; HATCH, F.F. Indices of protein metabolism in term infants fed either human milk or formulas with reduced protein concentration and various whey/casein ratios. *Journal of Pediatrics*, 110: 838-848, 1987.
- JANSEN, G.R. Biochemical parameters and protein quality. In: BODWELL, C.E. & ADKINS, J.S. (eds). *Protein quality in humans*. London, AVI Publ. Co, 1981, p.119-147.

- JANSEN, G.R. Biological evaluation of protein quality. **Food Technology**, 32:52-56, 1978.
- JÄRVENPÄÄ, A.L.; RÄIHÄ, N.C.R.; RASSIN, D.K.; GAULL, G.E. Milk protein quantity and quality in the term infant. I - metabolic responses and effects on growth. **Pediatrics**, 70:214-220, 1982.
- JENNES, R. & SLOAN R.E. The composition of milks of various species: a review. **Dairy Science Abstracts**, 32: 599-612, 1970.
- JUNG, A. L. & CARR, S.L. A soy protein formula and a milk-based formula: a comparative evaluation in milk tolerant infants showed no significant nutritional differences. **Clinical Pediatrics**, 16: 982-985, 1977.
- KEITH, M.O.; YOUNGS, C.G. & McLAUGHLAN, J.M. The supplementation of pea protein concentrate with DL-methionine or methionine hydroxy analog. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, 10:1-4, 1977.
- KÖHLER, L.; MEEUWSE, G.; MORTENSSON, W. Food intake and growth of infants between six and twenty-six weeks of age on breast milk cow's milk formula or soy formula. **Acta Paediatrica Scandinavica**, 73:40-48, 1984.
- LO, C.W. Laboratory assessment of nutritional status. In: WALKER, W.A. & WATKINS, J.B. (eds.) **Nutrition in Pediatrics - Basic Science and Clinical Application**. Boston. Little, Brown of Company, 1985, p. 151-169.
- LONGENECKER, J.B. & HAUSE, N.L. Relationship between plasma amino acids and composition of ingested protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 84: 46-59, 1959.
- LÖNNERDAL, B. & CHEN, C.- L. Effects of formula protein level and ratio on infant growth, plasma amino acids and serum trace elements. **Acta Paediatrica Scandinavica**, 79:257-265, 1990.
- LÖNNERDAL, B. & ZETTERSTRÖM, R. Protein content of infant formula - how much and from what age? **Acta Paediatrica Scandinavica**, 77:321-325, 1988.

- McLAUGHLAN, J.M. Nutritional evaluation of proteins by biological methods. **Cereal Science Today**, 17:162-165, 1972.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição. Conselho Nacional de Saúde. **Normas para Comercialização de Alimentos para Lactentes**. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição, Brasília, D.F., 1989. 16p.
- MITCHELL, G.V. & JENKINS, M.Y. Assessment of protein quality methodology for infant formulas. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 68: 680-683, 1985.
- MITRUKA, B.M. & RAWNSLEY, H.M. **Clinical, Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental animal and Normal Humans**. New York. Masson Publ. USA, Inc. 2nd ed., 1978, p. 157-160.
- MOTIL, K.J. Protein needs for term and preterm infants. In: TSANG, R.C. & NICHOLS, B.L. (eds). **Nutrition During Infancy**. Philadelphia. Hanley & Belfus. 1988, p.100-121.
- NICHOLS, B.L. Infant feeding practice. In: TSANG, R.C. & NICHOLS, B.L. (eds). **Nutrition During Infancy**. Philadelphia, Hanley & Belfus, 1988, p.399-417.
- NOMMSEN, L.A.; LOVELADY, C.A.; HEINIG, M.J.; LÖNNERDAL, B.; DEWEY, K.G. Determinants of energy, protein, lipid and lactose concentrations in human milk during the first 12 months of lactation: The DARLING study. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 53: 457-465, 1991.
- O'DONNELL, A.M. **Nutrición Infantil**, Buenos Aires, ed. Celcius, 1986. 780p.
- ORGANIZACIÓN PAN AMERICANA DE LA SALUD. **Conocimientos actuales sobre nutrición**. Washington, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 1991, 6ªed. (OPAS, Publicación Científica, nº 532).
- PACKARD, V.S. **Human milk and infant formula**. New York, Academic Press, 1982, cap.6, p.140-175.

- PELLETT, P.L. & YOUNG, V.R. (eds.) **Nutritional evaluation of protein foods**. Tokyo. The United Nations University. 1980.154p.
- PETERS, J.C. & HARPER, A.E. Adaptation of rats to diets containing different levels of protein: effects on food intake, plasma and brain amino acid concentrations and brain neurotransmitter metabolism. **The Journal of Nutrition**, 115:382-398, 1985.
- PIAU-VIEIRA, C. **Avaliação da qualidade nutricional e microbiológica de ração autoclavável para ratos e camundongos de biotério livres de patógenos específicos (SPF)**. Campinas, 1992. 157p. Tese (mestre em Ciência da Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.
- POMPEI, C.; ROSSI, M.; MARE, F. Protein quality in commercial milk-based infant formulas. **Journal of Food Quality**, 10:375-391, 1987.
- RÄIHA, N.C.R.; MINOLI, I.; MORO, G. Milk protein intake in term infant: I - Metabolic responses and effects on growth. **Acta Paediatrica Scandinavica**, 75:881-886, 1986.
- RÄIHÄ, N.C.R. Nutritional proteins in milk and the protein requirement of normal infants. **Pediatrics**, 75(Suppl.):136-141, 1985.
- SARWAR, G. Amino acid ratings of different forms of infant formulas based on varying degrees of processing. In. FRIEDMAN, M. (ed.). **Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing**. New York, Plenum Press, 1991. p. 389-402.
- SARWAR, G. Digestibility of protein and bioavailability of amino acids in foods: effects on protein quality assessment. **World Review of Nutrition and Dietetics**, 54:26-70, 1987.
- 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. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 67:976-981, 1984.

- SARWAR, G.; BOTTING, H.G. & PEACE, R.W. Amino acid rating method for evaluating protein adequacy of infant formulas. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**. 72:622-626, 1989a.
- SARWAR, G. & McDONOUGH, F.E. Evaluation of protein digestibility - corrected amino acid score method for assessing protein quality of foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 73:347-356, 1990.
- SARWAR, G.; & McLAUGHLAN, J.M. Relative net protein ratio method for evaluating protein quality. **Nutrition Reports International**. 23:1156-1166, 1981.
- SARWAR, G.; PEACE, R. W. & BOTTING, H.G. Differences in protein digestibility and quality of liquid concentrate and powder forms of milk based infant formulas fed to rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 49:806-813, 1989b.
- SCOTT, P.H.; BERGER, H.M.; WHARTON, B.A. Growth velocity and plasma amino acids in the newborn. **Pediatric Research**, 19:446-450, 1985.
- SELLARS, W.A.; HALPERN, S.R.; JOHNSON, R.B.; ANDERSON Jr., D. W.; SAPERSTEIN, S.; SHANNON, B.S. New growth charts: soy, cow and breast milk comparison. **Annals of Allergy**, 29:126-134, 1971.
- SENIO, J.R. Introductory remarks by the chairman. In: SENIO, J.R. (ed.) **Medium Chain triglycerides**. Philadelphia, University of Pennsylvania, 1968, p. 3-7.
- SGARBIERI, V.C. **Alimentação e Nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas. Ed. da UNICAMP: ALMED, 1987. 387p.
- SNYDERMAN, S.E.; HOLT Jr, L.E.; NORTON, P.M.; ROITMAN, E. & PHANSALKAR, S.V. The plasma aminogram - I - Influence of the level of protein intake and a comparison of whole protein and amino acid diets. **Pediatric Research**. 2:131-144, 1968.
- TAYLOR, Y.S.L.; SCRIMSHAW, N.S.; YOUNG, V.R. The relationship between serum urea levels and dietary nitrogen utilization in young man. **The British Journal of Nutrition**, 32: 407-411, 1974.

- VITERI, F.E. Malnutrición primaria proteicoenergética: alteraciones clínicas, bioquímicas y metabólicas. En.: SUSIND, R.M. (ed.) **Tratado de Nutrición en Pediatría**. Barcelona. Salvat Ed. 1985.
- VOLTZ, V.R.; BOOK, L.S.; CHURELLA, H.R. Growth and plasma amino acid concentrations in term infants fed either whey predominant formula or human milk. **Journal of Pediatrics**, 102:27-31, 1983.
- WADDELL, C.A. & DESAI, T.D. The use of laboratory animals in nutrition research. **World Review of Nutrition and Dietetics**, 36:206-222, 1981.
- YOUNG, V.R.; MARCHINI, J.S.; CORTIELLA, J. Assessment of protein nutritional status. **Journal of Nutrition**, 120:1496-1502, 1990.
- YOUNG, V.R. & PELLETIER, V.A. Adaptation to high protein intakes with particular reference to formula feeding and the healthy term infant. **Journal of Nutrition**, 119:1799-1809, 1989.
- YOUNG, V.R. & PELLETT, P.L. Protein evaluation, amino acid scoring and the Food and Drug Administration's proposed food labeling regulations. **Journal of Nutrition**, 121:145-150, 1991.
- YOUNG, V.R. & SCRIMSHAW, N.S. Soybean protein in human nutrition: an overview. **Journal of American Oil Chemists' Society**. 56:110-120, 1979.
- ZIEGLER, E.E. & FOMON, S.L. Potential renal solute load of infant formulas. **Journal of Nutrition**, 119:1785-1788, 1989.

APÊNDICE

TABELA 18. Ingredientes utilizados na dieta não láctea e controles empregadas no ensaio biológico.

<i>INGREDIENTE</i>	<i>PSV^a</i>	<i>CTL/psv^b</i>	<i>ATP/psv^c</i>
	<i>g/kg de dieta</i>		
Fórmula láctea	640,0	-	-
Caseína comercial	-	100,0*	-
Carboidratos			
Lactose	31,6	390,0	390,0
Sacarose	117,7	109,0	209,0
Amido	104,0	104,0	104,0
Gorduras			
Óleo de milho	6,5	100,0	100,0
Gordura de côco	6,0	100,0	100,0
Mistura mineral AIN-76	33,8	35,0	35,0
Mistura vitamínica AIN-76	9,9	10,0	10,0
Bitartarato de colina	0,43	2,0	2,0
L-metionina	-	2,0	-
Celulose	50,0	50,0	50,0

1 - PSV: dieta cuja fonte protéica constou do produto 1, à base de soro desmineralizado de leite de vaca e leite de vaca integral.

2 - CTL/psv: dieta controle, à base de caseína suplementada com metionina.

3 - APT/psv: dieta aprotéica.

TABELA 19. Ingredientes utilizados na dieta não láctea e controles empregadas no ensaio biológico.

<i>INGREDIENTE</i>	<i>IPS^a</i>	<i>CTL/ips^b</i>	<i>APT/ips^c</i>
	<i>g/kg de dieta</i>		
Fórmula	513,0	-	-
Caseína comercial	-	100,0*	-
Carboidratos			
Dextrino-maltose	110,93	190,3	197,6
Sacarose	110,93	190,4	237,8
Amido	110,93	190,3	237,6
Gorduras			
Óleo de milho	68,2	140,0	140,0
Óleo de côco	68,2	140,0	140,0
Mistura mineral AIN-76	12,19	35,0	35,0
Mistura vitamínica AIN-76	3,34	10,0	10,0
L-metionina	0,62	2,0	-
Bitartarato de colina	1,66	2,0	2,0

* Caseína com grau de pureza de 80%. Valor corrigido para compor 8% da dieta.

a - PSV: dieta cuja fonte protéica constou do produto 1, à base de soro desmineralizado de leite de vaca e leite de vaca integral.

b - CTL/psv: dieta controle, à base de caseína suplementada com metionina.

c - APT/psv: dieta aprotéica.