



DIGESTIBILIDADE IN VITRO E IN VIVO DE PROTEÍNAS DE ALIMENTOS: ESTUDO COMPARATIVO*

Christiano Vieira PIRES**
Maria Goreti de Almeida OLIVEIRA***
José César ROSA****
Geraldina Aldina Dias Rodrigues CRUZ**
Fabrícia Queiroz MENDES**
Neuza Maria Brunoro COSTA*****

■ **RESUMO:** O presente trabalho teve como objetivos determinar a digestibilidade *in vivo*, ajustar equações para a determinação da digestibilidade *in vitro* por meio de diferentes métodos e verificar qual método desenvolvido para a digestibilidade *in vitro* apresenta maior correlação com a digestibilidade *in vivo*. Foram utilizadas as seguintes fontes de proteína: carne de rã sem osso, carne de rã com osso, carne de rã mecanicamente separada (CMS), carne bovina, ovo em pó, caseína, trigo, milho, soja convencional, soja isenta de inibidor de tripsina Kunitz e de lipoxigenases (soja KTI-LOX-), proteína texturizada de soja (PTS) e feijão. Para o cálculo da digestibilidade *in vitro* foram utilizados os valores de pH obtidos em 10 min (método 1) e 20 min (Método 2) após a adição da solução de enzimas e o do pH estático (método 3), o qual mede o volume de NaOH adicionado, necessário para manter em 8,0 o valor de pH da solução de proteínas após a adição da solução enzimática. No método da queda de pH, as melhores equações foram obtidas com os valores de pH obtidos após 10 min da solução de enzimas. Dessas equações, as que tiveram maiores valores de R² foram confeccionadas sem a presença de caseína. No método do pH estático as equações que permitiram melhor correlação entre volumes de NaOH com digestibilidade foram aquelas nas quais se usavam todas as fontes de proteína e aquela em que não estava presente a caseína. O uso de técnicas *in vitro* para a determinação da digestibilidade protéica traz uma série de benefícios, pois requer menos tempo, é mais barato e requisita de menos mão-de-obra e espaço físico.

■ **PALAVRAS - CHAVES:** Qualidade protéica; digestibilidade *in vitro*; digestibilidade *in vivo*.

INTRODUÇÃO

Ao se fazer a recomendação de proteína para diferentes grupos populacionais,⁸ além da composição aminoacídica da alimentação, devem ser consideradas a quantidade total de nitrogênio e a digestibilidade da mistura protéica.²⁰ Uma

mistura protéica de boa qualidade ou de alto valor biológico é aquela que fornece quantidades adequadas de aminoácidos essenciais e nitrogênio total, além de boa digestibilidade.

A digestibilidade da proteína é determinada em função da fração do nitrogênio ingerido que o animal absorve. A digestibilidade verdadeira é obtida pela diferença entre o nitrogênio ingerido e aquele que aparece nas fezes corrigido pela quantidade de nitrogênio fecal excretado quando o indivíduo consome uma dieta livre de proteína.⁹

Os alimentos de origem animal apresentam maior digestibilidade que os de origem vegetal. O fato de os alimentos de origem animal não conterem fibra alimentar e fatores antinutricionais faz com que a velocidade de trânsito intestinal seja mais lenta e, em consequência, obtenha-se maior absorção dos nutrientes.¹¹ Vários fatores têm sido identificados que interferem na digestibilidade, dentre estes se incluem a presença de componentes biologicamente ativos, tratamento térmico e estrutura química da proteína. Esses fatores afetam a digestibilidade da proteína, diminuindo a sua hidrólise, tornando os aminoácidos menos disponíveis para serem absorvidos pelo organismo.¹³

Todos os métodos de determinação de digestibilidade *in vitro* se baseiam em digerir a amostra com enzimas proteolíticas em condições padronizadas. A diferença está entre o número e a natureza das enzimas que se utilizam e a medida final a ser realizada.

A digestibilidade é estimada usando enzimas proteolíticas que agem normalmente na digestão, procurando-se imitar, inclusive, as condições de pH ou de acidez, características do estômago e do intestino onde a digestão das proteínas se processa.

O método desenvolvido por Mauron et al.¹⁶ é adaptado como método oficial pela AOAC² para determinar a digestibilidade de proteínas alimentares de origem animal. Baseia-se em digerir a amostra com pepsina e determinar a porcentagem de nitrogênio solubilizado. O método tem sofrido numerosas modificações devido à sua baixa correlação com os ensaios biológicos.

Os primeiros métodos de determinação da

*Trabalho elaborado com apoio financeiro do CNPq e FAPEMIG.

**Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - BIOAGRO - Universidade Federal de Viçosa - 36571-000 - Viçosa - MG - Brasil.

***Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - BIOAGRO - Universidade Federal de Viçosa - 36571-000 - Viçosa - MG - Brasil

****Departamento de Biologia Celular Molecular e Bioagentes Patogênicos- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - 14049-900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil.

*****Departamento de Nutrição e Saúde - Universidade Federal de Viçosa - 36571-000 - Viçosa - MG - Brasil.

digestibilidade *in vitro* eram caros e de longa duração, o que dificulta sua aplicação no controle de qualidade. Hsu et al.,¹² a respeito da correlação entre velocidade inicial de proteólise e digestibilidade, desenvolveram um método rápido e sensível, baseado na medida de pH, para determinar a digestibilidade de proteínas. Para isto, é feita a digestão de uma suspensão de amostras com uma solução multienzimática (tripsina, quimotripsina e peptidase). A diminuição do pH, produzida pela digestão enzimática das proteínas, é registrada automaticamente durante 10 min. Paralelamente determinou-se a digestibilidade *in vivo* das mesmas amostras. A equação de regressão obtida a partir de ambos os valores permitiu prever a digestibilidade. O método é capaz de detectar o efeito do tratamento térmico sobre a digestibilidade.

O presente trabalho teve como objetivos determinar a digestibilidade *in vivo*, ajustar equações para a determinação da digestibilidade *in vitro* por meio de diferentes métodos e verificar qual método desenvolvido para a digestibilidade *in vitro* apresenta maior correlação com a digestibilidade *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Enzimologia do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) - MG.

Foram utilizadas as seguintes fontes de proteína: caseína, carne de rã sem osso, carne de rã com osso, carne de rã mecanicamente separada (CMS), carne bovina, ovo em pó, trigo, milho, feijão, soja convencional, soja isenta de inibidor de tripsina Kunitz e lipoxigenases (soja KTI-LOX-) e proteína texturizada de soja (PTS).

Preparo das Amostras

Foi utilizada caseína comercial obtida da RHOSTER-Indústria e Comércio Ltda. Carne de rã sem osso foi obtida retirando-se manualmente a parte óssea. Carne de rã com osso foi obtida triturando-se toda a rã sem a separação da parte óssea. Carne de rã mecanicamente separada (CMS) foi obtida pela separação da parte óssea por meio de máquina. Carne de rã sem osso, com osso, CMS e carne bovina foram moídas e desidratadas. O ovo em pó foi obtido por meio de liofilização. Trigo e milho foram adquiridos do comércio de Viçosa-MG, na forma de farinha de trigo e fubá, respectivamente. O feijão utilizado foi da variedade Pérola (*Phaseolus vulgaris* L.), cozido por 40 minutos em panela de pressão, seco em estufa e moído. Soja convencional e linhagem de soja isenta de inibidor de tripsina Kunitz e lipoxigenases (soja KTI-LOX-) foram submetidas a tratamento térmico em calor seco de 89°C por 5 minutos. Após a remoção das cascas, os grãos foram moídos obtendo-se então uma farinha de soja. Proteína texturizada de

soja (PTS) foi adquirida no comércio de Viçosa-MG e moída para obtenção de uma farinha.

O teor de proteína de cada amostra foi realizado pelo método semimicro Kjeldhal, segundo AOAC.¹ No cálculo de conversão do nitrogênio em proteínas foi utilizado o fator 6,25.

Ensaio Biológico

Foram preparadas uma dieta aprotéica, uma dieta de caseína (padrão) e as dietas testes, contendo as amostras protéicas estudadas, conforme apresentado na Tabela 1.

A composição das dietas foi baseada na AIN-93G, segundo Reeves et al.,¹⁹ com o teor de proteínas alterado para 9% a 10%. Após o preparo, determinou-se o teor de proteína de cada dieta, pelo método semimicro-Kjeldahl, usando o fator 6,25 para a obtenção do teor de proteína.¹ As dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente rotulados e armazenados em refrigerador.

Animais

Foram utilizados 54 ratos machos, raça Wistar, recém desmamados, com média de 23 dias de idade, peso variando de 50 a 60 gramas, provenientes do biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os animais foram divididos em nove grupos com seis animais cada, de modo que a média dos pesos entre os grupos não excedesse a 5 g. Os ratos foram alocados em gaiolas individuais, onde receberam água e suas dietas *ad libitum* por 14 dias. Os animais foram mantidos em condições de temperatura de 22 ± 3°C e foi feito o monitoramento do consumo alimentar semanalmente.

Digestibilidade Verdadeira

Para a determinação da digestibilidade, as dietas foram marcadas com indigocarmin na proporção de 100 mg/100g e oferecidas aos animais no 7º e 13º dias. As fezes foram coletadas do 8º ao 14º dias em recipientes individuais para cada animal e mantidas sob refrigeração.

Ao término do experimento, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar a 105°C por 24 h. Em seguida foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador para determinação da concentração de nitrogênio, pelo método semimicro-Kjeldahl, com amostras em triplicata.¹

A digestibilidade verdadeira foi calculada medindo a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, a excretada nas fezes e a perda metabólica nas fezes, que corresponde ao nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica. Esta última foi estimada pela quantidade de nitrogênio excretada pelos ratos alimentados com a dieta livre de nitrogênio.

O cálculo da digestibilidade verdadeira (DV) foi feito de acordo com a seguinte equação:

Tabela 1 - Formulação das dietas utilizadas no experimento com ratos (g/100g de mistura)*.

Ingredientes	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Carne bovina ¹	11,62	-	-	-	-	-	-	-	-
Ovo em pó ¹	-	19,56	-	-	-	-	-	-	-
Trigo ¹	-	-	82,14	-	-	-	-	-	-
Milho ¹	-	-	-	86,58	-	-	-	-	-
Soja ¹	-	-	-	-	22,70	-	-	-	-
Soja KTI-LOX ⁻¹	-	-	-	-	-	23,75	-	-	-
PTS ¹	-	-	-	-	-	-	17,83	-	-
Caseína ²	-	-	-	-	-	-	-	11,65	-
Aprotéica	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mistura Salínica (AIN-93G-MX) ^{2,*}	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica (AIN-93G-VX) ^{2,*}	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Óleo de soja ³	6,15	0,54	7,0	4,37	2,46	2,25	7,0	7,0	7,0
Bitartarato de Colina ²	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho (q.s.p 100) ³	48,98	46,64	0,80	0,00	41,59	40,75	41,92	48,10	59,75
L-cistina ²	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Fibra alimentar (Celulose) ²	5,00	5,00	5,00	4,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,0
Amido de milho dextrinizado ²	13,2	13,2	0,00	0,00	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose ³	10,0	10,0	0,00	0,00	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

* Segundo Reeves et al.¹⁹

¹ Farinha produzida a partir das amostras analisadas.

² Obtido da RHOSTER – Indústria e Comércio Ltda.

³ Obtido no comércio de Viçosa, MG.

Os dados para: Carne de rã sem osso, Carne de rã com osso e CMS foram obtidos de Fideles.⁸

Os dados para feijão pérola foram obtidos de Lujan.¹⁴

D1: Dieta com carne bovina; D2: Dieta com ovo; D3: Dieta com trigo; D4: Dieta com milho; D5: Dieta com soja; D6: Dieta com soja KTI-LOX-; D7: Dieta com PTS; D8: Dieta com caseína; D9: Dieta apteica.

$$(\%) \text{ Digestibilidade} = [I - (F-FK)] \times 100 / I$$

I = Nitrogênio ingerido pelo grupo teste.

F = Nitrogênio fecal do grupo teste.

FK = Nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

Digestibilidade *in vitro*

Três métodos foram analisados para ensaio de digestibilidade *in vitro*, utilizando-se um sistema enzimático contendo as enzimas tripsina e pancreatina. As equações obtidas foram usadas para correlacionar os estudos *in vitro* com os ensaios *in vivo* e, dessa forma, prever a digestibilidade.

O presente trabalho utilizou para a hidrólise da solução de proteínas uma solução enzimática contendo as enzimas tripsina (2,5 mg/mL) e pancreatina (1,6 mg/mL) para os três métodos. A solução enzimática foi preparada antes de cada série de testes e mantida em banho de gelo.

Método descrito por Hsu et al.,¹² com modificações (Método 1)

Baseia-se na correlação entre velocidade inicial de proteólise e digestibilidade, medida através do pH, utilizando-se uma solução enzimática para digerir a amostra. O método descrito por Hsu et al.¹² utiliza as enzimas tripsina, quimotripsina e peptidase. O presente trabalho utilizou para a hidrólise da solução de proteínas uma solução enzimática contendo as enzimas tripsina e pancreatina.

Ajustou-se o pH de 50 mL da suspensão protéica em água destilada (contendo 6,25 mg de proteína/mL), para pH 8, sob agitação, em banho-maria a 37 °C. Cinco mililitros da solução enzimática foram, então, adicionados à suspensão protéica mantida em banho-maria a 37 °C. A queda do pH foi medida após a adição da solução enzimática, a partir de 15 seg e posteriormente de 1 em 1 min, por um período de 10 min, usando-se um potenciômetro da marca Analion. A digestão enzimática foi caracterizada pela queda do pH 10 min após adição da solução enzimática e ajuste da equação que descreve a queda do pH versus tempo. A queda do pH após 15 seg e 10 min e a equação dos parâmetros foram utilizados para descrever a correlação com a digestibilidade verdadeira *in vivo*.

Método descrito por Saterlee et al.,²¹ com modificações (Método 2)

A técnica baseia-se na correlação entre velocidade inicial de proteólise e digestibilidade, medida através do pH, utilizando-se uma solução enzimática para digerir a amostra.

O método descrito por Saterlee et al.²¹ usa as enzimas tripsina, quimotripsina e peptidase. O presente trabalho utilizou para a hidrólise da solução de proteínas uma solução enzimática contendo as enzimas tripsina e pancreatina.

Ajustou-se o pH de 50 mL da suspensão protéica em

água destilada (contendo 6,25 mg de proteína/mL), para pH 8, sob agitação, em banho-maria a 37 °C. Cinco mililitros da solução enzimática foram, então, adicionados à suspensão protéica mantida em banho-maria a 37 °C. Após 10 min, mais 5,0 mL de solução enzimática foram adicionados ao sistema. E a queda do pH foi medida após 20 min da primeira adição da solução enzimática, usando-se um potenciômetro da marca Analion. A digestão enzimática foi caracterizada pela queda do pH após 20 min da adição da solução enzimática e ajuste da equação que descreve a queda do pH versus tempo. A queda do pH após 20 min e a equação dos parâmetros foram utilizadas para descrever a correlação com a digestibilidade verdadeira *in vivo*.

Método descrito por Cruz,⁷ com modificações (Método 3)

Foram utilizadas para a solução enzimática as enzimas tripsina e pancreatina. Já o método descrito por Cruz⁷ utiliza as enzimas tripsina, quimotripsina e pancreatina.

Ajustou-se o pH de 50 mL da suspensão protéica em água destilada (contendo 6,25 mg de proteína/mL), para pH 8, sob agitação, em banho-maria a 37 °C. Cinco mililitros da solução enzimática foram, então, adicionados à suspensão protéica mantida em banho-maria a 37 °C. Em seguida foi adicionado NaOH 0,1 N, em quantidade suficiente para manter o pH em 8,0, independentemente do tempo de 10 min, desde que a queda de pH não variasse mais do que 0,03 unidade em 1 min. O fator 0,03 foi obtido através da hidrólise da caseína, durante a queda do pH, entre o tempo de 9 a 10 min, pois a partir desse ponto a diferença de pH é muito pequena, não sendo, portanto, significativa.⁷ Posteriormente, mediu-se o volume de NaOH gasto durante o teste. A digestão enzimática foi caracterizada pelo volume de NaOH 0,1 N gasto durante o teste e por uma equação que descreve o volume de NaOH, requeridos para manter o pH em 8. O volume de NaOH gasto durante o teste e a equação dos parâmetros foram utilizados para descrever a correlação com a digestibilidade verdadeira *in vivo*.

Equações de digestibilidade *in vitro*

Para os três métodos, várias combinações das amostras foram analisadas, verificando, dessa forma, a interferência do tipo de fonte protéica na digestibilidade da proteína. Para cada método, a digestibilidade *in vitro* foi comparada: a) à digestibilidade verdadeira de todas as amostras; b) à digestibilidade verdadeira de todas as amostras, exceto a caseína; c) à digestibilidade verdadeira das amostras de proteínas vegetais e d) à digestibilidade verdadeira das amostras de proteínas de origem animal.

Para o método 1, a digestibilidade verdadeira foi descrita em função da queda de pH das amostras coletadas após 10 min da solução de enzimas. Para o método 2, com modificações, a digestibilidade verdadeira foi descrita em função da queda de pH das amostras coletadas após 20 min da solução de enzimas. Para o método 3, a digestibilidade ver-

dadeira foi descrita em função do volume de NaOH 0,1 N gasto para manter em 8,0 o pH da solução de proteínas após a adição da solução enzimática.

Delineamento estatístico

Procedeu-se à análise estatística (ANOVA) para a determinação do valor de F. Para valores significativos, utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade, para comparação entre as médias. Para a obtenção das equações de digestibilidade *in vitro* foi utilizada a regressão não-linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Digestibilidade verdadeira

A digestibilidade é a medida da percentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas, na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado, pelo organismo.¹⁶ Os valores obtidos para a digestibilidade *in vivo* das amostras estudadas variaram entre 71,76% (soja convencional) e 93,37% (carne de rã

sem osso) (Tabela 2). A digestibilidade verdadeira encontrada na carne de rã sem osso e para caseína foram superiores, porém não diferiram ($p>0,05$) dos valores obtidos na digestibilidade da CMS (92,57%), carne bovina (92,38%) e carne de rã com osso (91,01%). Das proteínas de origem animal, a que apresentou menor digestibilidade foi a do ovo em pó (90,13%), não diferindo, porém, em nível de 5% de probabilidade, das digestibilidades de CMS (92,57%), carne bovina (92,38%), carne de rã com osso (91,01%) e trigo (89,44%).

As proteínas de origem animal apresentaram maiores valores de digestibilidade verdadeira que as de origem vegetal, possivelmente devido à ausência de fatores antinutricionais, os quais sabidamente contribuem para diminuir a digestibilidade em alimentos de origem vegetal. Segundo Cassidy,⁵ fontes vegetais de proteínas podem diferir de fontes de origem animal dentro de condições de digestibilidade, composição de aminoácidos e presença de fatores antinutricionais.

A digestibilidade verdadeira do trigo (89,44%) foi a maior encontrada entre as proteínas de origem vegetal, diferindo das outras proteínas vegetais ($p<0,05$). Entretanto, não diferiu ($p>0,05$) das proteínas de origem animal carne de rã com osso e ovo em pó.

Tabela 2 - Médias da digestibilidade protéica *in vivo* das amostras de proteína estudadas.

Fontes de Proteína	Digestibilidade Verdadeira (%)
Caseína comercial	93,33 a
Carne de rã sem osso desidratada	93,37a
Carne de rã mecanicamente separada desidratada	92,57 ab
Carne bovina desidratada	92,38 ab
Carne de rã com osso desidratada	91,01 abc
Ovo em pó liofilizado	90,13 bc
Trigo (farinha de trigo)	89,44 c
Proteína texturizada de soja	86,41d
Milho (fubá)	82,38 e
Farinha de feijão Pérola cozido e seco	78,70 f
Farinha de soja KTI-LOX-	74,26 g
Farinha de soja	71,76 g

Os resultados são médias de seis repetições.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Digestibilidade *in vitro*

Curvas de digestibilidade em função da queda de pH (medido a 10 min)-Método 1

Para a elaboração das equações de digestibilidade *in vitro* foram anotados os valores de pH observados em 10 min após a adição da solução de enzimas. Esses valores foram correlacionados com as respectivas digestibilidades *in vivo* das amostras, sendo escolhido o melhor modelo matemático para descrever o sistema.

As equações elaboradas a partir de valores de pH medidos após 10 min da solução de enzimas estão mostradas na Figura 1.

Na Figura 1A está a equação obtida usando os dados de digestibilidade *in vivo* e queda de pH de todas as fontes protéicas. A equação obtida é polinomial e possui um R^2 de 52,63%. Na Figura 1B foram utilizadas todas as fontes de proteína, com exceção da caseína, obtendo-se, assim, uma equação com R^2 de 79,04%. Já na Figura 1C estão somente as proteínas de origem vegetal, as quais permitiram a obtenção de uma equação polinomial de digestibilidade em função de pH com um valor de R^2 de 81,78%. As equações obtidas nas Figuras 1B e 1C foram

as que melhor explicaram o comportamento da queda de pH após 10 min, em função da digestibilidade *in vivo*. A equação obtida pela Figura 1D, na qual foram utilizados somente dados de proteínas de origem animal, foi a que permitiu pior ajuste, com um valor de R^2 de 19,86%, sendo, então, a equação que menos explicou o comportamento da digestibilidade *in vitro* em relação aos valores de digestibilidade *in vivo*. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de os valores de digestibilidade das proteínas de origem animal serem muito próximos e, ao se medir a queda de pH, os valores encontrados diferirem em fonte protéica.

O fato da equação obtida na Figura 1A possuir baixo valor de R^2 deve estar associado à grande queda de pH obtida na caseína, sendo bem abaixo do valor de pH encontrado nas outras amostras. Portanto, esse ponto ficou muito distante dos demais, o que comprometeu o comportamento da equação. Nas equações obtidas nas Figuras 1B e 1C, o fato dos valores encontrados na caseína não serem usados permitiu melhores ajustes das equações. Os valores de digestibilidade *in vitro* encontrados a partir das equações obtidas nas Figuras 1A, 1B e 1C, comparados com os respectivos valores de digestibilidade *in vivo*, estão apresentados na Tabela 3.

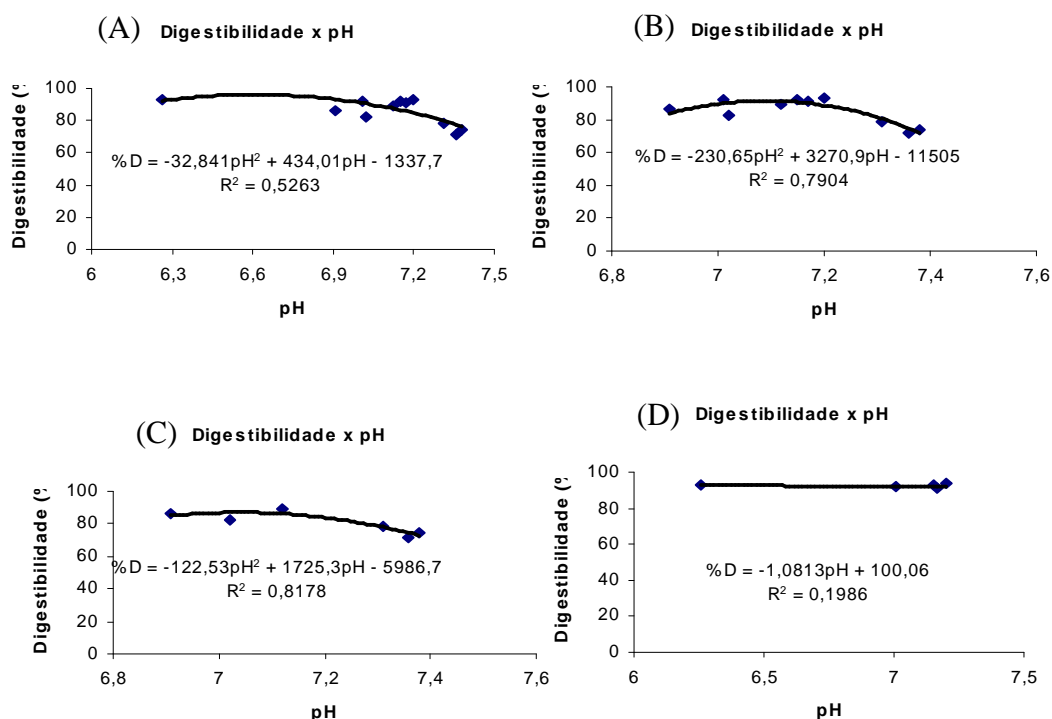


FIGURA 1 - Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir da queda de pH (Método 1) e da digestibilidade *in vivo* de todas as proteínas estudadas (A), de todas as proteínas estudadas, exceto a caseína (B), proteínas de origem vegetal (C), das proteínas de origem animal (D). Cada ponto representa a média de seis repetições.

Pode-se observar que os valores de digestibilidade *in vitro* obtidos pelas equações 2 e 3 estão mais próximos daqueles de digestibilidade *in vivo*. Com relação à digestibilidade *in vitro* das proteínas de origem animal, a equação 2 foi a que permitiu valores mais próximos quando comparada com a digestibilidade *in vitro*. Já para as proteínas de origem vegetal, embora a equação 2 tenha possibilitado bons resultados, a equação 3 foi a que levou à obtenção de resultados mais próximos entre as digestibilidades *in vivo* e *in vitro*.

Curvas de digestibilidade em função da queda de pH (medido a 20 min)-Método 2

Para a elaboração das equações de digestibilidade *in vitro* foram anotados os valores de pH observados 20 min após a adição da solução de enzimas. Esses valores foram correlacionados com as respectivas digestibilidades *in vivo* das amostras, sendo escolhido o melhor modelo matemático para descrever o sistema.

As equações elaboradas a partir de valores de pH

Tabela 3 - Valores de digestibilidade *in vitro* calculados para cada uma das equações a 10 e 20 min (Métodos 1 e 2).

Fontes de Proteína	Digestibilidade Verdadeira <i>in vivo</i> (%)	Digestibilidade <i>in vitro</i>					
		Método 1			Método 2		
		Todas as amostras ¹	Sem Caseína ²	Prot. Vegetais ³	Todas as amostras ⁴	Sem Caseína ⁵	Prot. Vegetais ⁶
Caseína	93,33	92,24	-	-	92,64	-	-
Carne de rã sem osso	93,37	85,83	89,89	-	87,51	89,83	-
CMS	92,57	86,26	90,53	-	85,82	88,52	-
Carne bovina	92,38	90,90	89,84	-	90,71	89,68	-
Carne de rã com osso	91,01	84,69	88,58	-	84,73	87,33	-
Trigo	89,44	87,60	91,14	85,85	86,17	88,85	83,32
PTS	86,41	93,21	90,19	86,58	93,19	85,37	85,38
Milho	82,38	90,63	83,82	84,55	90,45	89,86	85,72
Feijão Pérola	78,70	80,02	80,24	77,72	82,80	84,65	80,18
Soja KTI-LOX-	74,26	76,63	72,03	72,49	75,63	70,30	71,53
Soja	71,76	77,63	74,61	74,11	78,96	77,66	75,80

1 %D = -32,841pH² + 434,01pH - 1337,7 (R² = 0,5263).

2 %D = -230,65pH² + 3270,9pH - 11505 (R² = 0,7904).

3 %D = -122,53pH² + 1725,3pH - 5986,7 (R² = 0,8178).

4 %D = -29,623pH² + 384,14pH - 1149,2 (R² = 0,4851).

5 %D = -171,8pH² + 2398pH - 8277,6 (R² = 0,6441).

6 %D = -76,947pH² + 1060,1pH - 3565,4 (R² = 0,6808).

medidos após 20 min da solução de enzimas estão mostradas na Figura 2.

Na Figura 2A está a equação obtida usando os dados de digestibilidade e queda de pH de todas as fontes proteicas. A equação obtida é polinomial e possui um R² de 48,51%. Na Figura 2B foram utilizadas todas as fontes de proteína, à exceção da caseína, obtendo-se, assim, uma equação com R² de 64,41%. Já na Figura 2C estão somente as proteínas de origem vegetal, as quais permitiram a obtenção de uma equação polinomial de digestibilidade em função de pH com um valor de R² de 68,08%. As equações obtidas nas Figuras 2B e 2C foram as que melhor explicaram o comportamento da queda de pH após 20 min em função da digestibilidade *in vivo*.

A equação obtida pela Figura 2D, na qual se utilizaram somente os valores de proteínas de origem animal, foi a que permitiu o pior ajuste, com um valor de R² de 16,15%, sendo, então, a equação que menos explicou o comportamento da digestibilidade *in vitro* em relação aos valores de digestibilidade *in vivo*. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de os valores de digestibilidade das proteínas de origem animal *in vivo* serem muito próximos e de, ao medir a queda de pH, os valores de pH encontrados em cada fonte proteica terem diferido, devido às características tamponantes de cada fonte proteica. Hsu et al.¹² ressalta que substâncias tamponantes podem interferir nos resultados obtidos de digestibilidade *in vitro* pelo método de queda de pH.

Como o observado para o método 1, as equações de digestibilidade *in vitro* confeccionadas com valores de pH

coletados após 20 min, usando-se a caseína, proporcionou pior ajuste (Figura 2A).

Os valores de digestibilidade *in vitro* encontrados a partir das equações obtidas nas Figuras 2A, 2B e 2C, comparados com os respectivos valores de digestibilidade *in vivo*, estão apresentados na Tabela 3.

Ao comparar as equações obtidas a 10 min (Método 1) e a 20 min (Método 2), pode-se observar que aquelas feitas a partir de dados de pH coletados após 10 min foram as que permitiram obter valores de digestibilidade *in vitro* mais próximos aos de digestibilidade *in vivo*, independentemente da presença ou ausência de caseína. Pode-se notar que as digestibilidades *in vitro* calculadas pelas três equações levaram à obtenção de valores mais distantes da digestibilidade *in vivo* que aqueles calculados pela equações de queda de pH após 10 min.

Método do pH estático (Método 3)

Para a determinação da digestibilidade *in vitro* pelo método do pH estático, foi medido o volume de solução de NaOH 0,1 N necessário para manter em 8,0 o pH da solução de proteínas após a adição da solução de enzimas, independentemente do tempo.

As equações obtidas pelas Figuras 3A e 3B foram as que permitiram a obtenção de melhores ajustes com valores de R² de 84,98 e 83,78%, respectivamente. Para a obtenção da equação da Figura 3A, foram utilizadas todas as fontes proteicas e para a equação da Figura 3B, todas as proteínas,

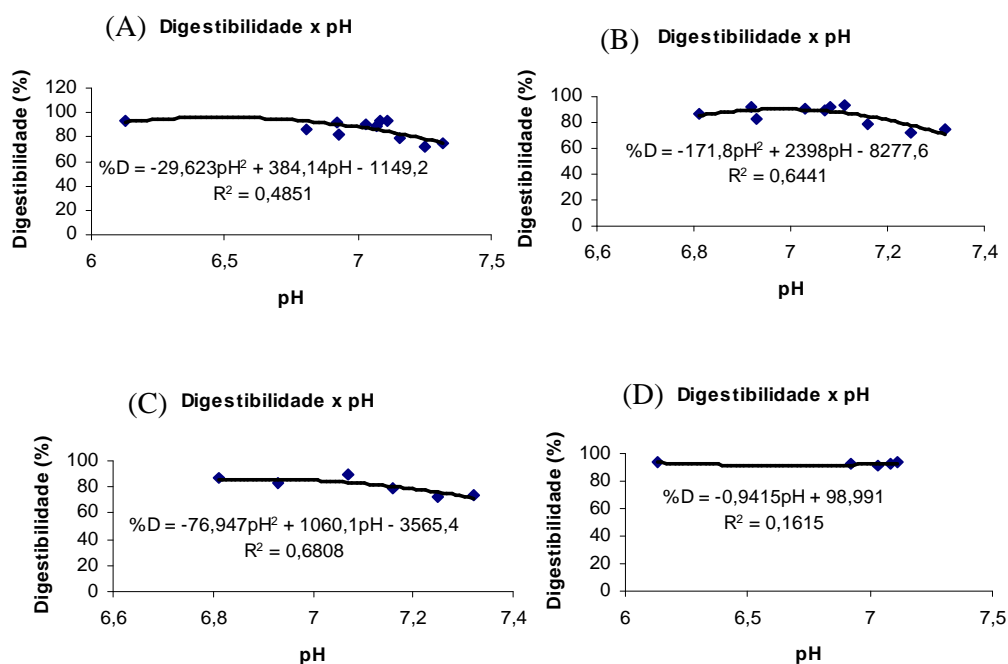


FIGURA 2 - Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir da queda de pH (Método 2) e da digestibilidade *in vivo* de todas as proteínas estudadas (A), de todas as proteínas estudadas, exceto a caseína (B), proteínas de origem vegetal (C), das proteínas de origem animal (D). Cada ponto representa a média de seis repetições.

à exceção da caseína. As equações que menos explicaram o comportamento da digestibilidade em função do volume de NaOH 0,1 N adicionado foram aquelas obtidas por meio das Figuras 3C e 3D, as quais foram confeccionadas usando-se apenas as proteínas de origens vegetal e animal, respectivamente, permitindo a obtenção de um R² de 43,29% (Figura 3C) e de 26,64% (Figura 3D).

Os resultados da digestibilidade *in vitro* calculados, utilizando-se cada uma das equações obtidas pelo método do pH estático (Método 3), estão apresentados na Tabela 4. As equações obtidas com todas as proteínas e a equação obtida sem a presença de caseína permitiram a obtenção de valores de digestibilidade *in vitro* bem próximos aos da digestibilidade *in vivo*, principalmente com relação a proteínas de origem animal. Já na equação obtida usando somente as proteínas de origem vegetal os valores de digestibilidade *in vitro* se mostraram um pouco distantes em relação aos de digestibilidade *in vivo*. Para o cálculo de digestibilidade *in vitro* pelo método do pH estático, pode ser observado que este se torna mais eficiente na presença das proteínas de origem animal juntamente com as de origem vegetal. Quando se trabalha somente com proteínas de origem vegetal, a correlação da digestibilidade *in vitro* com a *in vivo* é baixa, uma vez que o R² foi de apenas 43,29%.

Pires,¹⁸ estudando a digestibilidade de 11 variedades de feijão, encontrou para digestibilidade *in vitro* valores em média 70,5% daqueles de digestibilidade *in vivo*, porém os resultados foram apresentados em percentagem de

hidrólise. Marquez & Lajolo¹⁵ verificaram que a digestibilidade *in vitro* (21, 40 e 31%) é menor que a *in vivo* (71, 69 e 72%) nas variedades Carioca, Rosinha G2 e Rico, respectivamente. Porém, não foi estabelecida correlação entre os métodos *in vivo* e *in vitro*.

Carias et al.,⁴ de acordo com o método descrito por Hsu et al.,¹² determinou a digestibilidade *in vitro* de várias fontes protéicas, encontrando coeficiente de correlação com a digestibilidade verdadeira de 0,938.

Cardoso³ determinou a digestibilidade *in vitro* de genótipos de soja pelo sistema pepsina-pancreatina, de acordo com o método de Saunders et al.²² Ele constatou, para a porcentagem de digestibilidade *in vitro* em relação à digestibilidade *in vivo*, valores que variaram de 5,28 a 5,60% na farinha de soja crua, de 10,54 a 25,32% na farinha processada a 120 °C/9 min, de 12,38 a 22,54% na farinha processada a 120 °C/12 min, de 11,55 a 36,43% na farinha processada a 120 °C/15 min e de 18,53 a 29,02% na farinha processada a 120 °C/18 min.

Pelo método do pH estático para digestibilidade *in vitro*, Cruz⁶ obteve os maiores valores de R² comparados com os ensaios de digestibilidade *in vivo* de diferentes variedades de feijões recém-colhidos e armazenados. O método permitiu obter valores de R² que variaram de 0,75 a 0,83.

Os métodos ajustados neste trabalho para proteínas de origens animal e vegetal proporcionaram, portanto, valores de digestibilidade *in vitro* bem próximos daqueles *in vivo*, permitindo, assim, o uso dessas metodologias para a predição,

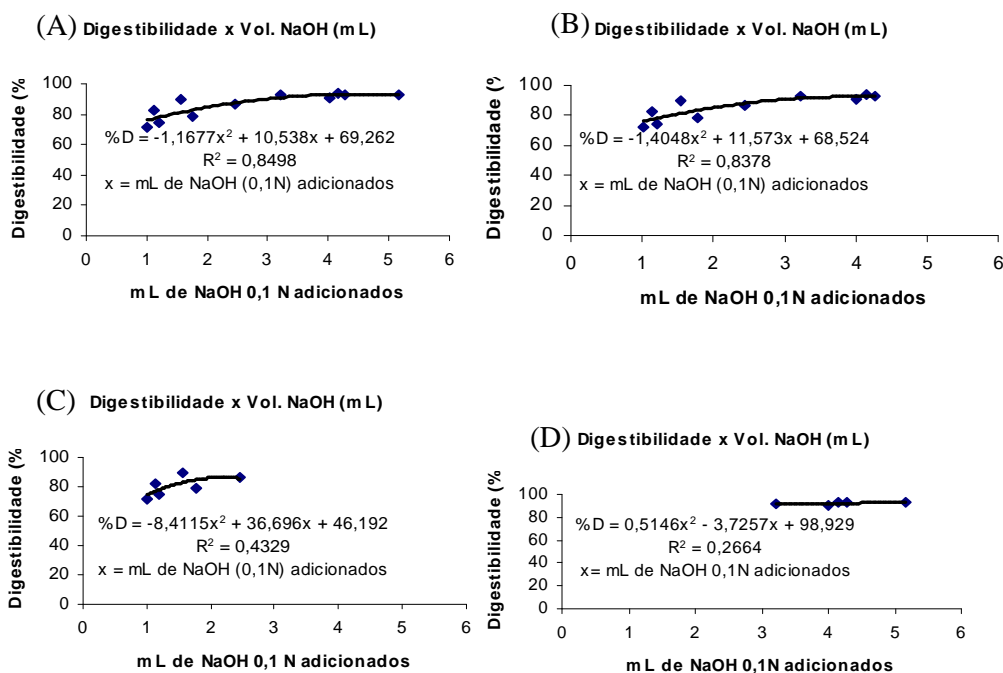


FIGURA 3 - Curva de digestibilidade *in vitro* elaborada a partir do volume de NaOH gasto para manter o pH em 8,0 (Método 3) e da digestibilidade *in vivo* de todas as proteínas estudadas (A), de todas as proteínas estudadas, exceto a caseína (B), proteínas de origem vegetal (C), das proteínas de origem animal (D). Cada ponto representa a média de seis repetições.

Tabela 4 - Valores de digestibilidade *in vitro* calculados por cada uma das equações pelo método do pH estático (Método 3).

Fontes de Proteína	Digestibilidade Verdadeira <i>in vivo</i> (%)	Todas as Amostras ¹	Sem Caseína ²	Proteínas Vegetais ³
Caseína	93,33	92,53	-	-
Carne de rã sem osso	93,37	92,74	92,34	-
CMS	92,57	92,88	92,36	-
Carne bovina	92,38	92,97	92,32	-
Carne de rã com osso	91,01	91,09	91,22	-
Trigo	89,44	82,79	83,09	82,86
PTS	86,41	79,68	79,81	76,92
Milho	82,38	78,71	78,78	74,67
Feijão Pérola	78,70	88,07	88,45	85,61
Soja KTILOX	74,26	80,23	80,39	78,11
Soja	71,76	84,26	84,61	84,79

1%D = $-1,1677x^2 + 10,538x + 69,262$ (R² = 0,8498).

2%D = $-1,4048x^2 + 11,573x + 68,524$ (R² = 0,8378).

3%D = $-8,4115x^2 + 36,696x + 46,192$ (R² = 0,4329).

em que: x = mL de NaOH (0,1 N) adicionado

além de gastar uma pequena quantidade da fonte protéica.

A digestibilidade de uma fonte protéica pode variar dependendo da procedência, da variedade, de tratamentos térmicos ou outros tipos de processamentos. Assim, técnicas *in vitro* podem ser utilizadas para prever a digestibilidade de uma nova variedade ou de um processamento diferente do alimento, com um menor custo.

Entretanto, apesar de boas correlações encontradas entre os métodos *in vivo* e *in vitro*, estes não consideram o nitrogênio endógeno que os organismos eliminam pelo trato digestivo e quantificam o nível de hidrólise das ligações peptídicas e não a absorção pelas células intestinais, como os métodos *in vivo*. O pH deve ser bem controlado para reproduzir as condições existentes no trato digestivo. Em métodos que quantificam a queda do valor de pH pelo rompimento das ligações peptídicas, a diminuição do pH pode interferir na atividade das enzimas proteolíticas e substâncias tamponantes, presentes na amostra, podem interferir no resultado.

CONCLUSÕES

As equações desenvolvidas pelo método do pH estático permitiram a obtenção de valores de digestibilidade *in vitro* com alto grau de correlação com os resultados de digestibilidade *in vivo* do que os métodos de queda de pH, utilizando fontes protéicas de origem animal e vegetal. Tal

fato indica a possibilidade de utilização de ensaios da digestibilidade *in vitro*, utilizando o método do pH estático, para prever a digestibilidade protéica de produtos alimentícios, desde que sejam devidamente respeitados todos os critérios adequados para o uso desse parâmetro bioquímico.

PIRES, C.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; ROSA, J.C.; CRUZ, G.A.D.R.; MENDES, F.Q.; COSTA, N.M.B. Digestibility *in vitro* and *in vivo* of the food protein: a comparative study. *Alim.Nutr.*, Araraquara, v. 17, n.1, p.13-23, jan./mar. 2006.

■ **ABSTRACT:** The objective this work was to determine the digestibility *in vivo*, to adjust equations for the determination of the digestibility *in vitro* through different methods and to verify which method developed for the digestibility *in vitro* presents larger correlation with the digestibility *in vivo*. The following protein sources were used: frog meat boneless, frog meat with bone, frog meat of mechanically separated (CMS), bovine meat, egg, casein, wheat, corn, conventional soybean, soybean with absence the Kunitz Trypsin and Lipoxigenases (soybean KTI-LOX-), soybean texturized protein (PTS) and bean. For the calculation of the digestibility *in vitro* two methods were tested, one that uses pH values obtained in 10 and 20 min after the addition of the solution of enzymes and other call

of method of the static pH, which it measures the volume of NaOH added necessary to maintain in 8,0 the value of pH of the solution of proteins after the addition of the enzymatic solution. In the method of the pH fall, the best equations were obtained when it worked with the pH values obtained after 10 min of the solution of enzymes. Of those equations, the ones that had larger values of R² were made without the casein presence. In the method of the static pH the equations that allowed better correlation among volumes of NaOH with digestibility were those in which all were used of the protein sources and that in that it was not present the casein. The use of techniques *in vitro* for the determination of the protein digestibility will bring a series of benefits, because it requests less time, to be cheaper and to need of less labor and physical space.

■ **KEYWORDS:** Protein quality; digestibility *in vitro*; digestibility *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington, DC, 1995. 1141p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Washington, DC, 1975.1094 p.
- CARDOSO, L. R. **Caracterização bromatológica e digestibilidade in vitro e in vivo de proteínas de farinhas de soja**. 2003. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.
- CARIAS, D.; CIOCCIA, A. M.; HEVIA, P. Grado de concordancia entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas *in vivo* e *in vitro* y sus efecto sobre el cómputo químico. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.42, n.2, p.111-116, 1995.
- CASSIDY, A. Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 55, p. 399-417, 1996.
- CRUZ, G. A. D. R. et al. Comparação entre a digestibilidade protéica *in vitro* e *in vivo* de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenados por 30 dias. **Alim. Nutr.**, v.16, n.3, p. 265-271, jul./set. 2005.
- CRUZ, G. A. D. R. et al. Nova metodologia de determinação da digestibilidade proteica *in vitro* de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alim. Nutr.**, v. 16, n. 1, p.57-63, jan./mar. 2005.
- FIDELIS, I.C. **Qualidade protéica e biodisponibilidade de ferro e cálcio em carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*, SHAW 1802)**. 2004. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Protein quality evaluation**. Rome, 1991. 66 p. (FAO Food and Nutrition, Paper 51).
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Protein quality evaluation: report of a joint FAO/WHO expert consultation group**. Rome, 1990. 74p.
- HERNÁNDEZ, M.; LA VEJA, A.; SOTELO, A. Determination de la digestibilidad proteínica *in vitro* e *in vivo* en cereais y leguminosas, crudos e cocidos. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 34, n. 3, p. 513-522, 1984.
- HSU, H. W. et al. Multienzyme technique for estimating protein digestibility. **J. Food Sci.**, v. 42, n. 5, p. 1269-1273, 1977.
- LIU, K. Celular biological and physicochemical basics for hard-to-cook defect in legumes seeds. **CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.35, p.263, 1995.
- LUJAN, D. L. B. **Variedades de feijão e efeitos na qualidade protéica, na glicemia e nos lipídeos sanguíneos em ratos**. 2004. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- MARQUEZ, U. M. L.; LAJOLO, F. M. Composition and digestibility of albumin, globulins and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 1211-1215, 1981.
- MAURON, J. et al. The availability of lysine, methionine and tryptophan in condensed milk and milk powder. In vitro digestion studies. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 59, p. 433-451, 1956.
- MONTEIRO, J. B. R. et al. Avaliação da qualidade protéica de dois formulados em pó, à base de soja enriquecidos com zinco, selênio e magnésio para utilização em nutrição enteral. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 24, n. 1, p. 006-010, 2004.
- PIRES, C. V. **Caracterização bromatológica e digestibilidade in vitro de proteínas de cultivares de feijão (*Phaseolus Vulgaris* L.)**. 2002. 68f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- SARWAR, G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. **J. Nutr.**, v. 127, p. 758-764, 1997.
- SATERLEE, L. D.; MARSHALL, H. F.; TENNYSON, J. M. Measuring protein quality. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, v. 56, p. 103-109, 1979.
- SAUNDERS, R. M. et al. Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. **J. Nutr.**, v. 103, p. 530-535, 1973.