

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA NA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Diretor: PROFESSOR FRANKLIN A. DE MOURA CAMPOS

VALÔR BIOLÓGICO DA PROTEINA DA CAS- TANHA DO CAJU' E DA SAPUCAIA (*)

CYRO CAMARGO NOGUEIRA

Constituintes fundamentais da ração, as proteínas frequentemente não figuram nela nas proporções devidas em virtude de seu preço elevado, justificando-se por isso pesquisas no sentido de esclarecer o valôr nutritivo de várias fontes dessa categoria de alimentos.

Introduzidas no organismo são, depois de sofrerem o ataque dos sucos digestivos, resolvidas em constituintes mais simples, os ácidos aminados, que franqueando a mucosa intestinal ganham o meio interno, para serem integrados ao organismo. É justamente na qualidade dos ácidos aminados que encerram onde reside toda a importância destas substâncias nutritivas. Realmente o organismo desconhece os meios de sintetisar muitos deles, e o faz insuficientemente em relação a outros tornando-os "indispensáveis na ração".

A molécula proteica variando extraordinariamente na sua composição poderá ser completa ou incompleta, conforme contenha ou não os 10 ácidos aminados indispensáveis de Rose (1).

Ha dois grandes grupos de métodos destinados a indagar qualidades nutritivas de proteínas — os Químicos e os Biológicos. Aqueles procuram determinar qualitativa e quantitativamente a composição das proteínas. Estes lançam mão de reativos biológicos afim de por à prova o valôr nutritivo de uma protide ou de uma mistura delas.

Pode parecer a um exame superficial que estes métodos biológicos sejam anacrônicos devendo ceder lugar aos químicos, mais completos.

Tal no entanto não sucede. A investigação química, fornecendo-nos indicações sobre a natureza e quantidade de amino-ácidos na molécula proteica, não faz mais do que determinar o limite ideal do valôr da proteína ou mistura de proteínas em estudo.

(*) Trabalho realizado com o auxílio da "The Ella Sachs Piotz Foundation".

Aliás é muito natural que isto assim seja, porque os fermentos proteolíticos nem sempre agem com igual sucesso. Ora são os enlaces firmes entre os amino-ácidos, ora é uma barreira mecânica à penetração, ora são condições individuais que podem frustrar mais ou menos intensamente as ações digestivas.

A respeito de tudo isto somente os métodos biológicos nos informam. Eles são insubstituíveis. Tem muita razão Mitchell (3), ao dizer que os métodos biológicos nos indicam até que ponto o organismo em diversas condições consegue realizar os limites ideais que os métodos químicos nos apontam.

Os métodos biológicos podem assumir vários matizes que procuraremos referir rapidamente, o que nos poupará esforço em trabalhos ulteriores, ao mesmo tempo que os divulgará em nosso meio.

Mendel e Osborne (4) foram os grandes iniciadores de um método biológico que lhes leva o nome, e que em suas mãos produziu frutos de valor incontestável.

Este método consiste em submeter os animais a dietas nas quais a única fonte proteica seja representada pelo material em estudo. Pode-se por ele acompanhar a curva de crescimento ponderal, a fertilidade, a capacidade de lactação etc. dos animais em experiência. Permite saber-se quando uma proteína é completa, e no caso de não o ser quais os amino-ácidos ausentes.

As experiências são no entanto prolongadas, dispendiosas e não nos permitem absolutamente precisar quantitativamente o valor nutritivo da substância em estudo, visto não haver controle do alimento ingerido.

A duração do período experimental foi arduamente defendida por Mc Collum e seus colaboradores (5). Segundo eles a eficiência de uma dieta deveria ser posta à prova durante um período que apanhasse pelo menos 4 a 5 por cento da vida média dos animais em experiência. Fundamentavam seu ponto de vista no fato de dietas que se mostravam satisfatórias por um tempo relativamente longo, decepcionarem a seguir evidenciando deficiências. Isto explica porque em certos casos tenham prolongado experiências até à 4.^a geração de animais.

Hoje no entanto, estamos em condições de defender períodos curtos de experiência para investigações do valor de proteínas, e de interpretar os argumentos da escola de Mc Collum.

Como diz Mitchell (6) as deficiências apresentadas pelos animais sob regime longo, corriam por conta da falta na ração em estudo de alimentos que ficavam em reserva, manifestando-se os desvios quando estas se esgotavam. Realmente nestas experiências de longa duração só poderemos responsabilizar as proteínas pelos deficits que se venham a manifestar no caso de termos certeza absoluta de que todos os demais elementos entraram em quantidades suficientes na ração. Esta certeza só poderemos adquirir desde que trabalhemos com um lote de animais sob a mesma ração em estudo dife-

rindo apenas pela qualidade de proteína que deve ser ótima. Se esta última ração se mostrar eficaz então poderemos responsabilizar a proteína da primeira ração, depois de verificar se os animais em experiência a consumiram convenientemente.

Esta falta de controle do alimento ingerido é uma outra falha do método de Mendel e Osborne.

Resumindo devemos dizer que o método em questão serve apenas para nos fornecer resultados de ordem qualitativa, tendo o defeito de exigir um tempo longo de experimentação com dispêndio de dinheiro. Não podemos no entanto desprezá-lo, pois o próprio Mitchell é o primeiro a afirmar que um dado método não deve ser criticado simplesmente à luz das objeções teóricas que se possam levantar contra ele, e sim diante dos resultados práticos que fornece. E sob este aspecto é inegável que o método de Mendel e Osborne deu tudo o que dele se poderia lícitamente exigir.

Sem dúvida os próprios criadores do processo sentiram suas deficiências quando pretenderam obter resultados quantitativos. Tanto foi assim que eles mesmos juntamente com Ferry idealizaram um novo processo conhecido pelo nome de Método Numérico de Mendel, Osborne e Ferry (7). Neste caso, o valor nutritivo é expresso pela relação entre o ganho de peso e a quantidade de proteína ingerida.

O valor nutritivo será tanto maior quanto maior o ganho em peso que uma grama de proteína garantir.

Como vemos já aqui se tem que controlar o alimento ingerido o que representa sem dúvida um progresso.

Este dado é de muito valor porque uma série de circunstâncias impalpáveis, como sejam — o odor, o sabor, o tato, das rações, não as fazem exatamente comparáveis de sorte que o animal as ingerirá em quantidades maiores ou menores que podem afetar o resultado geral como se depreende do seguinte exemplo citado por Mitchell (6) e tomado de Mendel e Osborne (8), e como nós mesmos comprovamos em trabalho em publicação sobre a sapucaia (2).

Foi feito um estudo comparativo entre a cevada, centeio, aveia e trigo que entravam nas rações de modo a totalizarem 8% em proteínas. Os resultados foram os seguintes após 4 semanas: 7 ratos que receberam a aveia o ganho médio de peso foi de 27 grs.; em relação ao centeio o aumento médio de peso em 8 ratos foi de 36 grs.; finalmente com o trigo o ganho médio foi de 30 grs. para 7 ratos.

Estes resultados parecem evidenciar que a proteína da cevada é nitidamente superior às demais. Neste caso contudo o consumo tinha sido anotado, e verificou-se que a maior média de ganho proporcionada pela cevada, resultou somente de um maior consumo que os ratos fizeram da dieta.

Por aí se vê que o aperfeiçoamento técnico introduzido por este método é valioso.

Apesar disso o método de Mendel, Osborne e Ferry é passível de crítica.

A primeira objeção que se lhe pode fazer é a seguinte. o método pretende expressar numericamente o valor de uma proteína ao promover o crescimento. No entanto, a proteína que o animal ingere vai apenas em parte exercer ação sobre o crescimento, visto que em parte vai ser empregada na manutenção.

Boas-Fixen (9) pretendem obviar este inconveniente, subtraindo da proteína consumida uma quantidade que atribuem à manutenção, e que consideram de 10 grs., por semana e por rato. Embora seja um meio de correção convenhamos que nem todo animal se comporta da mesma maneira.

Há um outro fator que diminui o valor científico deste método; a quantidade de alimento ingerido, por si só não nos pode indicar a quantidade absorvida. Assim sendo, 2 animais podem estar ingerindo a mesma quantidade de proteínas, mas na realidade um deles pode estar absorvendo mais, bastando para isso que a proteína que ingira seja mais facilmente digerida.

Sente-se, pois, que o método de Mendel, Osborne e Ferrý representa um grande avanço sobre o primitivo, mas verifica-se que ele pode ser substituído por métodos mais rigorosos que penetrem mais a fundo no metabolismo proteico.

Foi desta última categoria o processo que empregamos no presente trabalho. Utilizamos-nos do método de Mitchell (10) que por sua vez resultou de uma modificação do método que Karl Thomas, em 1909, propusera para a determinação do "Valor Biológico" de proteínas para o homem. Em 1924, Mitchell adaptou-o a animais de laboratório. Trata-se como veremos de um processo trabalhoso, porém a precisão dos resultados que fornece é um conforto e um incentivo para o pesquisador que não aprecia ver saltarem-lhe aos olhos no decorrer da experiência todos os defeitos do método que maneja.

Nossos estudos atuais completam os já publicados em parte por Moura Campos (11) a respeito da proteína da castanha do cajú.

No correr da descrição da experiência iremos comentando o processo usado.

Lançamos mão de 2 ratos em crescimento, para a determinação do valor biológico da castanha do cajú conforme trabalho publicado (14) e de 4 também em crescimento na investigação com a sapucaia.

Mitchell (3) define o "valor biológico" de uma proteína como a percentagem de nitrogênio retido sobre o total de nitrogênio absorvido pelo animal.

Como se vê pela definição, um primeiro cuidado consiste na determinação de nitrogênio absorvido o que se consegue, subtraindo do nitrogênio ingerido por dia o nitrogênio fecal, menos o nitrogênio metabólico das fezes.

O nitrogênio fecal metabólico é o que o animal elimina com as fezes e que provém de seu próprio organismo. Para se o determinar,

fica o animal submetido a uma dieta aprroteica, em gaiola isolada como a que se vê na figura n.º 1.

Nossos ratos permaneceram em gaiolas desse tipo, e submetidos à dieta aprroteica seguinte:

Amido	75	grs.
Manteiga	10	"
Sacarose	8	"
Mistura de sais	4	"
Papel de filtro	3	"
Extrato de levedo	2	c.c.

O papel de filtro deve ser ralado, e a dieta uma vez preparada será passada em peneira fina, e posta na estufa a 45°C. por cerca de 80 horas.

O extrato de levedo obtinhamos colocando em 18 c.c. de álcool absoluto 2 grs. de levedo Silva Araujo e agitando por meia hora.

Uma vez saída da estufa a dieta é colocada em frascos fechados, uma para cada rato, e pesada.

Para evitar grandes desperdícios de ração, faz-se com ela uma "papa" em água destilada na vasilha em que o animal a recebe. Dá-se também a ele água destilada, conservando-se a gaiola em ambiente protegido contra moscas, baratas, etc.

O período aprroteico se prolongou por 11 dias, dos quais 3 foram considerados de transição, como recomenda o método.

Nesses 3 primeiros dias não há necessidade de colheita de fezes.

Durante os 8 dias de experiência as fezes são colhidas, bem como os restos de ração conservados cuidadosamente.

Afim de se evitar que as fezes se enxarquem com urina, colocam-se na placa de Petri grande, dentro da qual repousa a gaiola, 2 folhas de papel de filtro.

Essa colheita deve ser feita diariamente sendo as fezes conservadas em solução alcoólica de timol a 10%.

Terminados os 8 dias de experiência, os restos de ração vão para a estufa a 45°C. por cerca de 80 horas, sendo então pesados.

Vamos agora calcular o consumo de alimento por dia para cada animal.

Pelo método de Kjeldahl dosa-se o N² total da ração aprroteica. Em nossa dieta encontramos 0,401 grs. %.

Faz-se em seguida pelo mesmo processo a determinação do N² total nas fezes eliminadas durante os dias de experiência, e tamam-se partes alíquotas para a destilação evitando-se assim o perigo de perda que comprometeria a experiência toda.

Na tabela n.º 1 figuram os resultados.

TABELA N.º 1

DADOS	Castanha de Cajú		Sapucaia			
	Rato 1413	Rato 1414	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4
	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.
Fase Aprroteica						
Peso inicial	119,300	108,000	204,000	126,500	132,500	184,500
Peso final	105,200	96,700	194,000	119,000	132,500	174,000
N ² metabólico fecal	0,004	0,008	0,013	0,022	0,029	0,023
N ² metabólico urinário ..	0,016	0,017	0,022	0,037	0,017	0,016
Fase Proteica						
N ² alimentar nas fezes ..	0,010	0,008	0,002	0,010	0,020	0,008
N ² absorvdo	0,143	0,111	0,101	0,060	0,048	0,072
N ² na urina em excesso sôbre o metabólico ...	0,034	0,024	0,012	0,023	0,012	0,014
N ² fixado	0,109	0,087	0,089	0,037	0,036	0,058
Valôr Biológico Médio ..	77,2		76,6			
Digestibilidade Média ..	93,3		83,7			

Os animais passaram então ao periodo proteico durante o qual receberam as seguintes rações proaeicas, com cerca de 8% das respectivas proteínas:

Castanha de cajú	40 grs.
Sapucaia	40 "
Amido	43 "
Manteiga	10 "
Mistura de sais	4 "
Papel de filtro	3 "
Extrato de levedo	2 c.c.

Os cuidados com esta ração são os mesmos assinalados em relação à aprroteica.

Decorridos os 3 dias de transição, as fezes passaram a ser colhidas com os mesmos cuidados, e os restos de ração a ser conservados, durante 8 dias.

Os dados colhidos pela análise figuram na tabela n.º 1.

Vamos exemplificar um cm cálculo.

O consumo diário médio de azoto pelo rato 1413 foi de 0,153 grs. e do rato 1414 0,119.

Encontramos nas fezes do rato 1413 0,014 grs. de azoto por dia em média, e 0,016 para o rato 1414.

A taxa de azoto expelida pelo rato 1413 acima do metabólico fecal foi pois $0,014 - 0,004 = 0,010$ e pelo rato 1414 foi $0,016 - 0,008 = 0,008$.

Podemos pois concluir que o animal 1413 absorveu $0,153 - 0,010 = 0,143$ grs. de azoto por dia e o rato 1414: $0,119 - 0,008 = 0,111$ grs.

Vencemos pois a primeira etapa para a determinação do valor biológico, achamos quanto de azoto os animais absorveram.

Temos tambem em mãos os meios de calcular o coeficiente de digestibilidade da proteina, que vem a ser a percentagem do azoto absorvido sobre o ingerido.

Para o animal 1413:

$$\frac{0,143 \times 100}{0,159} = 93,4$$

e para o animal 1414:

$$\frac{0,111 \times 100}{0,119} = 93,2$$

Resultados bem próximos do obtido por Mitchell (3) que foi 96.

Necessitamos agora saber quanto de azoto o rato fixou e para tanto precisamos conhecer o azoto metabólico urinário, e quanto acima dele os animais eliminaram sob regime proteico.

Evidentemente colheremos esses dados analisando a urina dos animais em cada um dos 2 períodos.

Como vimos, a urina dos animais fica retida nas folhas de papel de filtro.

Extraimo-la daí diariamente lavando repetidamente a placa de Petri com cerca de 250 c.c. de água destilada, acidulada com 15 c.c. de ácido sulfúrico. O líquido de lavagem é filtrado em algodão de vidro para um balão volumétrico de 250 c.c. Terminada a operação ele será levado à geladeira. No dia seguinte completa-se o volume para 250 c.c., e lança-se o líquido em um frasco de 2 litros, adicionando-se umas pedras de timol. Fica assim livre o balão volumétrico para receber nova urina que irá por sua vez para o mesmo frasco de 2 litros.

Poder-se-iam fazer tres objeções contra esta técnica:

- 1.º) Durante 24 horas de espera pode haver fermentação na urina e perda de azoto;
- 2.º) O papel de filtro retem a urina, sendo as lavagens insuficientes para removê-la completamente;
- 3.º) O papel de filtro contem azoto.

Experiências realizadas por Mitchell (12) ao expor o método, em artigos cuja leitura recomendamos aos que desejem investigar neste sentido, demonstraram que o erro assim introduzido era relativamente pequeno.

Por nossa parte estamos construindo um dispositivo, a ser publicado em trabalho futuro, que afastará este inconveniente, e, dando bons resultados, simplificará bastante o trabalho.

Dosado o azoto urinário para o rato 1413 encontramos durante o período aprotéico 0,016 gr. e durante o período protéico 0,050 gr.

em média por dia. Para o animal 1414 os resultados foram 0,017 e 0,041 gr. respectivamente para o período aprotéico e protéico.

Portanto o rato 1413 eliminou acima do azoto metabólico na urina u'a média diária de $0,050 - 0,016 = 0,034$ grs. de azoto, e o rato 1414, $0,041 - 0,017 = 0,024$.

Podemos agora concluir que o rato 1413 fixou $0,143 - 0,034 = 0,109$ gr. de azoto e o rato 1414, $0,111 - 0,024 = 0,087$ gr. fixado sobre o azoto absorvido logo, para o rato 1413:

$$V. B. = \frac{0,109 \times 100}{0,143} = 76,2 \text{ aproximadamente, e para o rato}$$

1414:

$$V.B. = \frac{0,087 \times 100}{0,111} = 78,3$$

CONCLUSÕES

1. O valôr biológico da generalidade das castanhas — oscila em torno de 60.

2. Obtivemos para a castanha do cajú um resultado bem alto, de 77,2, muito próximo do obtido por Mitchell (3), e que revela a bôa qualidade da proteína.

3. A proteína da sapucaia, igualmente, acusou valôr elevado, 76,6, porem menor digestibilidade. Como no entanto o número de animais foi pequeno, e os resultados tiveram dispersão grande, é prudente que se repitam experiências, antes de qualquer conclusão apressada.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ROSE, W. C. — *Physiol. Reviews*, 1938, **18**, p. 130.
- 2 — CAMARGO NOGUEIRA, C. — Contribuição ao estudo do valor nutritivo da amendoa de sapucaia — (Em publicação no Livro em Homenagem ao Jubileu Professoral do Prof. Cantidio de Moura Campos).
- 3 — MITCHELL, H. — The biological value of the proteins and a criticism of the methods of its determination — *Reale Academia D'Italia, Roma*, 1937, **15**, p. 5.
- 4 — OSBORNE, T. B. e MENDEL, L. B. — A quantitative comparison of casein, lactalbumin and edestrin for growth or maintenance — *Jour. Biol. Chem.*, 1916, **26**, p. 1.
- 5 — Mc COLLUM, E. V., SIMMONDS, N. e PARSONS, H. T. — *Jour. Biol. Chem.*, 1921, **47**, ps. 11, 139, 175, 207, 235.
- 6 — MITCHELL, H. e HAMILTON, T. S. — The biochemistry of the amino acids — *American Chemical Society*, 1929, p. 509.

- 7 — OSBORNE, T. B., MENDEL, L. B. e FERRY, E. L. — A method of expressing numerically the growth promoting value of proteins — Jour. Biol. Chem., 1919, 37, p. 223.
- 8 — OSBORNE, T. B. e MENDEL, L. B. — Jour. Biol. Chem., 1920, 41, p. 275.
- 9 — BOAS-FIXEN, M. A., HUTCHINSON, J. C. D. e JACKSON, H. M. — The biological values of proteins etc. — Bioch. Jour., 1934, 28, 592.
- 10 — MITCHELL, H. — A method of determining the biological value of protein — Jour. Biol. Chem., 1924, 58, p. 873.
- 11 — MOURA CAMPOS, F. A. — Valor nutritivo da proteína da castanha do cajú — Rev. Méd. Brasileira, 1941, 10, n.º 1, p. 121.
- 12 — MITCHELL, H. — A method of determining the biological value of protein — Jour. Biol. Chem., 1924, 58, p. 873.
- 13 — MOURA CAMPOS, F. A. e PAULA SANTOS, O. — Amendoim e crescimento — Rev. Biol. Higiene, 1940, 10, n.º 2, p. 105.
- 14 — CAMARGO NOGUEIRA, C. — Valor biológico da proteína da castanha do cajú — O Hospital, 1941, 20, n.º 1, p. 45.

Dr.

Mozart Tavares de Lima Filho

Diretor Clínico do Sanatório Ebenezer

TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

•

Vila Capivari

Campos de Jordão

Gengivas doentes?

"PYORRHON"

**Dá saúde ás gengivas, porque é remédio e...
é dentifricio**

INSTITUTO DE FISIOTERAPIA VITOFLEX

O MAIS MODERNO DE SÃO PAULO

Diretor clinico:

Dr. Manoel I. Romeiro

DIRETOR TECNICO

Dr. Albert Kestenberg

da Faculdade de Medicina de Paris

BANHO INTESTINAL ASPIRATIVO
CORRENTE ANALGESICA DE BAIXA
FREQUENCIA

ONDAS CURTAS — DIATERMIA
FEBRE ARTIFICIAL — RAIOS ULTRA-VIOLETAS
RAIOS INFRA-VERMELHOS
CORRENTE GALVAN. E FARAD. — IONISAÇÃO

TELEFONE 4 - 7286

TRATAMENTOS
Das 8 ás 19 horas

RUA XAVIER DE TOLEDO, 98 — 4.º andar
SÃO PAULO

ORIENTAÇÕES PARA O USO

Esta é uma cópia digital de um documento (ou parte dele) que pertence a um dos acervos que fazem parte da Biblioteca Digital de Obras Raras e Especiais da USP. Trata-se de uma referência a um documento original. Neste sentido, procuramos manter a integridade e a autenticidade da fonte, não realizando alterações no ambiente digital – com exceção de ajustes de cor, contraste e definição.

1. Você apenas deve utilizar esta obra para fins não comerciais. Os livros, textos e imagens que publicamos na Biblioteca Digital de Obras Raras e Especiais da USP são de domínio público, no entanto, é proibido o uso comercial das nossas imagens.

2. Atribuição. Quando utilizar este documento em outro contexto, você deve dar crédito ao autor (ou autores), à Biblioteca Digital de Obras Raras e Especiais da USP e ao acervo original, da forma como aparece na ficha catalográfica (metadados) do repositório digital. Pedimos que você não republique este conteúdo na rede mundial de computadores (internet) sem a nossa expressa autorização.

3. Direitos do autor. No Brasil, os direitos do autor são regulados pela Lei n.º 9.610, de 19 de Fevereiro de 1998. Os direitos do autor estão também respaldados na Convenção de Berna, de 1971. Sabemos das dificuldades existentes para a verificação se uma obra realmente encontra-se em domínio público. Neste sentido, se você acreditar que algum documento publicado na Biblioteca Digital de Obras Raras e Especiais da USP esteja violando direitos autorais de tradução, versão, exibição, reprodução ou quaisquer outros, solicitamos que nos informe imediatamente (dtsibi@usp.br).