

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DOS ALIMENTOS**

**EFEITO NUTRICIONAL DA FORTIFICAÇÃO  
PROTÉICO-ENERGÉTICA DA ALIMENTAÇÃO  
ESCOLAR DE CRIANÇAS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Ivo Roberto Dorneles Prola**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**EFEITO NUTRICIONAL DA FORTIFICAÇÃO PROTÉICO-  
ENERGÉTICA DA ALIMENTAÇÃO ESCOLAR DE  
CRIANÇAS**

**Ivo Roberto Dorneles Prola**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado  
do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos,  
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**Orientador: Profa. Dra. Leila Picolli da Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Prola, Ivo Roberto Dorneles  
Efeito nutricional da fortificação protéico-energética da alimentação escolar de crianças / Ivo Roberto Dorneles Prola.-2013.

93 p.; 30cm

Orientador: Leila Picolli da Silva  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, RS, 2013

1. Alimentação escolar 2. Equilíbrio protéico-energético 3. Proteína ideal 4. Escore de aminoácidos I. Silva, Leila Picolli da II. Título.

---

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Ivo Roberto Dorneles Prola. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua General Neto, n. 1241/902, Bairro Nossa Senhora de Lourdes, Santa Maria, RS, 97050-241

Fone (55) 30281710; Fax (55) 30255697; End. Eletr: [iprolla@gmail.com](mailto:iprolla@gmail.com)

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**EFEITO NUTRICIONAL DA FORTIFICAÇÃO PROTÉICO-  
ENERGÉTICA DA ALIMENTAÇÃO ESCOLAR DE CRIANÇAS**

elaborada por  
**Ivo Roberto Dorneles Prola**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Leila Picolli da Silva, Dra.**  
(Presidente/Orientador)

**Sandra Maria Gonçalves Vieira, Dra. (UFRGS)**

**Léris Salete Bonfanti Haeffner, Dra. (UFSM)**

**Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)**

**Jaime Amaya Farfan, Dr. (UNICAMP)**

**Santa Maria, 25 de fevereiro de 2013.**

## DEDICATÓRIA

**À minha mãe Idalina**, que lutando contra as adversidades do destino criou-me, educou-me e me possibilitou ter um destino diferente do seu.

**Aos meus irmãos Gladstone, Jorge, Carmem e Fernando** que sempre me cuidaram, apoiaram e valorizaram minha vida profissional.

**À minha esposa Alba e à minha filha Luíza**, que tiveram paciência e resignação nos momentos em que não estive presente ou disponível como marido e pai.

Tenham certeza que vocês fizeram parte, de uma forma ou de outra, desta obra.

Muito obrigado!

Amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha mãe e aos meus irmãos por terem me oportunizado viver, crescer, estudar e me tornar o que sou. Ao meu falecido pai, que apesar de não termos nos conhecido, certamente colaborou e influenciou no que penso e faço.

Ao Dr. Prado Veppo, meu sogro, que me tomou como filho. Apesar de termos convivido tão pouco nossa convivência foi intensa e marcante. À Zelinha e ao Pity, pelo acolhimento, carinho, apoio e estímulo para “sempre continuar”.

Gostaria de agradecer à Clarissa Farencena Arruda, Luciane Moura Rampanelli, Mariana Mello da Silva pelo auxílio inestimável na coleta de dados na Escola. Agradeço, também, à Bruna Roberto e Bruna Alves pelo auxílio no desenvolvimento dos alimentos experimentais e pelas análises de laboratório.

Ao Dr. Paul Bernard Pencharz, meu co-orientador estrangeiro, que mesmo após ter se aposentado de suas atividades acreditou na minha pesquisa e permitiu que eu desenvolvesse parte dela em seu laboratório, sob sua supervisão e patrocínio. Seus ensinamentos foram valiosos e serão eternos. Muito obrigado. Agradeço, também, à Mahroukh Raffi, sua técnica de laboratório, e à Glenda Courtney-Martin, nutricionista da equipe, que incansavelmente me auxiliaram durante todo meu experimento em Toronto, e que acabaram por se tornar grandes amigas.

Gostaria de agradecer às professoras da Escola Estadual de Ensino Fundamental Celina de Moraes, que colaboraram de forma incansável para que esta pesquisa pudesse ser realizada nas suas dependências. À Sônia, merendeira da Escola, que pacientemente abriu as portas de sua cozinha para “todo” o nosso grupo.

Agradeço enormemente aos professores orientadores do PPGCTA que, mesmo sem fazer parte do “público-alvo” do programa, permitiram-me ingressar e realizar esta pesquisa. Com ela espero ter podido colaborar para enaltecer o conceito já existente.

À Lia, secretária do PPGCTA, pela atenção com que eu era tratado sempre que necessitei.

Aos membros da banca, Profª. Dra. Tatiana Emanuelli, Profª. Dra. Sandra Maria Gonçalves Vieira, Profª. Dra. Lérís Salete Bonfanti Haeffner e Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan, por terem aceitado participar de minha defesa de doutorado e que pacientemente avaliaram cada item de minha pesquisa. Suas observações certamente delinearão outros aspectos de

minha pesquisa aos quais tentarei seguir. Tenham certeza que suas observações para enriquecê-la serão de grande valia.

À minha orientadora, Profa. Dra. Leila Picolli da Silva, que durante meu mestrado, além de me auxiliar enormemente, plantou em mim o interesse especial por uma linha de pesquisa que hoje se concretiza: o estudo e a aplicação da alimentação alternativa como estratégia para melhorar a alimentação infantil. Espero que com este trabalho, onde análises laboratoriais e aplicação prática dos resultados foram possíveis, tenhamos dado o primeiro passo para uma série de outros estudos semelhantes. Aprendemos muito com ele e vimos que tuas idéias sobre o uso da alimentação alternativa a partir de co-produtos de qualidade são possíveis e podem vislumbrar um futuro melhor para a alimentação de crianças carentes. A ti deixo meu agradecimento especial.

Gostaria de agradecer de forma muito carinhosa à minha esposa Alba e à minha filha Luíza pelo apoio, estímulo e, principalmente, compreensão. Nestes últimos anos vocês tiveram de aprender a conviver com uma intrusa em nosso lar: minha ausência. Foi um tempo difícil para mim, pois tentava administrar, da melhor maneira possível, tantas atividades simultaneamente: o magistério superior, o consultório privado e o doutorado. Procurei não descuidar de meus papéis de marido e de pai. Mas agora, finalmente este período termina, como uma longa gestação. E a tese se concretiza no todo, como um filho que nasce e que dará início a uma nova fase em nossas vidas.

Por fim, quero agradecer àqueles que por quase dois anos fizeram parte de minha vida: os queridos alunos que participaram do estudo. Eles que, ao final da pesquisa, me presentearam com cartão e poesia de agradecimento por eu ter estado lá, na sua Escola. Na verdade, o agradecimento é meu, pela oportunidade do convívio com vocês e pela paciência para comigo e com meu grupo. Saibam que vocês fizeram parte da minha história profissional e também pessoal. E que sem vocês este estudo nunca teria sido possível.

A todos, muito obrigado.

## **CONSELHO**

Quando te decidires: segue!

Não esperes que o vento

Cubra de flores o caminho.

Nem sequer esperes o caminho.

Cria-o. Faze-o tu mesmo

E parte... Sem lembrar

Que outros passos pararam,

Que outros olhos ficaram te olhando seguir.

(Prado Veppo)



## **RESUMO**

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EFEITO NUTRICIONAL DA FORTIFICAÇÃO PROTÉICO-ENERGÉTICA DA ALIMENTAÇÃO ESCOLAR DE CRIANÇAS**

AUTOR: IVO ROBERTO DORNELES PROLA

ORIENTADOR: LEILA PICOLLI DA SILVA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de fevereiro de 2013.

No Brasil, assim com em muitos Países em desenvolvimento, a fome e a desnutrição afetam uma grande parcela da população. Nas crianças, essa situação pode determinar seqüelas importantes para o resto de suas vidas, tanto sob o ponto de vista orgânico quanto intelectual. Mas como garantir uma alimentação adequada em um cenário mundial onde um sexto da humanidade ainda não consegue se alimentar de forma digna? Dentre os Programas Governamentais Brasileiros atualmente existentes, o Programa Nacional de Alimentação Escolar – PNAE destaca-se pela abrangência das faixas etárias mais vulneráveis e por aliar o combate à fome e à evasão escolar. Devido aos recursos financeiros disponibilizados, a inclusão de alimentos alternativos de baixo custo tem sido promovida como estratégia promissora. No entanto, a real avaliação do poder nutricional destes alimentos ainda carece de investigações. Assim, pesquisas que avaliam a inclusão de alimentação alternativa no PNAE devem considerar não só o aspecto econômico e de aceitação sensorial pelas populações alvo, mas os aspectos nutricionais intrínsecos dos alimentos utilizados. Neste contexto, além do perfil calórico e de macronutrientes, a importância do escore aminoacídico presente no alimento ofertado tem recebido destaque na literatura mundial, principalmente na faixa etária pediátrica. Neste estudo, dois co-produtos agroindustriais de baixo custo, concentrado protéico de soja e quirera de arroz, foram utilizados na formulação de um "mix" altamente protéico e com balanço aminoacídico adequado aos requerimentos nutricionais infantis. Este "mix" foi utilizado em preparações alimentares, "bolinhos doces", de diferentes sabores com grande aprovação pelo grupo de crianças em estudo. Os alimentos experimentais foram suplementados à alimentação escolar determinando alterações significativas na composição corporal das crianças estudadas: aumento da massa magra e redução da massa gorda, principalmente entre as crianças com desvios nutricionais. Além disto, este estudo demonstrou que, mesmo sendo considerado o aminoácido limitante, a lisina presente no arroz cozido apresenta elevada disponibilidade metabólica. Esta constatação só foi possível através da técnica do indicador de oxidação de aminoácidos, até então utilizada na avaliação de biodisponibilidade aminoacídica de fontes protéicas isoladas.

**Palavras-chave:** Alimentação escolar. Alimentação alternativa. Escore de aminoácidos.

## **ABSTRACT**

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Universidade Federal de Santa Maria

### **NUTRITIONAL EFFECT OF THE PROTEIN-ENERGY FORTIFICATION OF CHILDREN'S SCHOOL MEAL**

**AUTHOR: IVO ROBERTO DORNELES PROLA**

**ADVISER: LEILA PICOLLI DA SILVA**

**Date and Place of the defense: Santa Maria, 25th, 2013.**

In Brazil, as well as in many developing countries, hunger and malnutrition affect a large portion of population. In children, this situation can determine important consequences for the rest of their lives, from both organic and intellectual point of view. But how to ensure adequate food in a world scenario where a sixth of humanity still can not feed themselves in dignity? Among Brazilian Governmental Programs currently in existence, the Brazilian National School Feeding Program - BNSFP stands out for its coverage of the most vulnerable age groups and by combining the fight against both hunger and school drop-out. Due to low financial resources, inclusion of low-cost alternative food has been promoted as a promising strategy. However, the real assessment of the nutritional power of these foods still requires further investigation. Thus, researches that evaluate the inclusion of alternative food supply by the BNSFP should consider not only the economic aspect and acceptance by aimed populations, but the intrinsic nutritional value of the food used. In this context, besides the macronutrient and energy profile, the importance of the amino acid score in the food provided has received prominence in world literature, especially in pediatric patients. In this study, two low cost agro industrial by-products, soybean protein concentrate and broken rice, were used in the formulation of a "mix" with high protein content and amino acid balance appropriate to the high nutritional requirements of growing children. This "mix" was used in food preparations, "Sweet Cookies", of different flavors with great approval by the group of children studied. The experimental foods were added to the school feeding determining significant changes in body composition of participating children: increments in lean mass and decrease in fat mass, especially among children with nutritional problems. Furthermore, this study demonstrated that even being considered the limiting amino acid, lysine present in cooked rice has a high metabolic availability. This finding was made possible by the indicator of amino acid oxidation technique, which had already been previously used for this purpose, but only in the assessment of amino acids of isolated protein sources.

**Keywords:** School feeding. Alternative food. Amino acid score.

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	87
APÊNDICE 2 – Valor em reais dos alimentos experimentais aprovados pelo grupo de crianças.....	90
APÊNDICE 3 – Ganho médio mensal de peso e estatura conforme a faixa etária e o sexo.....	90
APÊNDICE 4 – Efeitos nutricionais – todas as crianças.....	91
APÊNDICE 5 – Efeitos nutricionais conforme o sexo.....	91
APÊNDICE 6 – Efeitos nutricionais conforme o estado nutricional .....	92
APÊNDICE 7 – Biodisponibilidade metabólica do arroz branco cozido em relação à curva de referência.....	93
APÊNDICE 8 – Biodisponibilidade metabólica do arroz branco tostado em relação ao arroz branco cozido.....	93

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. RESULTADOS CIENTÍFICOS</b> .....	20
<b>2.1. Estudo 1 – Título: Estado nutricional de alunos de uma escola pública e perfil das dietas ingeridas em seus domicílios e na Escola – Estudo piloto</b> .....	20
2.1.1. Introdução.....	20
2.1.2. Justificativa.....	21
2.1.3. Objetivos específicos .....	21
2.1.3. Material e métodos .....	22
2.1.4. Resultados .....	25
2.1.5. Conclusões.....	29
2.1.6. Referências bibliográficas .....	31
<b>2.2. Estudo 2- Título: The use of agro industrial by-products and the ideal protein concept in the formulation of foods for children</b> .....	32
2.2.1. Abstract .....	32
2.2.2. Introdução .....	33
2.2.3. Material e métodos .....	34
2.2.4. Resultados e discussão .....	37
2.2.5. Conclusão .....	39
2.2.6. Figura e tabelas .....	40
2.2.7. Referências bibliográficas .....	43
<b>2.3. Estudo 3 – Título: Nutritional effects of foods made with agro industrial by-products and containing adequate amino acid score on fat mass and fat-free mass of children</b> .....	45
2.3.1. Abstract .....	45
2.3.2. Introdução .....	46
2.3.3. Material e métodos .....	47
2.3.4. Resultados e discussão .....	51
2.3.5. Conclusão .....	55
2.3.6. Tabelas .....	55
2.3.7. Referências bibliográficas .....	58
<b>2.4. Estudo 4 – Título: Lysine from cooked white rice consumed by healthy young men is highly metabolically available when assessed using the indicator amino acid oxidation technique</b> .....	61
2.4.1. Abstract .....	62
2.4.2. Introdução .....	63
2.4.3. Material e métodos .....	64
2.4.4. Resultados .....	68
2.4.5. Discussão .....	68
2.4.6. Conclusão .....	71
2.4.7. Tabelas .....	72
2.4.8. Referências bibliográficas .....	74
<b>3. DISCUSSÃO</b> .....	78
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	81
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b> .....	82
<b>6. APÊNDICES</b> .....	87

## **APRESENTAÇÃO**

Em INTRODUÇÃO são abordados os diferentes tópicos relacionados à temática desta tese que originaram os questionamentos e os objetivos desta pesquisa como um todo.

Os resultados que fazem parte desta tese são apresentados no item RESULTADOS CIENTÍFICOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios artigos.

Os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÃO, dispostos após os artigos, contêm interpretações e comentários gerais referentes aos artigos científicos contidos neste estudo.

Nos APÊNDICES é apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado, bem como os resultados de dois inquéritos iniciais que fundamentaram e nortearam o planejamento do restante da pesquisa. Além destes, é apresentada uma tabela com valores de referência para incrementos de peso e estatura de crianças conforme o sexo e a idade.

No item BIBLIOGRAFIA constam as citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e DISCUSSÃO desta tese.

## 1. INTRODUÇÃO

A definição clássica de Segurança Alimentar determina que haja “uma situação na qual todas as pessoas, durante todo o tempo, possuam acesso físico, social e econômico à alimentação suficiente, segura e nutritiva, que atenda a suas necessidades dietéticas e preferências alimentares para uma vida ativa e saudável.” (FAO, 2003). Porém, quando as famílias não apresentam disponibilidade de alimentos, acesso ou utilização adequada, elas encontram-se em Insegurança Alimentar - IA. (WEBB et al, 2006). Inicialmente existem ansiedade e preocupação quanto à disponibilidade de alimentos. Após, os adultos passam a limitar a quantidade e qualidade dos alimentos consumidos. Posteriormente, no nível mais elevado, as crianças passam a sofrer restrições. (MELGAR-QUIÑONEZ et al, 2003). Estima-se que existam 816 milhões de pessoas no mundo em situação de IA. (BELIK, 2003).

Segundo a classificação e as definições adotadas pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) em sua Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios – PNAD (IBGE, 2009), a IA pode ser leve, moderada ou grave. IA leve ocorre quando há “preocupação ou incerteza quanto ao acesso aos alimentos no futuro, ou inadequação da qualidade dos alimentos resultante de estratégias que visam não comprometer a sua quantidade”; IA moderada, quando há “redução quantitativa e/ou ruptura nos padrões de alimentação resultante da falta de alimentos entre os adultos”; e IA grave, quando há “redução quantitativa de alimentos e/ou ruptura nos padrões de alimentação resultante da falta de alimentos entre as crianças, e/ou presença de fome (quando alguém fica o dia inteiro sem comer por falta de dinheiro para comprar alimentos)”.

Em nosso País, a PNAD demonstrou que somos 65,6 milhões de pessoas em situação de IA leve (20,9%), moderada (7,4%) ou grave (5,8%). (IBGE, 2009).

É sabido que indivíduos em crescimento são mais susceptíveis aos efeitos deletérios da privação nutricional. No Brasil, a PNAD observou que a prevalência de IA era maior nos domicílios em que residiam crianças e adolescentes menores de 18 anos, onde 8,3% da população com idades entre 5 e 17 anos encontravam-se em IA grave. Na região nordeste, 41,7% da população vivia em IA, ou seja, conviveram com a fome, “em quase todo dia”, “em alguns dias” ou “em um ou dois dias”, nos 90 dias anteriores à realização da entrevista. (IBGE, 2009).

Paradoxalmente, no período entre 1988 e 2010, o Brasil apresentou uma notável redução das prevalências de desnutrição infantil. Pelo contrário, foi observada elevação na prevalência de distúrbios nutricionais originados pela alimentação excessiva, principalmente entre os adolescentes. Porém, a IA também pode determinar distúrbios nutricionais como a obesidade. (KAC et al, 2012). Vale destacar, ainda, que as populações mais vulneráveis em relação à desnutrição infantil são as mesmas que apresentam o maior risco de excesso de peso e obesidade tanto na adolescência quanto na fase adulta, particularmente entre as mulheres. Em 2009, 43,8% das mulheres e 16,5% das adolescentes pertencentes a famílias que recebiam o Bolsa Família apresentavam excesso de peso, chegando a 14,9% e 3,7%, respectivamente, as prevalências de obesidade. (CONSEA, 2010). Entretanto, os dados analisados basearam-se exclusivamente em medidas de peso e estatura, não considerando as situações de IA a que muitos indivíduos estão submetidos. Isto porque “situações de Insegurança Alimentar e Nutricional podem ser detectadas a partir de diferentes tipos de problemas como fome, obesidade, doenças associadas à má alimentação e consumo de alimentos de qualidade duvidosa ou prejudicial à saúde.” (CONSEA, 2011).

As relações existentes entre desnutrição, fracasso escolar e repetência já estão bem estabelecidas há longa data. Um estudo realizado na cidade de Belo Horizonte pode definir alguns fatores de risco para a repetência escolar. Dentre eles, um índice altura/idade/sexo inferior ao percentil 10,1. Ou seja, crianças desnutridas crônicas deveriam ser selecionadas para monitoramento e prevenção da repetência nas escolas investigadas. (MALTA; GOULART; COSTA, 1998).

A desnutrição crônica ou passada não pode ser responsabilizada, única e exclusivamente, pelos elevados índices de repetência e evasão escolar brasileiros. É sabido que, mesmo crianças já desnutridas, por apresentarem adaptação a sua situação, priorizam o funcionamento de sistemas nobres em detrimento de seu crescimento. Assim, se adequadamente estimuladas e ensinadas têm condições de aprender, não devendo ser subestimadas ou rotuladas pelas dificuldades escolares que apresentam. No entanto, a fome crônica, a “fome do dia”, esta sim pode determinar o baixo rendimento escolar e colaborar para o fracasso escolar. É principalmente sobre esta fome que a merenda escolar atua, desde que nutricionalmente adequada. (MOYSÉS; LIMA, 1983).

“Bolsa Família” e “Fome Zero” são estratégias impulsionadas pelo Governo Federal para assegurar o direito humano à alimentação adequada às pessoas com dificuldades de acesso aos alimentos. Tais estratégias se inserem na promoção da Segurança Alimentar e

Nutricional, buscando a inclusão social e a conquista da cidadania da população mais vulnerável à fome. (BRASIL, 2009a).

Outra importante estratégia é o Programa Nacional de Alimentação Escolar – PNAE. (BRASIL, 2009b). Este programa iniciado na década de cinquenta é mantido pelo Ministério da Educação. Ele regulamenta a oferta de alimentos aos alunos matriculados na pré-escola, ensino fundamental e ensino médio da rede pública durante o período letivo. Determina que as escolas públicas devam fornecer alimentação escolar com recursos repassados diretamente pela União. Assim, desde sua implantação o PNAE vem despontando como uma alternativa em expansão em nosso País, sendo objeto de estudos quanto a sua eficácia e possíveis melhorias que visem à redução da fome de nossa população infantil.

O PNAE, através de suas portarias, determina que “a alimentação escolar é direito dos alunos e dever do Estado, e deverá ser promovida e incentivada com vistas ao atendimento de diretrizes estabelecidas.” São diretrizes do PNAE: “emprego da alimentação saudável e adequada, compreendendo o uso de alimentos variados, seguros, que respeitem a cultura, tradições e hábitos alimentares saudáveis, contribuindo para o crescimento e o desenvolvimento dos alunos e para a melhoria do rendimento escolar, em conformidade com a sua faixa etária e seu estado de saúde, inclusive dos que necessitam de atenção específica.” (BRASIL, 2009b).

Quanto aos alimentos utilizados, as recomendações do PNAE determinam a “utilização de pelo menos três porções de frutas e hortaliças por semana” além de estabelecer as proporções médias máximas de energia provenientes do açúcar simples e das gorduras. Além disto, pelo PNAE estão proibidas bebidas com baixo teor nutricional, ou alimentos com quantidade elevada de sódio. Estes cardápios deverão ser planejados, de modo a atender, em média, às necessidades nutricionais estabelecidas pelo PNAE, que variam de 20% a 70% das necessidades nutricionais diárias dos alunos, a depender da comunidade onde a Escola se encontra e do tempo de permanência dos alunos na mesma. Para isto, o PNAE destina a cada entidade executora (escola) um montante de recursos financeiros que varia de R\$ 0,30 a R\$ 0,90 por dia para cada aluno matriculado. (BRASIL, 2009b).

Dentre as alternativas que visam minimizar a fome e a desnutrição em nosso País, o PNAE constitui-se em estratégia promissora. Através dele, a escola passou a servir a dois propósitos: o educar e o nutrir. Este sinergismo se faz mais evidente e necessário em locais onde vivem crianças em situação de insegurança alimentar. Estas, muitas vezes, vêm à escola atraídas pela alimentação fornecida. Para algumas delas a alimentação ali servida constituir-se-á na sua única refeição daquele dia.



No entanto, acreditar que o PNAE é capaz de erradicar completamente a desnutrição infantil em nosso País é ilusório e deve ser encarado como discurso político, mesmo que em determinadas regiões de elevada pobreza, os efeitos nutricionais da oferta de merenda escolar podem ser observados. Em estudo que avaliou as relações existentes entre o acesso à alimentação escolar e o estado nutricional de escolares no nordeste e sudeste do Brasil foi verificado que a prevalência de desnutrição era maior entre crianças que não freqüentavam escolas ou que freqüentavam escolas que não forneciam alimentação escolar, em relação as que estudavam em escolas atendidas pelo PNAE (27,9% e 11,8%, respectivamente). (BURLANDY; ANJOS, 1997). Desta forma, não se pode ignorar que o PNAE tem importante papel no controle dos distúrbios nutricionais. Porém, o mesmo estudo demonstrou que a focalização do Programa ainda é inadequada, uma vez que sua cobertura é diretamente proporcional à renda, ou seja, as populações com as maiores rendas têm mais acesso à oferta de refeições.

Por todos estes motivos, principalmente pela sua importância no contexto da insegurança alimentar e da desnutrição, a alimentação escolar necessita reavaliações contínuas e precisas de sua qualidade nutricional. Assim, estudos que visem o seu aprimoramento se tornam importantes, como o uso de ingredientes alternativos, de reduzido valor comercial, como matéria-prima para o enriquecimento nutricional dos alimentos servidos.

Alimentação alternativa é definida como a “proposta de promover na dieta brasileira o uso de alimentos tradicionais e não tradicionais ricos em vitaminas e minerais, acessíveis a toda a população.” Dentre estes alimentos estão os farelos, farinhas, folhas verdes, cascas (de frutas, verduras e ovos), sementes, etc. (SANTOS et al., 2001). Porém, os efeitos teóricos destes alimentos necessitam de adequada avaliação prática, uma vez que nem sempre os resultados *in vitro* obtidos são acompanhados dos efeitos *in vivo* esperados.

O maior exemplo deste tipo de alimentação é a multimistura preconizada pela Pastoral da Criança da Conferência Nacional dos Bispos do Brasil (CNBB) ela também ganha amparo do Programa de Combate às Carências Nutricionais do Ministério da Saúde. (FARFAN, 1998; SANTOS et al., 2001). Apesar da sua ampla utilização em nosso País, o Conselho Federal de Nutricionistas e a Sociedade Brasileira de Pediatria desencorajam o uso desta alimentação alternativa em programas de alimentação infantil e especialmente em programas emergenciais de combate à fome. (CFN, 1996; TORIN; DOMENE; FARFAN, 1995). Recentemente, uma pesquisa conduzida na Universidade Federal de Santa Maria demonstrou considerável grau de contaminação microbiológica, acima dos limites permitidos para alimentação infantil, em cinquenta por cento das amostras de multimisturas analisadas. (KAMINSKI, 2006a). Além

disto, pode ser verificado que, devido à grande variedade de composição química dos diferentes tipos de formulações de multimisturas encontradas no País, nem todas servem como fonte dos macronutrientes necessários à recuperação nutricional. (KAMINSKI, 2006b).

Outra estratégia adotada para tentar minimizar as conseqüências da carência de nutrientes, em especial micronutrientes como o ferro e zinco, são as várias alternativas de suplementação utilizadas. Exemplos disto são o leite, o queijo e o pão enriquecidos com ferro, e que são alimentos do cardápio diário da criança. (CINTRA et al., 2002; FISBERG et al., 1995; TORRES; SATO; QUEIROZ, 1995).

Além da fortificação alimentar, compostos especificamente desenhados para promover a recuperação nutricional tem sido propostos. Tasca (2002), utilizando os formulados nutricionais (F-75 e F-100) preconizados pela Organização Mundial da Saúde, observou melhora significativa nos índices antropométricos, dos níveis de cobre e de zinco. Porém, estes formulados dependem de ingredientes (leite em pó desnatado, açúcar, farinha de cereais, óleo vegetal, minerais e complexo vitamínico) nem sempre disponíveis ou acessíveis a populações de baixa renda.

Assim, a busca por co-produtos agroindustriais altamente nutritivos, mas de baixo custo se tornou uma estratégia a ser implementada. Conforme a região do País, diferentes culturas agrícolas são praticadas e, assim, diferentes co-produtos são originados durante o processamento industrial. No entanto, produtos destinados ao consumo humano, principalmente por populações em insegurança alimentar, não podem ser subestimados quanto à qualidade nutricional. As necessidades protéicas necessárias ao anabolismo intenso dos seres em crescimento devem ser asseguradas. Além disto, uma oferta calórica adequada também deve ser assegurada.

A ingestão excessiva de proteínas em fases precoces da vida pode estar relacionada com o padrão de desenvolvimento de adiposidade, aumentando o risco de obesidade futura. (ROLLAND-CACHERA; DEHEEGER; BELLISLE, 1995;1999). Por outro lado, se o consumo energético for inferior às necessidades, as células são forçadas a usar aminoácidos dietéticos para síntese de glicose e/ou energia, prejudicando o anabolismo protéico, tão intenso e necessário nos seres em crescimento. (WHITNEY; CATALDO; ROLFES, 2002).

Além disto, o perfil aminoacídico da proteína ingerida também tem importância vital para a adequada síntese protéica, pois se um aminoácido indispensável apresenta-se deficiente (chamado aminoácido limitante), então todos os demais aminoácidos serão oxidados. Isto ocorre porque proteínas não podem ser parcialmente sintetizadas. Assim, como os aminoácidos dietéticos seguem apenas duas rotas distintas, incorporação protéica ou

oxidação, a falta de um aminoácido acarretará na parada da síntese protéica e na oxidação dos aminoácidos até então incorporados. (ELANGO; BALL; PENCHARZ, 2009).

Também a biodisponibilidade aminoacídica, ou seja, a proporção de aminoácidos que é digerida e absorvida em uma forma adequada para ser utilizada na síntese protéica tem extrema relevância nutricional. A técnica do Indicador de Oxidação de Aminoácidos tem sido capaz de determinar esta biodisponibilidade dos aminoácidos dietéticos, sendo promissora na definição do verdadeiro valor biológico de diversas proteínas alimentares. (ELANGO; BALL; PENCHARZ, 2008). Desta forma, a ingestão de diferentes fontes protéicas alimentares poderá ser mais precisamente definida para uma adequada nutrição.

Utilizando conceitos originados na nutrição animal, mas atualmente aplicados à nutrição humana, uma proteína ideal fornece o balanço exato de aminoácidos capazes de prover, sem deficiências ou excessos, as necessidades absolutas de todos os aminoácidos necessários à manutenção (ou manutenção) e aumento máximo de proteína corporal. (ZAVIEZO, 1998). Na prática esta proteína não existe, mas pode ser obtida pela formulação de uma combinação protéica que minimize os excessos de aminoácidos indispensáveis juntamente com o nitrogênio protéico não-específico. Isto reduz o uso de aminoácidos como fonte de energia e reduz a excreção de nitrogênio para o meio ambiente. Além disto, a otimização no fornecimento protéico e de aminoácidos torna a dieta menos dispendiosa, uma vez que fontes protéicas de boa qualidade nutricional habitualmente são de custo elevado.

Concluindo, a busca por alimentos alternativos de baixo custo para serem utilizados junto ao PNAE deve ser estimulada. No entanto, todos os aspectos nutricionais inerentes aos alimentos devem ser rigorosamente considerados e avaliados. Só assim conseguiremos proporcionar uma alimentação economicamente viável e altamente nutritiva, assegurando as necessidades protéico-energéticas tipicamente elevadas na faixa etária infantil, principalmente às crianças em insegurança alimentar.

Com base neste contexto, vários questionamentos foram formulados pelo grupo de pesquisa. Foram eles:

1. Qual o perfil da dieta ingerida por crianças que sabidamente vivem em insegurança alimentar em seus domicílios?
2. Qual o perfil da dieta servida pela escola que atende a estas crianças?
3. Quais co-produtos agroindustriais são amplamente disponíveis em nosso meio, e que propriedades nutricionais eles detêm isoladamente e em associação sob a forma de um “mix”?

4. Seria possível utilizar este “mix” na elaboração de alimentos visando o consumo infantil?
5. Estes alimentos apresentariam custo financeiro viável para utilização como suplemento da alimentação escolar?
6. Estes alimentos poderiam determinar efeitos benéficos sob o ponto de vista de composição corporal em crianças em insegurança alimentar, sabidamente em risco para distúrbios nutricionais?
7. Poderíamos utilizar a técnica do indicador de oxidação de aminoácidos para avaliar a biodisponibilidade metabólica de aminoácidos em alimentos completos, em especial, nestes co-produtos?

Para respondermos a estes questionamentos planejamos cada etapa da pesquisa com os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar a ingestão no domicílio de macro e micronutrientes específicos da dieta de um grupo de crianças que sabidamente vivem em insegurança alimentar;
2. Avaliar a oferta de macro e micronutrientes específicos na alimentação servida pela Escola que atende a este mesmo grupo;
3. Avaliar a quirera de arroz e o concentrado protéico de soja como possíveis co-produtos a serem utilizados na formulação de um “mix” para utilização em alimentos a serem incorporados à alimentação escolar.
4. Elaborar alimentos de reconhecida aceitação pelo público infantil (bolos, pães, polenta, massa de pizza, etc.) utilizando o “mix” em suas formulações e avaliá-los sensorialmente no grupo de crianças em insegurança alimentar selecionado;
5. Avaliar os custos financeiros dos alimentos produzidos com o “mix” e considerados aceitos pelo grupo de crianças em estudo;
6. Ofertar estes alimentos como complementos da alimentação escolar e avaliar os efeitos nutricionais dos mesmos através de parâmetros e índices antropométricos (P, E e IMC) e de composição corporal (massa magra e massa gorda) no grupo de crianças em insegurança alimentar selecionado;
7. Avaliar a aplicabilidade da técnica do indicador de oxidação de aminoácidos na avaliação da biodisponibilidade metabólica da lisina do arroz.

## **2. RESULTADOS CIENTÍFICOS**

Os principais resultados desta tese encontram-se sob a forma de quatro **Estudos Científicos**, os quais serão apresentados no decorrer deste documento. O primeiro deles foi um Estudo Piloto que forneceu resultados preliminares importantes e que foram norteadores para o planejamento e execução dos outros três estudos científicos realizados.

### **2.1. Estudo científico 1**

#### **Estado nutricional de alunos de uma escola pública e perfil das dietas ingeridas em seus domicílios e na Escola – Estudo piloto**

Ivo Roberto Dorneles Prola, Leila Picolli da Silva.

#### **Introdução**

O Programa Nacional de Alimentação Escolar – PNAE do Ministério da Educação determina que “a alimentação escolar é direito dos alunos e dever do Estado, e deverá ser promovida e incentivada com vistas ao atendimento de diretrizes estabelecidas” (1, 2). Conforme as diretrizes, “a alimentação escolar deve fornecer no mínimo 20% das necessidades nutricionais diárias dos alunos que frequentam a Escola em período parcial” (1, 2). Desta forma, os 80% restantes das necessidades nutricionais diárias devem ser supridas pelos alimentos ingeridos pelos alunos em seus domicílios.

Assim, este estudo piloto teve como objetivos gerais obter dados preliminares sobre: 1) Estado nutricional de um grupo de alunos que frequentam uma Escola pública participante do PNAE; 2) Sobre o perfil das dietas por eles consumidas, tanto nos seus domicílios quanto na Escola onde estudam; 3) Comparar os resultados relativos à ingestão dos nutrientes com as necessidades nutricionais preconizadas para a respectiva faixa etária (3, 4).

## **Justificativa**

Este estudo foi realizado no intuito de obter dados preliminares que pudessem nortear o planejamento e a execução de um estudo maior, de intervenção nutricional, a ser desenvolvido na mesma população de alunos.

## **Objetivos específicos**

Foram objetivos específicos deste estudo piloto:

1. Avaliar o estado nutricional dos alunos através do IMC Z-escore;
2. Determinar o número de refeições consumidas pelos alunos nos seus domicílios;
3. Identificar as refeições (desjejum, lanche e/ou jantar) consumidas pelos alunos nos seus domicílios;
4. Identificar os alimentos mais consumidos pelo grupo de alunos nos seus domicílios, a frequência de relato nos recordatórios alimentares e percentagem de adequação às frequências esperadas;
5. Quantificar a ingestão calórica e de macronutrientes pelos alunos nos seus domicílios, e determinar a percentagem de adequação à meta nutricional de 80% das necessidades destes para crianças de 6 a 8 anos;
6. Quantificar a ingestão de micronutrientes pelos alunos nos seus domicílios, e determinar a percentagem de adequação à meta nutricional de 80% das necessidades destes para crianças de 6 a 8 anos;
7. Identificar os cardápios servidos pela escola e verificar as respectivas frequências mensais;
8. Quantificar a ingestão calórica e de macronutrientes pelos alunos na Escola, e determinar a percentagem de adequação à meta nutricional de 20% das necessidades destes para crianças de 6 a 8 anos;
9. Quantificar a ingestão de micronutrientes pelos alunos na Escola, e determinar a percentagem de adequação à meta nutricional de 20% das necessidades destes para crianças de 6 a 8 anos;
10. Determinar a relação protéico-energética nas porções de alimento escolar consumidas pelos alunos, de acordo com os cardápios;

11. Determinar, de acordo com os cardápios escolares servidos, o escore de aminoácidos nas respectivas porções de alimento consumidas pelos alunos;

12. Confrontar os resultados do estado nutricional dos alunos selecionados com os dados relativos à ingestão diária total de nutrientes.

## **Material e métodos**

### **Local e população do estudo**

O estudo foi realizado em uma escola pública da cidade de Santa Maria, RS, Brasil. Esta Escola foi escolhida de forma intencional por atender crianças oriundas do bairro local, mas também crianças provenientes de uma comunidade carente próxima. Esta comunidade é caracterizada por famílias cujos rendimentos financeiros originam-se em atividades de coleta de lixo e do Programa Bolsa Família do Governo Federal, e pela ausência de esgoto e água encanada. Estas características, baixo nível sócio-econômico e ausência de saneamento básico, estão fortemente associadas à insegurança alimentar (IA) moderada e grave (5). Desta forma, a inclusão desta Escola propiciou incluir no estudo uma população de alunos com risco de viverem em IA. Para este estudo a população alvo consistiu de crianças de ambos os sexos, matriculadas no 1º, 2º ou 3º anos do ensino fundamental.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil (Protocolo n º: 23081.004360/2009-70; CAAE: 0052.0.243.000-09), e autoridades escolares.

### **Amostra e amostragem**

A amostra foi formada por alunos que responderam ao convite verbal e escrito. Os alunos que, voluntariamente, decidiram aderir ao estudo necessitaram ter o "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido", assinado por seus pais ou responsáveis, e crianças com mais de 7 anos de idade tiveram que assinar, também, o "Termo de Assentimento". A partir da população de 72 alunos, 61 alunos concordaram em participar do estudo, compondo o grande grupo amostral. A partir deste, 27 alunos (44% do grande grupo amostral) foram selecionados por sorteio simples para comporem um subgrupo amostral. Este foi constituído de 15 meninos

e 12 meninas, com idades entre 6 e 8 anos, e representando, de forma igualitária, as três séries.

### **Avaliação nutricional**

A avaliação nutricional foi realizada em sala designada pela própria Escola e consistiu da coleta de dados referentes ao peso e estatura. Estas medidas foram obtidas com a criança usando o mínimo de roupa possível, descalça e de costas para a balança. Para o peso (P; Kg) foi utilizada balança eletrônica digital com precisão de 100 g (Modelo EB710, Glicomed®). Para a estatura (E; m) foi utilizada a régua (precisão de 0,1 cm) acoplada à balança. As medidas foram realizadas por uma enfermeira treinada para este fim. Com os valores de P e E foi calculado o índice de massa corpórea (IMC;  $\text{Kg.m}^{-2}$ ). A classificação nutricional foi realizada através do IMC Z-escore. Este foi calculado através do programa “Anthro Plus” disponibilizado pela Organização Mundial da Saúde (8), sendo considerados os seguintes critérios: Baixo peso:  $Z < -1$ ; Peso normal:  $-1 \leq Z \leq +1$ ; e Excesso de peso:  $Z > +1$ . (6).

### **Avaliação das dietas**

#### **Dietas ingeridas nos domicílios**

A avaliação das dietas ingeridas nos domicílios foi feita através do “recordatório alimentar de 24 h”, aplicados por duas nutricionistas treinadas, sendo cada aluno questionado sobre os alimentos (e respectivas quantidades aproximadas) consumidos nas últimas 24 h. Para isto, as perguntas feitas a cada aluno foram: 1) “O que você comeu e/ou bebeu desde o momento em que você deixou a escola no dia anterior?”; 2) “O que você comeu e/ou bebeu desde o momento em que você acordou hoje, até este momento?”.

Para fins de padronização nas definições, foram considerados 3 tipos possíveis de refeições consumidas nos domicílios: 1) Desjejum (qualquer refeição, independente do tipo de alimento presente, consumida pelo aluno pela manhã, ao acordar, e antes de vir para a Escola; 2) Lanche (refeição composta de um ou mais alimentos como pães, bolachas, frutas, leite, café-com-leite, queijo e iogurte, consumidos pelo aluno após chegar da Escola); e 3) Jantar



(refeição composta de um ou mais alimentos como arroz, feijão, massa, carnes, polenta, ovo, salada verde, batata frita e pizza, consumidos pelo aluno após chegar da Escola).

Cada alimento relatado no recordatório alimentar foi analisado quanto ao teor calórico e quantidade de macronutrientes (carboidratos, HC; proteínas, Prot; lipídios totais, Lip; e fibras totais, FT) e micronutrientes (vitaminas – A e C; minerais – Ca, Fe, e Zn) através do programa “DietWin”. Os resultados quanto ao perfil nutricional das dietas foram comparados com as recomendações nutricionais de referência para crianças de 6 a 8 anos de idade, sendo considerado como “meta nutricional” o valor de pelo menos 80% destas recomendações. As recomendações utilizadas foram: 1) Para calorias: Requerimentos Médios Estimados – “EAR” (3); 2) Para macro e micronutrientes: Ingestão Dietética Recomendada – “DRI” (4).

Para avaliação dos dados referentes aos alimentos mais consumidos pelo grupo de alunos nos seus domicílios, bem como da frequência de relato dos mesmos nos recordatórios alimentares de 24 horas assumiu-se que cada aluno deveria relatar pelo menos 3 refeições: 1 desjejum, 1 lanche e 1 jantar . Assim, em 27 recordatórios esperavam-se 81 refeições realizadas (=3 refeições/recordatório), sendo que os alimentos consumidos no desjejum e no lanche poderiam ser referidos 54 vezes (2x/dia), e os alimentos consumidos no jantar poderiam ser referidos 27 vezes (1x/dia). Estas frequências de reletos foram consideradas como “valores esperados” (100%) e serviram como referência para os cálculos de adequação (%) das frequências de consumo relatadas.

### **Dietas ingeridas na Escola**

Os cardápios foram avaliados durante sua produção, na cozinha da Escola, sendo quantificados todos os ingredientes utilizados, bem como o peso final dos alimentos prontos.

Foram avaliados o teor calórico e a quantidade de macronutrientes (carboidratos, HC; proteínas, Prot; lipídios totais, Lip; gorduras saturadas, GSat; e fibras totais, FT) e de micronutrientes (vitaminas – A e C; minerais – Ca, Fe, Zn e Na) dos alimentos presentes através do programa “DietWin”.

Para a relação protéico-energética, foi considerada adequada quando 10 – 30% das calorias totais diárias consumidas foram fornecidas pelas proteínas da dieta. (4).

Quanto aos aminoácidos (AA), o escore de aminoacídico (mg AA / g proteína) foi calculado pelo programa “DietWin”. Como este programa não possui em seu banco de dados os valores de AA para os alimentos, estes valores foram inseridos utilizando-se como fonte de

referência a tabela de composição química de alimentos “USDA National Nutrient Database for Standard Reference” (7).

Através das pesagens individuais dos pratos (antes e depois da ingestão dos alimentos) as quantidades médias de macro e micronutrientes ingeridas pelos alunos foram determinadas. Estes resultados foram comparados com as recomendações nutricionais de referência para crianças de 6 a 8 anos de idade (Calorias: FAO/WHO/UNU, 2004; demais nutrientes: DRI, 2002/2005), sendo considerado como “meta nutricional” o valor de pelo menos 20% destas recomendações. Para o escore de AA foi utilizado como referência o escore para crianças de 3 a 10 anos (9).

## Resultados

Os resultados referentes ao estado nutricional dos alunos encontram-se na tabela 1. Os resultados referentes à avaliação das dietas consumidas nos domicílios encontram-se nas tabelas 2 a 6. Os resultados referentes à avaliação das dietas consumidas na Escola encontram-se nas tabelas 7 a 11.

Tabela 1. Estado nutricional dos alunos estudados.

IMC Z-escore	Meninos	Meninas	Total (%)
$Z < -1$	1	1	2 (8)
$-1 \leq Z \leq +1$	8	5	13 (54)
$Z > +1$	3	6	9 (38)
Total	12	12	24

Tabela 2. Número de refeições consumidas pelos alunos nos seus domicílios.

Nº de refeições	Meninos	Meninas	Total	Total Cumulativo
	N	N	N (%)	N (%)
1 refeição	1	3	4 (15)	4 (15)
2 refeições	7	6	13 (48)	17 (63)
3 refeições	7	3	10 (37)	27 (100)

Tabela 3. Tipo de refeição consumida pelos alunos nos seus domicílios.

	Tipo de refeição		
	Desjejum N (%)	Lanche N (%)	Jantar N (%)
Sim	23 (85)	11 (41)	26 (96)
Não	4 (15)	16 (59)	1 (4)

Tabela 4. Alimentos mais consumidos pelo grupo de alunos nos seus domicílios, frequência de relato nos recordatórios alimentares e percentagem de adequação às frequências estimadas.

Alimentos	Frequência		
	Relatada (N)	Esperada <sup>1</sup> (N)	Adequação (%)
1. Arroz com feijão, ou arroz ou massa ou feijão ou lentilha <sup>2</sup>	32	27	119
2. Pão ou bolacha <sup>3</sup>	27	54	50
3. Carne ou ovo <sup>2</sup>	23	27	85
4. Leite ou iogurte <sup>3</sup>	20	54	37
5. Frutas <sup>3</sup>	16	54	30
6. Folhas verdes (salada) <sup>2</sup>	7	27	26

<sup>1</sup>(número total de refeições assumido como provável de conter os alimentos do respectivo grupo)

<sup>2</sup>(alimentos relatados como consumidos no jantar)

<sup>3</sup>(alimentos relatados como consumidos no desjejum e/ou lanche)

Tabela 5. Ingestão calórica e de macronutrientes pelos alunos nos seus domicílios, e percentagem de adequação à meta nutricional<sup>1</sup>.

	Calorias (kcal)	HC (g)	Prot (g)	FT (g)
Média ± DP <sup>2</sup>	749 ± 334	90 ± 38	36 ± 16	10 ± 40
Adequação (%)	60	86	239	52

<sup>1</sup>(calorias: ≥ 1250 kcal; HC: 104 g; Prot: 15,2 g; FT: 20 g correspondendo a 80% da média das recomendações diárias para crianças de 6 a 8 anos; calorias: FAO/WHO/UNU, 2004 ; demais: “DRI”, 2002/2005)

<sup>2</sup>(DP = desvio padrão)

Tabela 6. Ingestão de micronutrientes pelos alunos nos seus domicílios, e percentagem de adequação à meta nutricional<sup>1</sup>.

	Vitaminas		Minerais (mg)		
	A (µg)	C (mg)	Ca	Fe	Zn
Média ± DP <sup>2</sup>	199 ± 184	17 ± 29	225 ± 186	5,9 ± 2,5	6,3 ± 3,8
Adequação (%)	62	85	35	74	158

<sup>1</sup>(vitamina A: 320 µg; vitamina C: 20 mg; Ca: 640 mg; Fe: 8 mg; Zn: 4 mg correspondendo a 80% da média das recomendações diárias para crianças de 6 a 8 anos conforme “DRI”, 2002/2005)

<sup>2</sup>(DP = desvio padrão)

Tabela 7. Cardápios servidos pela escola e respectivas frequências mensais.

Cardápios	Composição	Nº de dias <sup>1</sup>
1	Arroz branco com feijão preto e omelete	2
2	Arroz branco com molho de tomate e salsicha	2
3	Canjica de milho com leite	2
4	Mingau de chocolate com bolacha doce	2
5	Banana caturra	4
6	Polenta de milho com guisado	2
7	Sopa de arroz, legumes e frango	2
8	Risoto de frango	2
9	Massa com guisado	2

<sup>1</sup>(em 20 dias letivos por mês)

Tabela 8. Consumo médio de calorias e macronutrientes por porção de alimento escolar consumido em relação às recomendações do PNAE para crianças de 6 a 10 anos.

	Calorias (kcal)	HC (g)	Prot (g)	Lip (g)	GSat (g)	FT (g)
	<i>Recomendações - PNAE*</i>					
	300	48,8	9,4	7,5	< 3,3 g/d	5,4
Média/porção	213,92	30,91	7,79	4,99	1,85	1,46
Adequação (%)	71,3	63,3	82,9	66,5	100	27,0

\*(20% necessidades diárias)

Tabela 9. Consumo médio de micronutrientes por porção de alimento escolar consumido em relação às recomendações do PNAE para crianças de 6 a 10 anos.

	Vitaminas		Minerais (mg)			
	A (µg)	C (mg)	Ca	Fe	Zn	Na
	<i>Recomendações - PNAE*</i>					
	100	7	210	1,8	1,3	< 393
Média/porção	44	3,4	44	1,1	1,3	302,3
Adequação (%)	44,0	48,9	20,9	61,7	100	100

\*(20% necessidades diárias)

Tabela 10. Relação protéico-energética nas porções consumidas de acordo com os cardápios.

Cardápios	Calorias (kcal)	Proteínas (g)	% VET
1	290,2	13,7	18,8
2	289,2	6,9	9,5
3	153,9	3,6	9,4
4	348,2	7,6	8,7
5	121,0	1,5	5,0
6	139,8	7,9	22,6
7	87,3	4,3	19,7
8	196,5	5,9	12,0
9	299,0	20,3	27,2
Média	213,9	8,0	14,8
DP	88,7	5,4	7,1
Mínimo	87,3	1,5	5
Máximo	348,2	20,3	27,2

Tabela 11. Escores de aminoácidos<sup>1</sup> nas porções de alimento escolar consumidas pelos alunos conforme o tipo de cardápio.

	Escore de aminoácidos								
	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Val	His	Phe+Tyr	Met+Cys
	<i>Recomendação - OMS</i>								
	6,6	25	31	61	48	40	16	41	24
Cardápio 1	12,4	41,8	47,4	82,6	64,8	59,7	25,8	87,3	38,7
Cardápio 2	10,5	37,5	39,5	73,9	58,9	49,7	26,5	73,2	37,1
Cardápio 3	13,0	43,8	57,9	102,7	72,3	65,1	27,5	95,7	35,4
Cardápio 4	7,7	24,8*	33,2	53,9*	43,5*	36,8*	14,9*	53,1	18,9*
Cardápio 5	8,3	25,7	25,7*	62,5	45,9*	43,2	70,8	53,3	15,6*
Cardápio 6	4,7*	37,7	42,8	85,9	71,9	49,4	31,2	17,0*	7,3*
Cardápio 7	8,3	39,0	39,4	67,4	61,8	44,9	23,6	67,0	35,6
Cardápio 8	10,2	38,2	43,7	79,4	59,4	53,9	26,4	79,9	39,7
Cardápio 9	7,2	35,5	43,6	75,7	64,1	48,2	27,7	28,0*	16,2*
Média	9,1	36,0	41,5	76,0	60,3	50,1	30,5	61,6	27,2
DP	2,6	6,6	9,0	14,2	10,0	8,6	15,7	26,4	12,5

\*(Escore AA inferior ao recomendado)

## Conclusões

Este estudo piloto nos permitiu concluir que:

1. Dos alunos avaliados, 38% apresentavam excesso de peso;
2. Quanto ao número de refeições ingeridas no domicílio, 63% dos alunos consumiam no máximo duas refeições por dia;
3. Dos 27 alunos estudados, 4 não ingeriam alimentos antes de irem para a Escola;
4. “Arroz com feijão” foi o alimento mais relatado no “jantar” e, algumas vezes, também no “desjejum” e/ou no “lanche”, o que determinou uma frequência superior (= 32 relatos) à frequência esperada (= 27 relatos); por outro lado, a frequência de relatos de “pão ou bolacha” nas refeições atingiu apenas 50% do número de relatos esperado, demonstrando não haver consumo exagerado destes alimentos entre as crianças avaliadas; da mesma forma, observou-se uma frequência muito baixa quanto ao relato de frutas, verduras e laticínios nos recordatórios;

5. A ingestão protéica nos domicílios excedeu em 139% a meta recomendada; para os demais nutrientes (HC e FT) e calorias, a meta nutricional diária de 80% das necessidades não foi atingida;

6. A ingestão de micronutrientes (vitaminas A e C, Ca e Fe) nos domicílios não atingiu a meta nutricional de 80% das necessidades;

7. A Escola possui 9 cardápios planejados e elaborados pela merendeira, e que são repetidos de forma sequencial ao longo do mês; um deles é composto de apenas uma fruta (banana);

8. Os escores de aminoácidos nas porções de alimento escolar foram inadequados em 4 dos 9 cardápios servidos, apresentando deficiência de 2 a 6 aminoácidos nestes alimentos;

9. A relação protéico-energética nas porções consumidas pelos alunos foi inadequada (menos de 10% das calorias como proteínas) em 4 dos 9 cardápios servidos;

10. Exceto em relação à ingestão de GSat, o consumo médio de calorias e macronutrientes por porção de alimento escolar consumido foi menor que o recomendado pelo PNAE;

11. Exceto em relação à ingestão de Zn e Na, o consumo médio de vitaminas A e C, bem como Ca e Fe por porção de alimento escolar consumido foi menor que o recomendado pelo PNAE;

12. A despeito da baixa ingestão de calorias, HC e Lip, tanto nos seus domicílios quanto na Escola, observamos uma alta prevalência de excesso de peso nos alunos avaliados. Uma vez que a ingestão protéica nos domicílios excedeu em mais que o dobro o recomendado, e foram detectadas inadequações aminoacídicas e energético-protéicas nos cardápios escolares, estes achados podem estar relacionados com o excesso de peso observado no subgrupo amostral de alunos.

## **Conclusão geral**

Este estudo piloto foi capaz de identificar inadequações na ingestão de macronutrientes (exceto proteínas) e de micronutrientes (exceto Zn) pelas crianças nos seus domicílios. Além disto, detectou inadequações também nos cardápios servidos pela Escola, tanto quanto ao seu perfil nutricional quanto nas porções consumidas pelos alunos.

Este estudo demonstrou, também, uma alta prevalência (38%) de excesso de peso entre os alunos estudados, a despeito da baixa ingestão calórica, de carboidratos e de lipídios.

A ingestão protéica excessiva nos domicílios associada às inadequações aminoacídicas e energético-protéicas observadas em metade dos cardápios escolares podem ter influenciado este achado.

Assim, no subgrupo amostral estudado, a despeito do que supõe o PNAE, a qualidade e a quantidade dos alimentos consumidos pelos alunos nos seus domicílios foram insuficientes para prover os 80% de suas necessidades nutricionais. Similarmente, a alimentação escolar avaliada foi insuficiente para prover os outros 20% das necessidades nutricionais diárias necessárias.

## **Bibliografia**

1. Brasil (2009a) **Medida Provisória nº 455, de 28 de janeiro de 2009**. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Mpv/455.htm29/01/2009](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Mpv/455.htm29/01/2009)>. Acesso 01/10/2009.
2. Brasil (2009b) **Medida Provisória nº 455, de 28 de janeiro de 2009**. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Mpv/455.htm29/01/2009](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Mpv/455.htm29/01/2009)>. Acesso 01/10/2009.
3. FAO/ WHO/UNU (2004) **Expert consultation: Human Energy Requirements**. Rome, World Health Organization.
4. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2002/2005) **Dietary Reference Intakes – DRIs**. National Academies. Disponível em: <<http://fnic.nal.usda.gov/dietary-guidance/dietary-reference-intakes/dri-tables>>. Acesso 01/10/2009.
5. PIMENTEL PG, SICHIERI R, SALLES-COSTA R (2009) **Insegurança alimentar, condições socioeconômicas e indicadores antropométricos em crianças da Região Metropolitana do Rio de Janeiro/Brasil**. R Bras Est Pop 2009, 26(2): 283-94, jul./dez.
6. SBP (2009) **Avaliação nutricional da criança e do adolescente – Manual de Orientação** / Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento de Nutrologia, São Paulo, 112 p.
7. USDA Agricultural Research Service (2010) **USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23**. Disponível em: <[http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq\\_no\\_115=257886](http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=257886)>. Acesso 01/07/2010.
8. WHO (2007) World Health Organization. **Growth reference data for children from 5 to 19 years**. Geneva. Disponível em: <<http://www.who.int/growthref/en/>>. Acesso 18/11/2012.
9. WHO/FAO/UNU (2007) **Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. pp 1-284.



## 2.2. Estudo científico 2

### **The use of agro industrial by-products and the ideal protein concept in the formulation of foods for children**

(Artigo a ser submetido)

Ivo Roberto Dorneles Prola<sup>1</sup>, Leila Picolli da Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Santa Maria. Av. Roraima n.1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

Corresponding Author:

(\*) Dr. Ivo Roberto Dorneles Prola

Departamento de Pediatria

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil.

Phone: 55 –3220-8520

Fax: 55 (55) 3220-8520

E-mail: [iprolla@gmail.com](mailto:iprolla@gmail.com)

Abbreviations: amino acid, AA; broken rice, BR; Corrected Protein Intake, CPI; High Performance Liquid Chromatography, HPLC; Brazilian National School Feeding Program, BNSFP; Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score, PDCAAS; soybean protein concentrate, SPC; True Protein Digestibility, TD.

#### **Abstract**

The search for new food sources for human nutrition is a concern worldwide. The use of agro industrial by-products is considered a promising strategy. However, the nutritional profile of the nutrient sources must be carefully assessed, mainly when we are dealing with growing children, with critical nutritional requirements. For them, both protein-energy ratio and amino acid score (AA score) of the protein provided are crucial. This study presents a mix

formulated with two ordinary agro industrial by-products, soy protein concentrate (SPC) and broken rice (BR), and proposes some examples of foods made with the mix. Based on the results, the 1:3 ratio of SPC flour to BR flour was defined as the best one, showing good culinary properties, presented high protein content ( $19.5\text{g}\cdot 100^{-1}$ ) and the highest AA score (118%). The mix obtained was tested in five different recipes of muffins which were sensorially evaluated by a group of children. All the recipes made with the mix were very well accepted, presented the AA score considered appropriate for children from 4 to 18 years of age, and were up to 24% less expensive than the original recipes. Based on the results, the mix developed showed to be nutritious, and can be used as ingredient of foods for nutritional interventions, especially for children with high nutritional requirements.

Keywords: broken rice, soy protein concentrate, amino acid score.

## **Introduction**

Many children around the world do not have food in quantity or frequency to meet their nutritional needs [1]. A possible strategy to relieve this reality is the use of alternative low-cost foods which could be widely distributed to these populations. The agro industrial by-products originating from the food industry can be considered a promising strategy. However, the alternative diets should be based on palatable products, easily accessible, inexpensive and with an adequate nutritional profile to pediatric patients.

In this population whose nutritional requirements are high, both protein-energy ratio and amino acid (AA) score of the protein supplied are of primary relevance. Then, the protein source used must be based on the ideal protein concept. In other words, the protein must contain the exact balance of AA capable of providing, without excesses or deficiencies, the absolute requirements of AA that are necessary for growth and body protein increment [2]. However, high nutritional quality protein sources are usually of animal origin and, therefore, expensive [3]. This fact precludes their use in large scale when the aim is feeding the poor in developing countries. On the other hand, the appropriate vegetable protein sources combination may originate a mix with better nutritional profile than its precursors and AA score closer to the protein scores considered optimal [4].

One of the issues faced when vegetable protein sources are used to replace the animal ones is the ideal amount necessary to meet nutritional requirements, especially those related to protein, AA and energy needs [3]. Thus, the search for alternative low-cost foods which, in

small amounts, can provide high protein content, adequate AA profile and sufficient calories to protein synthesis is urgently needed. In this context, soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and rice (*Oryza sativa* L.) are expressive cultures in many parts of the world [5] and their by-products, soybean protein concentrate (SPC) and broken rice (BR), are of low cost but of high nutritional value.

The SPC is derived from defatted peeled soy grains and by the partial removal of carbohydrates. The resulting meal presents a high protein and fiber content, but low in carbohydrates and fats [6]. The BR arises during the processing of rice [7]. It is a source of carbohydrates, energy and AA [6]. Although it is scorned for human consumption, it is widely used in animal nutrition [8, 9] due to the unchanged nutritional characteristics of the grain and its low cost. Soybean is deficient in sulfur AA (methionine) [10]. Rice, like all cereals, has lysine as the limiting AA [11]. However, the combination of these two ordinary by-products in appropriate proportions can lead to a high protein supplement, with better AA profile and adequate energy content.

The objective of this study was to use SPC and BR as a high protein mix with AA profile suitable for the pediatric age requirements. Moreover, we aimed at: 1) comparing the mix to other protein sources; 2) using the mix in the formulation of palatable foods for children; and 3) assessing the acceptability and costs of the experimental foods.

## **Material and methods**

This study was approved by the Ethics Committee in Research of Universidade Federal de Santa Maria - UFSM/Brazil (Process No.: 23081.004360/2009-70; CAAE: 0052.0.243.000-09).

## **Study population**

The “sensory acceptability tests” were applied to a group of students aged 6 to 11 years old, enrolled in the 1st, 2nd or 3rd year of elementary school from a local public school of the Santa Maria city, RS, Brazil. This school serves children from different socio-economic conditions, including children from a nearby low-income community. The sample was formed by the students who responded to the written and spoken invitation. The students who

voluntarily decided to take place in the “Sensory Acceptability Tests” needed to have the “Informed Consent” signed by their parents or guardians. Children older than 7 years had to sign the “Express Consent”, also. Students with positive history of allergy to soy protein products were considered ineligible for the tests.

### **Formulation of the mix**

The mix was developed using SPC flour (Imcosoy® 60, Imcopa Industry, Import and Trade Paraná - Araucaria / PR) and BR flour (Marzari Food, Santa Maria - RS). The SPC flour and BR flour were previously assessed for chemical composition (crude protein, method 960.52, conversion factor: 6.25; total fiber, method 985.29; insoluble fiber, method 991.42; lipids, method 920.39 with acid hydrolysis; ash, method 923.03; and moisture, method 925.10) according to the official methods of analysis recommended by the AOAC [12]. The carbohydrate content was obtained by difference (100 - (protein + fat + total fiber + ash + moisture)). In the calculations of the energy content, the caloric values used were 4 kcal.g<sup>-1</sup> of carbohydrate or protein, and 9 kcal.g<sup>-1</sup> of lipid [13].

For the mix formulation, the AA score present in the SPC flour and BR were compared to the AA score for children from 3 to 10 years old (assumed as the reference AA score in this study), since it presents the highest AA requirements recommended by the WHO (2007) [14]. Then, it can be extrapolated to boys and girls aged from 10 to 18 years, as well as for adults, who have smaller AA requirements. Different ratios between the SPC flour and BR flour were tested, aiming at achieving the best AA profile in comparison to the reference score. Since the SPC has higher cost and more pronounced flavor in relation to the BR flour, the amount of SPC in the mixture was tried to be as low as possible.

After getting the ideal mix, it was compared to other dietary protein sources commonly used in infant feeding regarding the AA score (AAS), True Protein Digestibility (TD), Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS), and Corrected Protein Intake (CPI). The daily amount of the dietary protein sources to fulfill the AA and protein requirements of the pediatric age group was also a concern.

### **Formulation of the experimental diets**

Eight alimentary preparations recipes widely accepted by Brazilian children were reformulated using the mix in order to produce the experimental diets. In two salt food recipes (vegetable pie, and pasta with tomato sauce), and in four muffin recipes (vanilla muffin, chocolate muffin, carrot muffin and honey muffin), the wheat flour was completely replaced by the mix. In one salt food recipe (polenta with ground beef), and in one muffin recipe (corn muffin), the corn flour was only partially (55%) replaced by the mix.

### **Sensory acceptability tests**

The experimental diets were evaluated through sensory acceptability tests. Each food was assessed in a particular day and totally random. The tests were performed in the school cafeteria, using an adaptation (change in pictures' sequence) of the Facial Hedonic Scale (Figure 1) recommended by the Brazilian National School Feeding Program – BNSFP [15]. As recommended by the BNSFP, the experimental diet was considered "accepted" when the positive responses percentage to the options "I liked it very much" or "I liked it" was 85% or more. Otherwise, it was considered "rejected".

### **Amino acid score in experimental diets**

The indispensable AA profile of each accepted diet was assessed by High Performance Liquid Chromatography – HPLC (hydrolysis by 6 N HCl; precolumn derivatization of free amino acids with phenylisothiocyanate (PITC); derivatives separation by C18 reverse-phase column (Pico-Tag - 3.9 x300 mm); UV detection at 254 nm). The AA score determined in the experimental diets were compared to the AA pattern found in the same foods if, theoretically calculated, they had been made with the usual flours: wheat flour or corn flour. For these foods, considered the reference preparations, the AA pattern were estimated for each ingredient and respective amount in the formulation, using the AA data published in the "USDA National Nutrient Database for Standard Reference" [16]. For the SPC, we used the mean value of each indispensable AA in the product Imcosoy 60 ®, according to the industry information.

### **Cost of experimental diets**

The experimental diets considered as “accepted” by the children were analyzed concerning their costs, based on current prices charged on the local trade at the time of the study (Santa Maria, RS, Brazil; July, 2010). The price represents the median value (minimum – maximum value; between brackets) of \$/1000 units of 50 g each and was expressed in US\$.

### **Results and discussion**

In this study we demonstrated the feasibility of using two agro industrial by-products, SPC and BR, widely available in many world regions [5]. These products, in isolation, have limited nutritional profile for human consumption. However, when they were associated in appropriate proportion, a third product (mix) was created, with highly nutritious profile. It has to do with the high protein concentration (22.9% of calories) and the amino acid balance present in the mix, which are considered crucial for the proper utilization of the protein provided by the diet [17]. Furthermore, as the mix is gluten free and lactose free, it can be consumed even by children who have dietetic restrictions to these nutrients.

Despite the fact that soybean is considered deficient in sulfur AA (methionine) [10], the average AA content (reported by the industry) in the SPC determined an AA score of 125%. However, this product could not be used alone in the preparations due to: 1) the peculiar flavor of soy; 2) not being able to fully replace the flour in preparations for human consumption; 3) having higher cost in relation to BR. The addition of BR flour, in turn, even showing a low lysine content, aimed to minimize the unpleasant soy taste, make the mix a wheat flour feasible substitute in foods, and reduce the mixture cost. Concerning all the above mentioned factors and mainly the AA score desired, the 1:3 ratio of SPC flour to BR flour was defined as the best one (Table 1). This ratio resulted in a mixture with high protein (22.9% of calories) [18] and fiber, but low fat (4.2% of calories) contents, being useful even for children with dislipidemia. This protein level was far higher than some ordinary protein sources as wheat flour, and rice and beans mixture (Table 2).

The 1:3 ratio determined a caloric density of 84 non-protein calories.g<sup>-1</sup> of nitrogen (N) to the mix, which is typical of hyper proteic diets [18]. Since it has low fat content (4.2% of calories) [18], far below the recommended limits for children and adolescents (25-35% of

calories) [19], foods made with the mix can be enriched with additional fat, adding extra calories to the preparations as much as needed.

Concerning the AA score, of paramount importance in children's diets, the mix resulting scores were similar to the traditional beans and rice mixture, and superior to the scores found in wheat flour and rice flour alone (Table 2). Despite the relatively low TD in the mix, the PDCAAS, which is recommended [14] for protein quality classification, was far superior to the PDCAAS presented by wheat flour and rice flour, but similar to the PDCAAS of the beans and rice mixture. Thus, like the beans and rice mixture, the protein requirements and the CPI for the mix were the same. For wheat flour and rice flour, however, the protein amount needed to meet the requirements was 2.3 and 1.6 times higher, respectively. Then, 56% ( $1.3\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) of proteins derived from wheat flour and 36% ( $0.6\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) of rice flour proteins would be considered excessive, causing unnecessary costs, and might lead to renal overload and fat synthesis.

Adding to this, the weight of mix required for the daily AA and protein requirements contemplation is 4-5 times lower than the amount of the other foods cited as comparative references. This fact is crucial in nutritional interventions aimed at children, since the food supplemented volume determines not only the acceptance, but its cost. Of the eight tested formulations, all the sweet preparations were accepted (Table 3). However, only one salt preparation (pasta with tomato sauce) was approved. These results demonstrated the studied children group preference for sweet preparations (97% approval) in relation to salt preparations (76% approval). It means that the food type to be supplemented in nutritional strategies aimed at children is of remarkable importance.

In table 4, we see the experimental foods nutritional profile (fiber, carbohydrates, proteins and lipids) which were approved by the students. These foods contained 5 to 6% of dietary fiber (being 50% of the insoluble fraction) that represents around 15-20% of the needs for children 4-13 years [20]. The lipid content was within the recommended limits for the age range [20]. Two foods (honey and vanilla muffins) showed a higher percentage of carbohydrates than recommended, but this fact has to do with the low concentration of fat in them. According to Torun et al [21], "the protein/energy ratio (P/E ratio) is often used to describe the diet protein quality. It is usually expressed as the protein energy percentage in the diet, that is, the ratio of protein energy to total dietary energy, where 1 g protein provides 4 kcal. The P/E ratio most important application is to evaluate if a diet has a dietary protein proportion that may prevent protein deficiency. To suggest P/E ratios that may be universally applied to heterogeneous populations diets of different geographic and socioeconomic

backgrounds, it is better to overestimate the protein proportion that the diet should have, than to risk suggesting a P/E ratio that may be too low for some populations.

This way, the safe lower limits suggested for P/E ratios for any diet consumed by the general population and for high protein digestibility diets should be 12% and 10%, respectively. As for protein content, all foods were within the recommended values (10-30% of total calories) [20]. Besides the diet protein content, the AA balance is also important in defining the protein supplied quality and, consequently, the protein synthesis [17]. The chemical analysis of the experimental diets formulated with the mix (Table 5) showed that all of them had an AA score that fulfill the pediatric group recommendations (> 100% of adequacy to AA score of reference) [14]. On the other hand, if they had been formulated with the usual flours (wheat or corn flours), the percentage of adequacy of the AA score to the AA score of reference would have been 75% or lower. Moreover, in three of the preparations made with the usual flours, lysine was the limiting AA leading to a very low AA score (around 50%). Thus, we can assume that only half of the AA ingested through food products made with the usual flours would be metabolically available for protein synthesis. Consequently, the remaining AA would be considered excessive and, then, diverted to oxidation. This fact would result in lower nutritional anabolic effects and nutrient losses.

Finally, the costs of the experimental diets were evaluated and compared to the values of the same formulations if they had been prepared with the original flours. The median price of the experimental foods was US\$ 41.15 (US\$ 35.50 – 68.50) / 1,000 units when they were made using the mix. When they were made with the regular flours, the median price was US\$ 54.15 (US\$ 45.00 – 79.30) / 1,000 units. There was an average reduction of 18% in experimental diets cost. For the vanilla muffin formulation, the cost was 24% lower. These findings are of relevance when the goal is government's programs against hunger and malnutrition, especially in less developed countries.

In conclusion, the use of alternative food in nutritional programs is widely applied by many countries, especially by those with large proportion of the child population living in food insecurity. Alimentary formulations considered well accepted by the pediatric age group, with appropriate P/E ratio and AA balance are to be desired. In this study, it was possible to demonstrate that the proper combination of soy protein concentrate and broken rice flours can originate a mix with high protein content and adequate AA profile. Furthermore, we showed that the mix obtained can be used in low price nutritious muffins which were also very well accepted by the selected group of children.



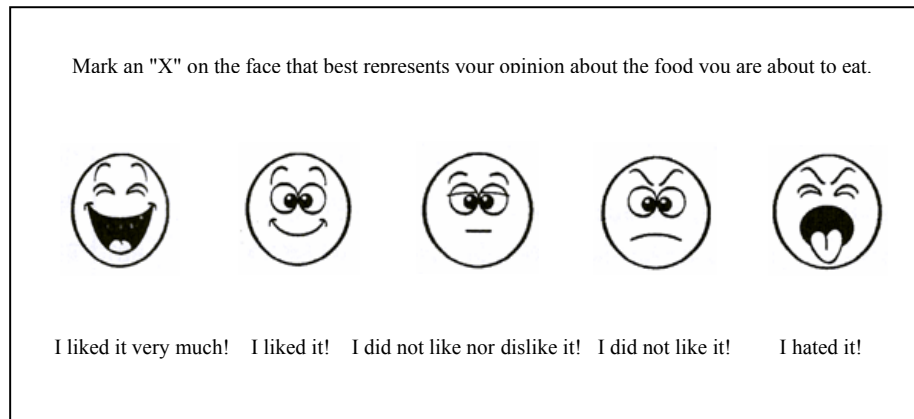


Figure1. Facial hedonic scale used in the sensory acceptability tests.

Table 1. Chemical composition of the mix.

Chemical composition		Mix (1:3)
Macronutrients (g.100g <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	Protein	19.5
	Fat	1.6
	Total fiber	6.8
	Carbohydrates	62.0
Amino acids <sup>2</sup>	Score (%) <sup>3</sup>	118
Caloric density <sup>4</sup>	Kcal.100g <sup>-1</sup>	340.4
	NPC:N ratio <sup>5</sup>	84.1

<sup>1</sup>(the values used in the calculations for the SPC: were based on the average values reported by the industry; for the BR: were based on the values published by the USDA National Nutrient Database for Standard Reference; all macronutrients in SPC and BR were confirmed by measurements using the techniques recommended by AOAC)

<sup>2</sup>(based on the average values reported by industry for the SPC, or contained in the USDA National Nutrient Database for Standard Reference, for BR)

<sup>3</sup>(as WHO/2007, for children 3-10 years)[14]

<sup>4</sup>(4 kcal.g<sup>-1</sup> carbohydrate or protein, and 9 kcal.g<sup>-1</sup> lipid; N g = 6.25.g<sup>-1</sup> protein)

<sup>5</sup>(Non-protein calories / g nitrogen)

Table 2. Characteristics of the protein in the mix and the daily weight of the mix to fulfill 100% of the AA requirements in relation to other usual sources of food proteins here used as comparative references.

Protein sources	Characteristics of protein					Daily
	Protein	AAS	TD	PDCAAS	CPI	weight
	(g.100g <sup>-1</sup> )	(%)	(%)	(%)	(g.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	(g.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
Mix	19.5	118	94	100	1.0	5.1
Wheat flour	10.3*	46*	96	44	2.3	22.3
Rice flour	6.0*	73*	88	64	1.6	26.7
Rice & beans (2:1)	4.5*	119*	97	100	1.0	22.2

(AAS - amino acid score, considering 100% the values for children 3-10 years according to WHO/2007; TD - True Protein Digestibility, according to WHO 1985; PDCAAS - Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score = AAS x TD; CPI - Corrected Protein Intake = requirements (g.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) ÷ PDCAAS; daily weight - amount of mix to fulfill the recommendations of 1 g.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> for children 4-13 years according to RDA - DRI 2002/2005)

\*(according to USDA National Nutrient Database for Standard Reference )

Table 3. Acceptance of the experimental diets according to the sensory acceptability tests.

Experimental diets	Acceptability tests		
	Acceptance	Rejection	Number of test
	N (%)	N (%)	N (%)
Vegetable pie	48 (67)	24 (33)	72 (100)
Vanilla muffin	35 (97)	1 (3)	36 (100)
Chocolate muffin	34 (94)	2 (6)	36 (100)
Polenta with ground beef	26 (84)	5 (16)	31 (100)
Corn muffin	39 (91)	4 (9)	43 (100)
Carrot muffin	73 (100)	0 (0)	73 (100)
Pasta with tomato sauce	36 (86)	6 (14)	42 (100)
Honey muffin	55 (100)	0 (0)	55 (100)

Salt foods	110 (76)	35 (24)	145 (100)
Sweet foods (muffins)	236 (97)	7(3)	243 (100)
Total	346 (89)	42 (11)	388 (100)

(Acceptance = "I liked it very much" or "I liked it"; Rejection = "I did not like nor dislike it", "I did not like it" or "I hated it")

(N = number of panelists)

Table 4. Chemical analysis and caloric density of the experimental diets.

Diets (muffins)	Chemical composition (g.100g <sup>-1</sup> )									Caloric distribution (%)		
	CH	Prot	Fat	TF	IF	SF	As	Mo	DM	CH	Prot	Fat
Honey	47.6	8.5	3.9	5.6	3.7	1.9	1.6	32.8	67.2	73.4	13.1	13.5
Chocolate	40.3	7.5	6.1	5.8	2.3	3.4	1.7	38.7	61.3	65.6	12.2	22.2
Vanilla	43.6	8.6	3.2	4.8	1.7	3.1	1.6	38.1	61.9	73.4	14.5	12.2
Carrot	39.2	7.6	10.8	5.6	3.6	1.9	1.6	35.3	64.7	55.1	10.7	34.2
Corn	41.0	7.2	9.0	5.3	2.4	2.9	1.4	36.1	63.9	59.9	10.5	29.6
Mean	41.0	7.6	6.1	5.6	2.4	2.9	1.6	36.1	63.9	65.6	12.2	22.2
SD*	3.4	0.6	3.3	0.4	0.9	0.7	0.1	2.4	2.4	8.1	1.7	9.7

(CH - carbohydrates; Prot - protein, TF - total fiber, IF - insoluble fiber; SF - soluble fiber; As - ashes; Mo - moisture, DM - dry matter).

\*Standard deviation

Table 5. Percentage of AA score adequacy of the diets in relation to the reference AA score, depending on the type of recipe used.

		Indispensable AA								
		<i>Phe+Tyr</i>	<i>His</i>	<i>Ile</i>	<i>Leu</i>	<i>Lys</i>	<i>Met+Cys</i>	<i>Thr</i>	<i>Trp</i>	<i>Val</i>
Diets (muffins)		41 <sup>1</sup>	16 <sup>1</sup>	31 <sup>1</sup>	61 <sup>1</sup>	48 <sup>1</sup>	24 <sup>1</sup>	25 <sup>1</sup>	6.6 <sup>1</sup>	40 <sup>1</sup>
Honey	Mix	229	165	148	135	124	138	161	178	126
	Wheat flour	205	145	129	123	71	159	124	192	114
Chocolate	Mix	228	164	143	132	119	137	159	174	121
	Wheat flour	197	139	113	113	48	163	110	187	102
Vanilla	Mix	229	165	150	136	125	138	162	179	127
	Wheat flour	206	146	132	124	75	158	126	193	117
Carrot	Mix	228	164	143	132	119	137	158	174	121
	Wheat flour	197	139	112	113	48	163	110	187	102
Corn	Mix <sup>2</sup>	226	170	136	148	105	143	156	158	122
	Corn flour	205	158	113	144	51	163	124	158	110

<sup>1</sup> Reference AA score – WHO/2007 for children 3-10 years

<sup>2</sup> 55% mix + 45% corn flour

## References

1. FAO. The State of Food Insecurity in the World - Addressing food insecurity in protracted crises (2010). <<http://www.fao.org/docrep/013/i1683e/i1683e.pdf>>. Access: Nov, 2012.
2. Wang TC, Fuller MF (1989) The optimum dietary amino acid pattern for growing pigs. 1. Experiments by amino acid deletion. Br J Nutr 62:77-89.
3. Schaafsma G (2000) The protein digestibility-corrected amino acid score. J Nutr 130: 1865S-7S.
4. Young VR, Pellett PL (1994) Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. Am J Clin Nutr 59:1203S-1212S.
5. Leff B, Ramankutty N, Foley JA (2004) Geographic distribution of major crops across the world. Global Biogeochem Cy 18:1-27.

6. Calderano AA et al (2010) Chemical and energetic composition of feedstuffs of plant origin for poultry at different ages. *R Bras Zootec* 39:320-326.
7. Bonazzil C, du Peuty MA, Themelin A (1997) Influence of Drying Conditions on the Processing Quality of Rough Rice. *Dry Technol* 15:1141-1157.
8. Guimarães IG, Pezzato LE, Barros MM, Tachibana L (2008) Nutrient Digestibility of Cereal Grain Products and By-products in Extruded Diets for Nile Tilapia. *J World Aquacult Soc* 39: 781-789.
9. Rao SV, Reddy MR, Prarharaj NK, Sunder GS (2000) Laying Performance of Broiler Breeder Chickens Fed Various Millets or Broken Rice as a Source of Energy at a Constant Nutrient Intake. *Trop Anim Health Prod* 32:329-338.
10. Muntz K et al (1998) Genetic engineering for high methionine grain legumes. *Nahrung* 42:125-7.
11. Hegsted DM, Juliano BO (1974) Difficulties in assessing the nutritional quality of rice protein. *J Nutr* 104:772-81.
12. Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1995) Official methods of analysis. 16th edn. Arlington, Virginia, USA, p. 1025.
13. FAO (2003) Food energy – methods of analysis and conversion factors. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations (ed) FAO - Food and Nutrition Paper 77 - Report of a technical workshop, Rome, 3-6 December 2002. Rome, Italy, p 93.
14. WHO/FAO/UNU (2007) Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, p. 1-284.
15. Brasil (2009) Resolução/CD/FNDE n. 38, 16 de julho de 2009, Ministério da Educação: Brasília, p. 1-63.
16. U.S. Department of Agriculture ARS. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23, 2010. <[http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq\\_no\\_115=257886](http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=257886)>. Access: Oct, 2010.
17. Pencharz P, Elango R (2008) Protein. In: Koletzko B (ed) *Pediatric Nutrition in Practice*, S. Karger AG: Basel, p. 37-41.
18. De Luis D, Aller R, Izaola O (2006) Algoritmo de utilización de fórmulas de nutrición enteral. *Endocrinol Nutr* 53:290-295.
19. Gidding SS et al (2005) Dietary recommendations for children and adolescents: a guide for practitioners: consensus statement from the American Heart Association. *Circulation* 112:2061-75.

20. Dietary Reference Intakes – DRIs (2002/2005) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies. <<http://fnic.nal.usda.gov/dietary-guidance/dietary-reference-intakes/dri-tables>>.Access: Oct, 2009.

21. Torun B et al (1991) Dietary protein energy ratios for various ages and physiological, in Protein-Energy Interactions - Proceedings of Meeting of International Dietary Energy Consultative Group of United Nations, IDECG (ed): Waterville Valley, NH, USA, p. 437.

### 2.3. Estudo científico 3

## **Nutritional effects of foods made with agro industrial by-products and containing adequate amino acid score on fat mass and fat-free mass of children**

(Artigo a ser submetido)

Ivo Roberto Dorneles Prola<sup>1</sup>, Leila Picolli da Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Santa Maria. Av. Roraima n.1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

Corresponding Author:

(\*) Dr. Ivo Roberto Dorneles Prola

Departamento de Pediatria

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil.

Phone: 55 –3220-8520

Fax: 55 (55) 3220-8520

E-mail: [iprolla@gmail.com](mailto:iprolla@gmail.com)

### **Abstract**

The search for adequate alternative protein sources to feed people is an actual need. In this study we demonstrated that the use of low cost agro industrial by-products as soy protein

concentrate and broken rice in the formulation of alternative foods for children is possible. For the formulation of the experimental foods, besides the energy and protein contents, the amino acid balance was of main concern. Then, the 1:3 ratio of soy protein concentrate and broken rice originated a mix with high protein content and adequate amino acid score. The foods produced with the mix were widely accepted (acceptance = 97%) for consumption by the group of children studied and provided up to 23% of the caloric and amino acid requirements for a child. Using the sensitive technique of bioelectrical impedance analysis for nutritional assessment, it was possible to detect the effects of these foods on body composition of the participating children as significant increase in fat-free mass and reduction in fat mass, especially among the children with nutritional problems.

Keywords: food supplement, broken rice, soybean protein concentrate, by-products, amino acid balance.

## **Introduction**

It is estimated that 847 millions of people around the world are undernourished, i.e., nearly a billion people remain hungry (1). The use of alternative foods that may be widely distributed to populations in need is considered a promising strategy to alleviate the hunger in the world. In this sense, foods made with regional alternative products have been tried in different programs against hunger, despite some criticism about them (2, 3, 4). When the target population in need consists of growing children, whose nutritional requirements are high, the type of food to be consumed must be based not only on low-cost palatable products, but also on the nutritional profile of the foods provided (5).

Besides the protein-energy ratio, the amino acid (AA) balance (or score) of the protein supplied is extremely important for growing children (5). The ideal protein has to provide the exact amount of each indispensable AA in order to fulfill the absolute AA requirements for growth and body protein accretion (6). However, good nutritional quality protein sources are usually of animal origin (5) and, then, expensive. This fact prevents its wide use to feed the poor in many countries (5). However, the appropriate combination of two different vegetable protein sources can originate a third one with a better nutritional profile than their precursors, and closer to that presented by the proteins considered ideal (7). For example, the rice and bean mixture. The problem is the amount of the vegetable protein sources needed to fulfill the nutritional requirements, especially to make up proteins and amino acids demands. Thus, the

search for alternative vegetable protein sources that, when combined in small amounts originate a mixture with high content of protein with adequate AA profile, would be desirable.

In this context, rice (*Oryza sativa*) and soybean (*Glycine max* Merr.) crops are widely cultivated in many places of the world (8) and their by-products, broken rice and soy protein concentrate, are of low cost but of high nutritional value. Broken rice originates during the processing of polished white rice (9). It is rejected for human consumption, but retains its nutritional properties as excellent source of carbohydrates, energy and AA score (10). The soybean protein concentrate comes from the processing of soybean oilseed industry, and has a high protein concentration (10).

Like all cereal grains, rice has lysine as the limiting AA (5, 11). Soybean, meanwhile, is deficient in sulfur amino acids (5, 12). However, the association of those two by-products may originate a mix with high protein content and AA profile similar to ideal proteins. Moreover, this mix might be tested in different recipes of foods usually well accepted by children, and positively influence their body growth.

Based on that, the aim of this study was to investigate the effect of alternative foods made with a mix of broken rice and soybean protein concentrate, on fat mass and fat-free mass of children living in food insecurity.

## **Material and methods**

### **Study design**

It was a longitudinal study where each subject from the pre-intervention phase served as its own control during the intervention period. It was conducted in a public school in the city of Santa Maria, RS, Brazil, which serves children from a nearby underprivileged community with poor sanitation conditions (no sewer or safe piped water). The community is primarily composed by families whose incomes arise from trash collecting activities and Family Grant Program of the Federal Government. For the majority of the students from this low income community, the lunch provided by the school is the main or the only meal of the day. This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil (Protocol No.: 23081.004360/2009-70; CAAE: 0052.0.243.000-09), and school authorities.



## **Study population**

The study population consisted of children from 6 to 11 years old, enrolled in the 1st, 2nd or 3rd year of elementary school. The sample was formed by the students who responded to the written and spoken invitation. The students who voluntarily decided to take place in the study needed to have the “Informed Consent” signed by their parents or guardians. Children older than 7 years had to sign the “Express Consent”, also. Students with positive history of chronic degenerative diseases (diabetes, kidney failure, liver diseases) or edema), or allergy to soy protein products were considered ineligible for the study. Children with class attendance below 80% of the intervention days and children who skipped any of the nutritional assessments were also excluded.

## **Phases of the study**

The study was carried out in two phases. In phase I (or pre-intervention phase) children were subjected to the first (at the beginning) and second (253 days later) nutritional assessments (NA). No nutritional intervention was performed during that time. The phase II (or intervention phase) started soon after the second NA, and was extended up to the third NA (98 days later). During this phase, 56 days were considered school days and 52 of them were used for the nutritional intervention.

## **Nutritional Assessments (NA)**

The participating children were subjected to three NAs. Each NA comprised the collecting of anthropometric and bioelectrical impedance measurements. The NAs were performed at 3 different moments: at the beginning and end of phase I, and at the end of phase II. Body weight was measured to the nearest 0.1 kg using a calibrated electronic scale (Model EB710, Glicomed®). The standing height was measured to the nearest 0.5 cm, using the attached stadiometer. The child was measured barefoot and with as little clothing as possible. Based on these measurements, the body mass index (BMI,  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ) and the respective Z score were evaluated according to the program provided by World Health Organization - WHO Anthro Plus (13).

The nutritional classification was based on BMI Z-Score calculated with the data obtained from the second NA. The criteria adopted were: “underweight” ( $Z < -1$ ), “normal weight” ( $-1 \leq Z \leq +1$ ), “overweight” ( $Z > +1$ ) (14).

Tricipital skin fold (TSF, mm) was obtained at the midpoint of the distance between the acromion and the olecranon of the right arm using a caliper (Cescorf®, accuracy of 0.1 mm). Sub scapular skin fold (SSSF, mm) was obtained 2 cm below the angle of the right scapula, between this site and the spine. Based on these skin fold thickness values, the muscular body mass (MBM, kg) was calculated using the formulas recommended by Slaughter et al (15).

Impedance measurements were conducted in all subjects (Quantum II, RJL Systems Inc., 800- $\mu$ A and 50-kHz) at the right side of the body, with standard tetrapolar placement of the electrodes on the hand and foot, following the method recommended by the manufacturer. The average of two measurements were obtained for resistance ( $R, \Omega$ ) and reactance ( $X_c, \Omega$ ) with the body in the supine position on a nonconductive surface, before the lunch time, and with the bladder completely empty. The  $R$  and  $X_c$  values were used to calculate the fat free mass (FFM) using the formula recommended by De Lorenzo et al. (1998) for children from 7 to 13 years old (16):  $FFM = 2.330 + 0.588 \cdot ZI (\text{cm}^2/\Omega) + 0.211 \cdot \text{Weight (kg)}$ , being  $ZI$  (impedance index,  $\text{cm}^2/\Omega$ ) =  $\text{height}^2/R$ . Fat mass (FM) was obtained by subtracting FFM from the weight.

Each group of parameters (weight and height; TSF and SSSF;  $R$  and  $X_c$  measurements) was collected by the same trained people.

### **Development of the "mix" and food formulations**

We developed a mixture of soybean protein concentrate flour (SPC; Imcopa Industry, Import and Trade Paraná - Araucaria / PR) and broken rice flour (BR; Marzari Food, Santa Maria - RS). The average AA content present in the SPC flour (information provided by the manufacturer) and BR flour ("USDA National Nutrient Database for Standard Reference") (17) were compared to the AA score for children from 3 to 10 years old (assumed as the reference AA score in this study). This age range presents the highest AA requirements recommended by WHO (2007) (18). Then, it can be extrapolated to boys and girls aged from 10 to 18 years, as well as for adults, who have smaller AA requirements. Different ratios between the SPC flour and BR flour were tested, aiming at achieving the best AA profile in

comparison to the reference score. Since the SPC's price was higher than the BR flour's, and the taste of soy is very peculiar, the proportion of SPC in the mixture was desired to be as low as possible. Then, the mixture obtained was tested in different recipes of muffins, being the mix used to totally or partially replace the flours usually used in the recipes.

### **Sensory tests of acceptability**

Each experimental formulation (muffin) were subjected to sensory analysis by the group of participating children through Sensory Tests of Acceptability (STA). These were held in the cafeteria of the school, using an adaptation of the Hedonic Facial Scale recommended by the Brazilian National School Feeding Program - BNSFP (19). The formulation was considered "accepted" when reached an acceptability index of at least 85%.

### **Experimental foods**

The experimental foods (muffins) were assessed concerning their macronutrient content (according to the official methods of analysis recommended by the AOAC: crude protein, method 960.52, conversion factor: 6.25; total fiber, method 985.29; lipids, method 920.39 with acid hydrolysis; ash, method 923.03; and moisture, method 925.10) (20). The carbohydrate content was obtained by difference ( $100 - (\text{protein} + \text{fat} + \text{total fiber} + \text{ash} + \text{moisture})$ ). Besides, the muffins were also assessed to determine the indispensable amino acid profile (High Performance Liquid Chromatography – HPLC).

### **Intervention Period**

The intervention period (52 days) took place during phase II. In this period the experimental foods (muffins) were provided to children, to supplement the school meals. Therefore, at the end of each school turn and immediately before leaving the classroom (5 p.m.), each participating student received one unit of the experimental food which was previously scheduled for the day. The experimental foods were offered in rotation and served as individual 50 g unit of muffin per day five times a week. During phase II, adherence

(presence at school and full consumption of the food provided) of each individual student to the research was observed. In other words, each subject had to attend at least 80% of the intervention days and eat the entire 50 g muffin provided in order to continue in the study.

### **Statistical Analysis**

SPSS version 13.0 was used for the statistical analysis. The values of each parameter were transformed into values that represented the average gain or average loss of the same parameter in 30 days as follows: average gain or average loss = (value ÷ number of days in the corresponding phase) x 30 days. Then, the rates of gain or loss were expressed as: weight: g.30 days<sup>-1</sup>; height: cm.30 days<sup>-1</sup>; body mass index: kg.m<sup>-2</sup>.30 days<sup>-1</sup>; muscular body mass, fat free mass and fat mass: g.30 days<sup>-1</sup>. The data were compared by nonparametric Wilcoxon test. The results were expressed as median followed by the first (Q1) and third (Q3) quartile between brackets. The difference was considered significant when  $P < 0.05$ .

### **Results and discussion**

Sixty one out of 72 students signed the informed consent form to take part in the study. Fifty nine of them underwent the first nutritional assessment (NA) (beginning of phase I) and participated in the sensory tests of acceptability of the experimental foods. Forty four out of 59 students completed phase I and entered phase II. Among them, 42 students completed phase II. Consequently, only 2 (4.5%) children who entered phase II (when the nutritional intervention was actually performed) were excluded from the study: 1 boy who moved from the local school and 1 girl who did not attend to the third NA. The low dropout rate found in this study possibly occurred due to the interest of the children to receive another portion of food before leaving school. Moreover, this finding reinforced the results of the study.

The majority of the participating students were Caucasian (67%) and 57% were boys (Table 1). The average age was similar in both genders at the time of the nutritional assessments. According to the nutritional diagnosis at the beginning of phase II, high prevalences of underweight and overweight were observed, being overweight more prevalent among girls (33%) (Table 1). This interesting finding is also observed in other countries, i.e.,

both extremes of nutritional deviations being found among children from low income populations (21).

Based on the average content of each essential AA in the by-products, the 1:3 ratio of SPC and BR flours was defined as the best ratio and showed the highest AA score (118%) in comparison to the reference score (18). Concerning the macronutrients, the mix obtained showed high protein content ( $19.5 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), high fiber content ( $6.8 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), low fat levels ( $1.6 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), and  $62 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  of carbohydrates (mainly rice starch). Moreover, the mix was gluten-free, lactose-free, and saturated fat-free. Then, it can be used by people with restrictions to these nutrients. Each 50 g muffin provided between 3.6 to 4.3 g of protein. It means that the experimental foods provided around 19-23% of the daily requirements of 19 g of protein for children from 8 to 9 years old, and around 11-13% of the daily requirements of 34 g of protein for children from 9 to 13 years old (22).

Since sweet foods are usually well accepted by children (23), the mix was tested in five formulations of muffins with different flavors (vanilla, chocolate, corn, carrot and honey). All preparations underwent sensory tests of acceptability, getting 91% or more of approval by the group of children. All units of muffins provided during phase II were completely eaten and no rejection was observed.

Regarding the AA score, all indispensable AA present in the experimental foods ranged from 105% (Lys) to 229% (Phe + Tyr) of the reference score (18) (table 2). The percentage of adequacy for Phe+Tyr was initially thought to be high: 229%. However, when we compared the AA score of the egg protein (17) with the AA score assumed as the reference score in this study (18), we also found high percentages of adequacy which ranged from 142 to 229%, similar to the percentages of adequacy of the AA scores showed by the experimental foods.

In accordance with dietary recommendations for children, the caloric distribution among the macronutrients was also adequate, with 10 to 14.5% of the calories coming from the protein fraction, and no more than 34% coming from fat (Table 2) (22). Concerning the protein content, we can consider the diets as in the normal (<12% of total calories) to medium (12 to 25% of total calories) range. No experimental food had high protein content (>25% of total calories) (24).

Different methods can be used to assess the nutritional profile of children, mainly the fat-free mass (FFM) compartment (25). In this study, two different and validated methods were used to ensure the detection of any change in this compartment. The first method used was the assessment of the body muscularity (muscular body mass, MBM) based on 2

skinfold-thickness measurements. This anthropometric method can be recommended as a simple method to determine the nutritional status during growth (26). The second method used was the bioelectrical impedance analysis (BIA) measurement. This method has the advantage of determining changes in body composition with significantly greater precision than anthropometry alone, mainly during refeeding (27, 28). Since there is no validated formula to determine FFM for the Brazilian children, the formula here used to assess the FFM was proposed by De Lorenzo et al. (16). In this formula, the impedance index (ZI) and weight are the strongest predictors of the FFM, and data related to race, gender or age has no contribution to the results.

The participating students showed significant increase in weight gain and BMI gain during phase II when compared to phase I (Table 3). Moreover, they showed significant increase in lean body mass (accessed by MBM and FFM), and reduction in body fat (FM). We did not observe changes in height gain between phases, probably due to the short period of time between the last two NA.

When the effects of the experimental foods according to the gender were assessed (table 4), the boys showed significant increase in FFM and reduction in FM, but no differences in weight gain or BMI gain. Then, it is possible to infer that they went through a reversal of their body composition profile previously acquired, keeping the proportion between the FM lost and FFM gained. The girls also presented significant increase in FFM gain and decrease in FM. However, differently from the boys, they presented a significant increase in weight gain. When comparing these changes found in boys and girls, it was observed that the reduction in FM was similar between them. On the other hand, the gain in FFM among girls was almost 40% higher than that among boys. Perhaps, the inversion in body composition among the overweight girls has influenced the outstanding increment in their lean body mass.

According to the nutritional status (table 5), the underweight students presented an increase in their weight gain higher than 100% ( $P \geq 0.05$ ) along with a substantial increment in BMI gain ( $P=0.05$ ) during phase II. Since these students showed important increase in their FFM (241%) and reduction in FM, it can be inferred that the changes in weight and BMI were exclusively related to the changes in their lean body mass compartment. Despite the amazing effects of the experimental foods on the underweight children, the reduced number of students in this group ( $n = 6$ ) might have affected the significance of the results.

Among the nutritionally normal children we observed significant increments in the rate of FFM gain (144%) and significant reduction in FM during phase II in comparison to the respective rates in phase I.

Concerning the overweight children, we observed significant increase in the rate of FFM gain with remarkable reduction in FM. Moreover, it was observed that the increase in the rate of FFM gain in this group as well as the rate of FM loss were far bigger than in the group of children with normal weight (1.4 times higher and 1.8 times lower, respectively). However, neither change did influence the weight gain and BMI gain observed previously, demonstrating a striking tendency towards the reversal of their body composition.

In regards to FFM gain, it was possible to see that the underweight and overweight children showed the highest increments. In relation to FM, the overweight children exhibited the highest FM loss. These positive changes in body composition, mainly among children with nutritional deviations still need appropriate explanation.

Some studies have tried to demonstrate the effects of different levels of protein and calories in the diet on body composition. In children, for example, it seems that high protein/low glycemic index diets protect against obesity (29). The effects are thought to be related to the sustained decrease in appetite and *ad libitum* caloric intake, as well as the increase in thermogenesis induced by high-protein diets in comparison to diets with lower protein content (24, 30). However, despite these positive effects, some data about the effectiveness of high protein diets on weight loss among overweight and obese children do not show the same results (31). In our study, none of the experimental foods were considered high protein diet. Then, the reduction in FM cannot be attributed to the protein level.

Another possibility for the fat lowering effect of some diets is stated to be related to the type of dietary protein present. In animals, for example, it's been demonstrated that rats fed with soy protein isolated-cornstarch diet show lower fat gains compared with animals fed with other protein and carbohydrate combinations. These effects on body fat gain were presumed to be related to reductions in energy intake and in plasma glucose concentrations determined by the soy protein fraction (32). Moreover, the antiobesity property of soybeans is also attributed to the isoflavone content. Soy isoflavones have been shown to decrease fat accumulation in certain fat depots in some animal models of obesity (33, 34, 35). Since soy protein concentrate (ingredient of the mix) has high levels of isoflavones (36), it is thus possible that the reduction in FM shown in this study was partially related to isoflavones consumed in the experimental foods.

Concerning the changes in the FFM compartment, the relation between FFM increment and AA balance in the diet has long been known. Children fed cereal-based diets with limiting amino acids would present lower growth rate than children fed diets with adequate AA balance (37). In animals, the concept of ideal protein is very well established

(38). In this sense, even low protein diets with adequate amino acid balance are as effective in improving body weight and FFM as normal protein diets (39). In our study, the participating children had the daily school meals supplemented by a small portion of muffin with only 11 to 23% of their protein and AA requirements. However, all the AA in the experimental foods were made to meet the AA score of reference (18), following the concept of the ideal protein, i.e., in balance. The effects of this intervention resulted in increments of FFM similar to the findings in animals. Then, we assumed that the FFM increments demonstrated in our study had to do with the provision of adequate amounts of indispensable AA by the experimental diets.

In summary, the results above presented showed the nutritional effects of alternative foods made with a mix of two by-products on FFM and FM of scholar children of both gender and different nutritional status. The experimental diets were well accepted and presented adequate protein-energy ratio and amino acid profile. The effectiveness in improving the body composition of the participating children was significant, even with the alternative foods being provided for a short period of time and as a small percentage of the daily protein needs.

Table 1. Characteristics of the children studied.

Characteristics		All children	Boys	Girls
		N=42 (100%)	N=24 (57.1%)	N=18 (42.9%)
Race	Caucasians	28 (66.7%)	15 (62.5%)	13 (72.2%)
	Black	14 (33.3%)	9 (37.5%)	5 (27.8%)
Age (years) at NA*	1st NA	8.0 ± 1.0 (6.3 – 11.2)	8.1 ± 1.1 (6.3 – 11.2)	7.9 ± 0.9 (6.3 – 9.6)
	2nd NA	8.7 ± 1.0 (7.1 – 11.9)	8.8 ± 1.0 (7.1 – 11.9)	8.6 ± 0.9 (7.1 – 10.3)
	3rd NA	9.0 ± 1.0 (7.3 – 12.2)	9.1 ± 1.0 (7.3 – 12.2)	8.9 ± 0.9 (7.3 – 10.6)
Diagnosis at 2nd NA	Underweight	6 (14.3%)	3 (12.5%)	3 (16.7%)
	Normal	27 (64.3%)	18 (75%)	9 (50%)
	Overweight	9 (21.4%)	3 (12.5%)	6 (33.3%)

N = number; NA = nutritional assessment.

\*The values are expressed as mean ± standard deviation. Values in parentheses = range.



Table 2. Percentage of adequacy of amino acid score in relation to the AAS of reference and caloric distribution of macronutrients in the experimental foods.

Experimental foods	Amino Acid Score of Reference <sup>1</sup>									Caloric distribution		
	<i>Phe + Tyr</i>	<i>His</i>	<i>Ile</i>	<i>Leu</i>	<i>Lys</i>	<i>Met + Cys</i>	<i>Thr</i>	<i>Trp</i>	<i>Val</i>	% of total calories		
	41	16	31	61	48	24	25	6,6	40	CH	Prot	Fat
Honey muffin	229	165	148	135	124	138	161	178	126	73.4	13.1	13.5
Chocolate muffin	228	164	143	132	119	137	159	174	121	65.6	12.2	22.2
Vanilla muffin	229	165	150	136	125	138	162	179	127	73.4	14.5	12.2
Carrot muffin	228	164	143	132	119	137	158	174	121	55.1	10.7	34.2
Corn muffin <sup>2</sup>	226	170	136	148	105	143	156	158	122	59.9	10.5	29.6
<i>Mean</i>	228	166	144	137	118	139	159	173	123	65.6	12.2	22.2
<i>SD</i> <sup>3</sup>	1.22	2.51	5.43	6.62	7.99	2.51	2.39	8.47	2.88	8.1	1.7	9.7
<i>Minimum</i>	226	164	136	132	105	137	156	158	121	55.1	10.5	12.2
<i>Maximum</i>	229	170	150	148	125	143	162	179	127	73.4	14.5	34.2

<sup>1</sup> Reference AA score for children 3-10 years old; WHO/2007 (18).

<sup>2</sup> 55% mix + 45% corn flour.

<sup>3</sup> Standard deviation

CH, carbohydrate; Prot, protein.

Table 3. Effects of the experimental diets on anthropometry and bioimpedance parameters.

Parameters	Phase I (N=42)	Phase II (N=42)	<i>P</i>
<i>Anthropometry</i>			
Weight (g.30 d <sup>-1</sup> )	300 (150 – 360)	360 (220 – 670)	0.01
Height (cm.30 d <sup>-1</sup> )	0.47 (0.42 – 0.59)	0.46 (0.31 – 0.61)	NS
BMI	0.02 (-0.02 – 0.07)	0.10 (0.02 – 0.25)	0.01
MBM (g.30 d <sup>-1</sup> )	240 (160 – 310)	310 (200 – 480)	0.01
<i>Bioimpedance</i>			
FFM (g.30 d <sup>-1</sup> )	250 (180 – 330)	620 (500 – 830)	0.001
FM (g.30 d <sup>-1</sup> )	20 (-40 – 70)	-250 (-370 – -100)	0.001

Phase I = pre-intervention period; Phase II = intervention period.

N = number; BMI = body mass index, kg.m<sup>-2</sup>; MBM = muscular body mass; FFM = fat-free mass; FM = fat mass; NS = not significant.

The values are expressed as median (Q1– Q3) and represent the increase or decrease in the parameter evaluated during 30 days.

Table 4. Effects of the experimental diets on the variation of anthropometry and bioimpedance parameters according to gender.

Parameter	Boys (N=24)			Girls (N=18)		
	Phase I	Phase II	P	Phase I	Phase II	P
<i>Anthropometry</i>						
Weight (g.30 d <sup>-1</sup> )	300 (170 – 370)	330 (220 – 590)	NS	290 (150 – 350)	430 (220 – 730)	0.01
BMI	0.04 (0.00 – 0.08)	0.10 (0.03 – 0.24)	NS	0.02 (-0.02 – 0.05)	0.10 (0.00 – 0.25)	NS
MBM (g.30 d <sup>-1</sup> )	240 (180 – 320)	300 (180 – 460)	NS	190 (120 – 280)	310 (260 – 590)	0.02
<i>Bioimpedance</i>						
FFM (g.30 d <sup>-1</sup> )	280 (190 – 380)	610 (520 – 810)	0.001	210 (110 – 280)	670 (470 – 850)	0.001
FM (g.30 d <sup>-1</sup> )	-10 (-80 – 60)	-260 (-370 – -100)	0.001	0.04 (-0.01 – 0.08)	-240 (-370 – -90)	0.001

Phase I = pre-intervention period; Phase II = intervention period.

N = number; BMI = body mass index, kg.m<sup>-2</sup>; MBM = muscular body mass; FFM = fat-free mass; FM = fat mass; NS = not significant.

The values are expressed as median (Q1– Q3) and represent the increase or decrease in the parameter evaluated during 30 days.

Table 5. Effects of the experimental diets on the variation of anthropometry and bioimpedance parameters according to nutritional diagnosis.

Parameter	Underweight (N=6)			Normal (N=27)			Overweight (N=9)		
	Phase I	Phase II	P	Phase I	Phase II	P	Phase I	Phase II	P
<i>Anthropometry</i>									
Weight (g)	130 (90–260)	270 (180–470)	NS	270 (150–350)	380 (280–660)	0.01	370 (320–490)	440 (-90–820)	NS
BMI	-0.01 (-0.04–0.03)	0.08 (0.02–0.20)	0.05	0.02 (-0.02–0.07)	0.12 (0.03–0.25)	0.01	0.05 (0.03–0.15)	0.05 (-0.21–0.33)	NS
MBM (g)	180 (150–220)	290 (90–360)	NS	240 (160–320)	330 (200–480)	0.01	280 (180–330)	300 (120–640)	NS
<i>Bioimpedance</i>									
FFM (g)	170 (110–200)	580 (330–720)	0.03	250 (130–370)	610 (540–820)	0.001	320 (240–340)	830 (530–950)	0.02
FM (g)	-10 (-70–40)	-240 (-330– -120)	0.05	20 (-70–60)	-250 (-360– -90)	0.001	60 (-20–180)	-450 (-630– -60)	0.01

Phase I = pre-intervention period; Phase II = intervention period.

N = number; BMI = body mass index, kg.m<sup>-2</sup>; MBM = muscular body mass; FFM = fat-free mass; FM = fat mass; NS = not significant.

The values are expressed as median (Q1– Q3) and represent the increase or decrease in the parameter evaluated during 30 days.

## References

1. FAO. The State of Food Insecurity in the World – Addressing food insecurity in protracted crises (2010). <http://www.fao.org/docrep/013/i1683e/i1683e.pdf> [Accessed Nov 18, 2012].
2. Farfan JA. Alimentação alternativa: análise crítica de uma proposta de intervenção nutricional. *Cad de Saúde Pública*. 1998; 14(1): 205-211.
3. CFN – Conselho Federal de Nutricionistas. Posicionamento do Conselho Federal de Nutricionistas quanto à multimistura. Brasília. 1996. <http://www.cfn.org.br/novosite/conteudo.aspx?IDMenu=61> [Accessed Nov 18, 2012].
4. Torin HR, Domene SM, Farfan JA. Alimentação alternativa. Posição da Sociedade Brasileira de Pediatria. *Jornal de Nutrição Infantil*, São Paulo. 1995. <http://www.sbp.com.br/img/documentos/Multimistura%20-%20final.pdf> [Accessed Jun 28, 2011].
5. Millward DJ. Meat or wheat for the next millennium? The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements. Summer Meeting of the Nutrition Society at the University of Surrey on 29 June–2 July 1998. *Proceedings of the Nutrition Society* (1999), 58, 249–260.
6. Elango R, Ball RO, Pencharz PB. Amino acid requirements in humans: with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids. *Amino acids*. 2009; 37:19-27.
7. Hoffman JR, Falvo MJ. Protein- which is best? *J Sports Sci & Med*. 2004; 3; 118-30.
8. Leff B, Ramankutty N, Foley JA. Geographic distribution of major crops across the world. *Global Biogeochem Cy*. 2004; 18:1-27.
9. Bonazzil C, du Peuty MA, Themelin A. Influence of Drying Conditions on the Processing Quality of Rough Rice. *Dry Technol*. 1997; 15:1141-57.
10. Calderano AA, Gomes PC, Albino LFT, Rostagno HS, Souza RM, Mello HHC. Chemical and energetic composition of feedstuffs of plant origin for poultry at different ages. *R Bras Zootec*. 2010; 39:320-326. <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v39n2/14.pdf> [Accessed Nov 18, 2012].
11. Hegsted DM, Juliano BO. Difficulties in assessing the nutritional quality of rice protein. *J Nutr*. 1974; 104:772-81.
12. Müntz K, Christov V, Saalbach G, Saalbach I, Waddell D, Pickardt T, Schieder Q, Wüstenhagen T. Genetic engineering for high methionine grain legumes. *Nahrung*. 1998; 42(3-4):125-7.
13. World Health Organization. Growth reference data for children from 5 to 19 years, 2007. Geneva: WHO, 2007; [www.who.int/growthref/en/](http://www.who.int/growthref/en/) [Accessed Nov 18, 2012]

14. SBP – Sociedade Brasileira de Pediatria. Avaliação nutricional da criança e do adolescente: Manual de orientação. SBP – Departamento de Nutrologia, 2009, p.44.
15. Slaughter MH., Lohman TG., Boileau RA, Horswill CA, Stillman RJ, Van Loan MD, Bemben DA. Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. Hum Biol.1988; 60: 709–723.
16. De Lorenzo A, Sorge SP, Iacopino L, Andreoli A, De Luca PP, Sasso GF. Fat-free mass by bioelectrical impedance vs dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). Appl Radiat Isot. 1998; 49(5-6):739-41.
17. U.S. Department of Agriculture ARS. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23, 2010. <[http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq\\_no\\_115=257886](http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=257886)>. Access: Oct, 2010.
18. WHO/FAO/UNU (2007) Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, p. 1-284.
19. Brasil. Resolução/CD/FNDE n. 38, 16 de julho de 2009, Ministério da Educação: Brasília, p. 1-63.
20. Association of Official Analytical Chemists – AOAC. Official methods of analysis. 16<sup>th</sup> ed. Arlington, Virginia, USA. 1995, p. 1025.
21. Khambalia AZ, Lim SS, Gill T, Bulgiba AM. Prevalence and sociodemographic factors of malnutrition among children in Malaysia Food and Nutrition Bulletin, vol. 33, no. 1, The United Nations University. 2012, p. 31-42.
22. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids (Macronutrients). Washington DC: National Academy Press; 2002.
23. Wardle J, Cooke L. Genetic and environmental determinants of children's food preferences. British Journal of Nutrition. 2008; 99(Suppl):S15–21.
24. Halton TL, Hu FB. The Effects of High Protein Diets on Thermogenesis, Satiety and Weight Loss: A Critical Review. J Am Coll Nutr. 2004; 23(5):373–85.
25. Zemel BS, Riley EM, Stallings VA. Evaluation of methodology for nutritional assessment in children: anthropometry, body composition, and energy expenditure. Annu. Rev. Nutr. 1997; 17:211–35.
26. Boye KR, Dimitriou T, Manz F, Schoenau E, Neu C, Wudy S, Remer T. Anthropometric assessment of muscularity during growth: estimating fat-free mass with 2 skinfold-thickness measurements is superior to measuring midupper arm muscle area in healthy prepubertal children. Am J Clin Nutr. 2002; 76:628–32.
27. Pencharz PB, Azcue M. Use of bioelectrical impedance analysis measurements in the clinical management of malnutrition. Am J Clin Nutr. 1996; 64(suppl):S485-8.

28. Kabir I, Malek MA, Rahman MM, Khaled MA, Mahalanabis D. Changes in body composition of malnourished children after dietary supplementation as measured by bioelectrical impedance. *Am J Clin Nutr.* 1994; 59(1):5-9.
29. Papadaki A, Linardakis M, Larsen TM, van Baak MA, Lindroos AK, Pfeiffer AFH, Martinez A, Darlenska TH, Kunesová M, Holst C, Astrup A, Saris WHM, Kafatos A. The Effect of Protein and Glycemic Index on Children's Body Composition: The DiOGenes Randomized Study. *Pediatrics*, 2010; 126(5):e1143-52.
30. Weigle DS, Breen PA, Matthys CC, Callahan HS, Meeuws KE, Burden VR, Purnell JQ. A high-protein diet induces sustained reductions in appetite, ad libitum caloric intake, and body weight despite compensatory changes in diurnal plasma leptin and ghrelin concentrations. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82:41- 8.
31. Gately PJ, King NA, Greatwood HC, Humphrey LC, Radley D, Cooke CB, Hill AJ. Does a High-protein Diet Improve Weight Loss in Overweight and Obese Children? *Obesity.* 2007; 15(6): 1527-34.
32. Hurley C, Richard D, Deshaies Y, Jacques H. Soy protein isolate in the presence of cornstarch reduces body fat gain in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998; 76: 1000-7.
33. Ali AA, Velasquez MT, Hansen CT, Mohamed AI, Bhathena SJ. Effects of soybean isoflavones, probiotics, and their interactions on lipid metabolism and endocrine system in an animal model of obesity and diabetes. *J Nutr Biochem.* 2004; 15: 583-90.
34. Banz WJ, Davis J, Peterson R, Iqbal MJ. Gene expression and adiposity are modified by soy protein in male Zucker diabetic fatty rats. *Obes Res.* 2004; 12:1907-13.
35. Manzoni MS, Rossi EA, Carlos IZ, Vendramini RC, Duarte AC, Damaso AR. Fermented soy product supplemented with isoflavones affected fat depots in juvenile rats. *Nutrition.* 2005; 21:1018-24.
36. Genovese MI, Barbosa ACL, Pinto MS, Lajolo FM. Commercial Soy Protein Ingredients as Isoflavone Sources for Functional Foods. *Plant Food Hum Nutr.* 2007; 62(2): 53-8.
37. Begum A, Radhakrishnan AN, Pereira SM. Effect of Amino Acid Composition of Cereal-Based Diets on Growth of Preschool Children. *Am J Clin Nutr.* 1970; 23(9): 1175-83.
38. Han IK, Lee JH. The role of synthetic amino acids in monogastric animal production – Review. *Asian-Aus J. Anim Sci.* 2000; 13(4): 543-60.
39. Abdel-Maksoud A, Yan F, Cerrate S, Coto C, Wang Z, Waldroup PW. Effect of Dietary Crude Protein, Lysine Level and Amino Acid Balance on Performance of Broilers 0 to 18 Days of Age. *Int J Poult Sci.* 2010; 9(1): 21-7.

## 2.4. Estudo científico 4

### **Lysine from cooked white rice consumed by healthy young men is highly metabolically available when assessed using the indicator amino acid oxidation technique<sup>1,2,3</sup>**

Artigo publicado na revista

***THE JOURNAL OF NUTRITION***

(J.Nutr.143:302-306, 2013)

Ivo R. D. Prolla,<sup>3,4</sup> Mahroukh Rafii,<sup>4</sup> Glenda Courtney-Martin,<sup>4\*</sup> Rajavel Elango,<sup>5</sup> Leila P. da Silva,<sup>6</sup> Ronald O. Ball,<sup>8,9</sup> and Paul B. Pencharz<sup>4,7,8,9</sup>

<sup>3</sup>Department of Pediatrics, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil 97105-900. Fellow Capes / Brazil.

<sup>4</sup>Research Institute, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada M5G 1X8.

<sup>5</sup>Department of Pediatrics, Child and Family Research Institute, University of British Columbia, Vancouver, Canada. <sup>6</sup>Department of Animal Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil 97105-900.

<sup>7</sup>Departments of Paediatrics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada M5G 1X8.

<sup>8</sup>Department of Nutritional Sciences, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada M5S 2Z9.

<sup>9</sup>Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2P5.

\* To whom correspondence should be addressed: E-mail: [paul.pencharz@sickkids.ca](mailto:paul.pencharz@sickkids.ca).

AUTHOR LIST FOR INDEXING: Prolla, Rafii, Courtney-Martin, Elango, Silva, Ball, Pencharz.

WORD COUNT: 5260 / NUMBER OF TABLES: 3 / NUMBER OF APPENDIX: 1

RUNNING TITLE: Metabolic availability of lysine in rice

<sup>1</sup> Supported by the Canadian Institutes for Health Research (grant MT 10321).

First author Ivo R. D. Prolla,<sup>3,4</sup> was supported by a scholarship from CAPES Foundation (Brazilian agency for the advanced training of university personnel- Ministry of Education of Brazil).

Mead Johnson Nutritionals (Canada) donated the protein-free powder for the experimental diets.

<sup>2</sup> Author disclosures: I. R. D. Prolla, M. Rafii, G. Courtney-Martin, R. Elango, L. P. da Silva, R. O. Ball, and P. B. Pencharz have no conflicts of interest.

<sup>3</sup> Supplemental table1 is available from the “Online Supporting Material” link in the online posting of the article and from the same link in the online table of the contents at <http://jn.nutrition.org>.

Clinical Trial Registration number: NCT01474226

<sup>8</sup> Abbreviations used:

AA, amino acid;

AA mix, amino acid mixture;

CWR, cooked white rice;

IAA, indispensable amino acid;

IAAO, indicator amino acid oxidation;

Lys, L-Lysine;

MA, metabolic availability;

OBCR, oven browned cooked rice;

OX<sub>Phe</sub>, L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine oxidation;

PDCAAS, protein digestibility corrected amino acid score;

REE, resting energy expenditure;

TD, true digestibility;

D, day

## **Abstract**

Cooked white rice (CWR) provides up to 71% of dietary protein for many people, worldwide. The protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS) is the method adopted by FAO/WHO to evaluate protein quality. Our group has proposed the metabolic availability (MA) of amino acids (AA) as another determinant of protein quality. It measures the percentage of an indispensable AA that is incorporated during protein synthesis. This study is the first to assess the MA of L-Lysine (L-Lys) from CWR in humans using the

indicator amino acid oxidation (IAAO) technique. Three levels of L-Lys 10, 15 and 19 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (= 28.5, 42.8 and 54.3 % of the mean L-Lys requirement of 35 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) were studied in 5 subjects in a repeated measures design. To test the principle that the Maillard reaction has an effect on the MA of L-Lys, we also assessed the MA of L-Lys in oven browned cooked rice (OBCR) (n= 3) at one level of L-Lys (19 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). The MA of L-Lys was estimated by comparing the IAAO response to varying L-Lys intake in rice *versus* the IAAO response to varying the L-Lys intake in the reference protein (crystalline AA mixture patterned after egg protein), using slope ratio method. The MA of L-Lys from CWR was found to be high (97%). The effect of Maillard reaction reduced the MA of L-Lys to 70%. The results show that despite its relative low content in rice, L-Lys has a high MA when the rice is cooked without being browned.

## Introduction

For many people worldwide cooked polished white rice (CWR) serves as the most important protein source in the diet. In some rice-eating countries, the mean rice intake is about 187 kg<sup>-1</sup>.person<sup>-1</sup>.y<sup>-1</sup> and contributes to up to 71 % of dietary protein (1). Therefore, for many countries, rice grains with high protein content are of great interest.

The nutritional value of dietary proteins is related to the indispensable amino acid (IAA) pattern and, more importantly, the “proportion of dietary amino acid (AA) that is digested and absorbed in a form suitable for protein synthesis; this is called AA availability” (2) or bioavailability or metabolic availability (MA). The IAA L-Lysine (Lys) is the first limiting AA in cereal grains, which has in rice an AA score of 62% (3). This fact restricts the use of all other AA present in the rice for protein synthesis, causing them to be considered “in excess” and, consequently, oxidized (4). In addition, cooking of rice, has been shown to decrease the digestibility of nitrogen by laboratory rats (5) and L-Lys can become unavailable due to Maillard reaction with carbohydrates (6). Thus, this reaction further decreases the MA of L-Lys and, consequently impairs the nutritional value of rice protein. Ultimately, the MA of L- Lys is an important factor concerning the amount of rice to be consumed by populations to match daily protein requirements, particularly when this cereal is the major dietary protein source (1).

The quality of dietary proteins in foodstuffs for human consumption have been assessed by balance studies in animals (7, 8) or by the protein digestibility corrected amino



acid score (PDCAAS) (3). For rice, the PDCAAS is around 56% (3), which is considered low. Although the PDCAAS is currently the most used and recommended method, there have been many criticisms concerning its value (9).

Besides PDCAAS, different methods for assessing amino acid availability have been proposed (10, 11). The indicator amino acid oxidation (IAAO) technique is a currently well accepted method for the determination of protein and AA requirements in animals (12) and humans (13-15). The IAAO technique has been used to assess the MA of different AA in pigs (16, 17) and in humans (18) and its benefits in determining MA of IAAs have been discussed recently (19-21). Briefly, this method is based on the observation that, if one AA is limiting for protein synthesis, all other AA are in excess (including the indicator AA, such as L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine) and must be oxidized (22). Consequently, changes in the oxidation of the indicator AA following the intake of the test or reference protein will reflect the whole body MA of the limiting AA at the site of protein synthesis, accounting for all losses of dietary AA during digestion, absorption, and cellular metabolism. In other words, the higher the oxidation of the indicator AA, the lower the MA of the test AA for protein synthesis, and vice versa” (18). The aim of this study was to assess the MA of L-Lys from cooked polished white rice protein in young adult men, using the IAAO technique.

## **Materials and Methods**

### **Subjects**

Five young, healthy, adult males completed the experiment (on an outpatient basis) in the Clinical Investigation Unit at the Hospital for Sick Children, Toronto, Canada. Subject characteristics, body composition, and energy requirements were assessed at entrance into the study and prior to each individual experiment (Table 1). There was no history of recent weight loss, illness, or medication use at the time of entry, or during the study, as determined by medical history. The study protocol and goal were explained to each subject. Informed written consent was obtained from each participating subject after the protocol was explained to them fully. Subjects received financial compensation for their inconvenience. The study was approved by the Research Ethics Board of the Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada.

## Study design and dietary intervention

This study was conducted in two main parts. The objective of the first part was to assess the MA of L-Lys from CWR protein by comparing the slopes of IAAO response following the graded intake levels of L-Lys in CWR *versus* the reference protein, using the slope ratio method.

A reference slope was constructed from the IAAO response measured following the feeding of graded intakes of L-Lys from a reference protein (crystalline AA mixture patterned after egg protein). The slope was constructed from 3 graded intakes of L-Lys studied in random order. The levels of L-Lys studied were 10, 15 and 19 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, representing 28.5, 42.8, and 54.3 % of the mean L-Lys requirement (35 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) (23).

The MA of L-Lys in rice was determined by substituting a portion of the AA based diet with CWR (polished long grain white rice – Selection®, Montreal, Quebec and Toronto - ON, product of USA). We chose this rice because of its similar nutrient content to rice commonly eaten in East Asia which is a number of countries who are among the highest rice consumers in the world. It also has a similar nutrient profile to rice commonly eaten in the Middle East and Brazil. Two levels of L-Lys intake was studied in the rice in random order; 15 and 19 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, with 10 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> serving as the base L-Lys intake, provided by the AA mixture. The carbohydrate, protein and L-Lys content of the rice studied were 78.2, 6.75 and 0.24 g.100g<sup>-1</sup> of raw rice, respectively. These values were based on the mean among long, medium and short raw white rice grains and were taken from the USDA table (24). We performed our own analysis (macronutrient and AA content) on the actual rice used in the experiment and the results were very similar to that obtained from the USDA (*supplemental table 1*). The AA composition of the rice was matched to that of the reference protein by adding individual crystalline AA to the cooked rice.

For the second part of the experiment, the effect of Maillard reaction on the MA of L-Lys from rice was determined, as a proof of principle. For testing the effect of Maillard reaction, three subjects consumed oven browned cooked rice (OBCR) at the highest L-Lys intake (19 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). The same white rice was first browned in the oven, after which it was cooked.

## Study Protocol

Oxidation studies were performed on d 3 after two days of adaptation to the test diet. During the two adaptation days, subjects received an AA based liquid diet (25), providing one of the three randomly assigned L-Lys levels, energy: REE measured by open-circuit indirect calorimetry (Vmax Encore - Viasys Healthcare; Yorba Linda, CA, USA) x 1.7 and protein ( $1.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ). The non-protein energy in the diet was provided as protein-free powder, (Product 80056, Mead Johnson), flavoured with Tang® and KoolAid® crystals (Kraft Foods, Don Mills), corn oil and protein free cookies (26). The adaptation diet was consumed as four equal meals with 52, 36, and 12% of energy from carbohydrates, fat, and protein, respectively. On d 3, following a 10 h overnight fast, subjects came to the Investigation Unit at The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, for a period of 10 h. The oxidation study day diet content was similar to the adaptation diet. It was consumed as 9 isonitrogenous and isoenergetic hourly meals, with each meal representing one-twelfth of the subject's total daily protein ( $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) and energy requirement ( $1.5 \times \text{REE}$ ). For the duration of all experiments, subjects consumed a daily multivitamin supplement (Centrum Forte®, Whitehall Robins) and 500 mg of choline to ensure adequate vitamin intake. Phenylalanine and tyrosine were provided at 30 and 40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  respectively. This part of the experiment was conducted to determine the reference slope.

In the first part of the study, the MA of L-Lys in cooked white rice was determined by substituting rice for a portion of the L-Lys, protein and carbohydrate intake. The rice used for the experimental diets was weighed out, washed (3 times) and cooked (rice cooker for 23 minutes) in deionized water (1:1.5), with corn oil (36 % of energy) and a pinch of garlic and salt.

For the second part of the study, the effect of Maillard reaction on the MA of L-Lys in rice was tested by browning the rice in a conventional oven at 370 °F for 105 minutes before cooking (as previously described).

The subjects were studied in a repeated measures design at 3 randomly assigned levels of lysine intakes from the AA diet, and 2 levels of lysine from the CWR. Three of the five subjects were studied at one level of intake of the OBCR.

### **Tracer protocol**

The tracer protocol started orally on day 3 of each experiment (study day) with the fifth meal, using  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  ( $0.176 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and L-[1- $^{13}\text{C}$ ] phenylalanine (99 atom % excess,

Cambridge Isotope Laboratories;  $40 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) as prime and  $15 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  given hourly until the 9<sup>th</sup> meal. The amount of phenylalanine provided as tracer was subtracted from the dietary provision such that the total intake of phenylalanine was  $30 \text{mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Tyrosine was provided in excess at  $40 \text{mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$  to ensure labeled phenylalanine was not principally used to meet the demand for tyrosine, and to facilitate the channeling of any tyrosine formed from phenylalanine towards oxidation (27).

### **Sampling of breath and analysis**

On each study day, breath samples were collected and later analyzed for  $^{13}\text{CO}_2$  enrichment. For each study day, 4 baseline breath samples were collected between the fourth and fifth hourly meals (before tracer intake) and 9 half-hourly breath samples were collected again at timed intervals between 220 and 300 min of tracer intake, at isotopic steady state. After the fourth meal, open-circuit indirect calorimetry was performed for 20 minutes to measure the rate of carbon dioxide production ( $\text{VCO}_2$ ). Enrichment of  $^{13}\text{C}$  in breath was analyzed by continuous flow isotope ratio mass spectrometer (20/20 Isotope Analyzer, PDZ Europa). Indicator oxidation was expressed as the percentage of label dose administered [ $\text{F}^{13}\text{CO}_2$  excreted in breath at steady state ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) / L-[1- $^{13}\text{C}$ ] phenylalanine administered ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) x 100]. MA (%) was estimated using the slope ratio method, by applying the model previously tested in pigs (16), namely, using a single protein intake test level to compare the IAAO response of test lysine intake from CWR with the lysine intake consumed from the reference protein (crystalline AA Mix).

### **Statistical Analysis**

L-Lys intake was expressed as the intake above that provided by the base diet from the crystalline AA mixture ( $10 \text{mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ). The effect of adding L-Lys by protein source (crystalline AA or cooked rice) on phenylalanine oxidation was tested using the procedure "MIXED" with subject as a random variable, and oxidation day as repeated measure. Nesting L-Lys intake within type of L-Lys addition (e.g. L-Lys or lysine in cooked white rice or oven browned cooked white rice) gave the change in (slope) in phenylalanine oxidation per milligram of L-Lys for each type of L-Lys addition. The metabolic availability of L-Lys in

cooked white rice (CWR) was calculated by dividing the slope for L-Lys from CWR by the slope for free L-Lys from the crystalline AA diet ( $(\text{Slope}_{\text{CWR}} / \text{Slope}_{\text{AA Mix}}) \times 100$ ). The repeatability of oxidation measurements was assessed using mean CV within subjects and treatments. Results were expressed as least square mean  $\pm$  SEM.  $P < 0.05$  was regarded as significant. All statistical analysis was conducted using SAS V 9.3 for Windows (SAS Institute Inc SAS/STAT Institute Cary, NC).

## Results

***Linearity of response to Lys intake from free AA diet:*** As L-Lys intake from AA mix increased from 10 to 15 to 19  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (28.6 to 54.3% of L-Lys requirement of 35  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), the  $\text{OX}_{\text{phe}}$  decreased linearly. Application of linear regression determined a negative slope of the best-fit line of  $-0.00899$  (SEM = 0.0023,  $P = <0.05$ ).

***Metabolic availability of Lys in cooked white rice:*** L-Lys intake (5 to 9  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  above base) from CWR had a significant effect on  $\text{OX}_{\text{phe}}$  (slope =  $-0.00872$ , SEM = 0.0023,  $P = <0.05$ ). However the replacement of L-Lys from AA mix with L-Lys from CWR did not produce a significant change in  $\text{OX}_{\text{phe}}$  from that observed with the AA mix ( $P=0.85$ ). The ratio of the response to additional L-Lys intake from the CWR compared with that of L-Lys from AA Mix was 0.9699. Thus, the MA of L-Lys from CWR was 97% and not significantly different from the AA mix (Table 3).

***Metabolic availability of Lys in oven browned cooked rice:***

There was an increase in  $\text{OX}_{\text{phe}}$  when OBCR was fed to the subjects at a L-Lys intake of 9  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  above base. Browning of rice decreased significantly the MA of L-Lys from 97 to 70% ( $P = 0.02$ ).

## Discussion

FAO/WHO considers PDCAAS as the method of choice for the measurement of protein quality in human nutrition (28). However, many criticisms about this method have risen in the literature (9). Among them, the use of fecal instead of ileal digestibility is of main concern. In this sense, the true ileal AA digestibility coefficients, as performed in human ileostomates, may provide more accurate results (21). However, methodological difficulties in

testing different protein sources in these subjects limit the broad use of this technique. In addition, the PDCAAS is dependent on the concentration of the amino acids compared to the ideal pattern, with a correction for overall protein digestibility, and not the MA of any individual amino acid. In rats, it was demonstrated that the true digestibility (TD) of crude protein from vegetables is not a good predictor of the bioavailability of the limiting AA. For instance, in black beans the TD for total nitrogen is 72%, whereas the TD of some essential AA as methionine and arginine is 51 and 77%, respectively. This way, the correction of amino acid scores for crude protein digestibility (as is usually done) is not adequate to accurately reflect digestibility of individual amino acids in proteins (29).

Our group has used the IAAO technique, a non-invasive method, to assess amino acid requirements in adults and children (30, 31). Recently, we have applied the same technique to determine the MA of different amino acids from different food protein sources: casein and soy protein isolate in humans (18) and peas, corn and barely in animals (16, 17). In the present study the IAAO technique was used to assess the MA of L-Lys from the protein in a whole food: cooked rice. As far as we know, this is the first study to determine the MA of an amino acid from a common supermarket purchased grain using the IAAO technique in humans. For this, we studied different levels of L-Lys intake provided by a mix of free L-amino acids plus CWR (test protein). Based on apparent and true ileal AA digestibility of crystalline AA mixture in animals (pigs and cockerels), we assumed that the MA of all L-amino acids provided in the mix was 100% (32).

In countries where cereals and legumes provide the main protein source in the diet, both quality and amount of the protein consumed should be taken into account. For malnourished children, for example, it is suggested that 24 – 26g of protein.1,000 kcal<sup>-1</sup> with a PDCAAS of at least 70% would be the preferable profile of the diet (33). However, there is no statement about the lowest digestibility and MA values of the indispensable AAs of the protein source. Consequently, any isolated or combined vegetarian protein source might fulfill the requirements related to quantity and PDCAAS mentioned above. Cooked polished white rice (CWR) presents a low protein to energy ratio (18.5 – 20.8g of protein.1,000 kcal<sup>-1</sup>) (24) and a low PDCAAS (56%) (3). This suggests that rice is not an adequate protein source. However, rice was shown to have a high TD value for both the protein (90%) and Lys (100%) (3). Nevertheless, information is lacking on the bioavailability of the L-Lys, as a limiting AA, in cereal based diets consumed by humans. Based on our data, the MA of L-Lys from cooked rice is 97%. It means that almost all L-Lys provided by cooked rice is effectively

digested, absorbed and incorporated into proteins. These results are critical for any populations where rice is the main protein source in the diet.

In rats, the digestibility of protein and L-Lys from cooked milled rice were found to be 90% and 100%, respectively; as the AA score for the rice used was 62.2%, the PDCAAS was 56% (3). In our study, the metabolic availability (MA) of L-Lys was found to be 97%. It means that 97% of the total amount of the L-Lys present in the diet was actually digested, absorbed and used for protein synthesis. Since the mean daily L-Lys requirement was previously determined (23) to be  $35 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , the AA score for our rice was calculated to be 1.0 or 100% ( $(35.5\text{mg.L-Lys.g}^{-1} \text{ of rice protein} \div 35\text{mg.L-Lys.g}^{-1} \text{ protein}) \times 100 = 101.4\%$ ). Considering 90% (3) as the TD value for the rice protein and the new AA score (1.0 or 100%) to recalculate the PDCAAS, it was found to be 90% ( $90\% \times 1.0$  or  $100\%$ ), much higher than 56% previously assumed (3). The suggestion is that rice protein is of a much higher quality than that stated in past reports.

Comparisons between true digestibility of protein (used in PDCAAS calculation) and limiting amino acids in vegetable protein fed to rats showed that the crude protein digestibility may not be a good predictor of the bioavailability of limiting amino acids (29). The corrections for true digestibility of individual AA for all the foods assessed lowered the scores by 11 – 47% (29). For instance, in black beans the AA score and TD of protein was found to be of 89% and 72%, respectively. Then, the PDCAAS for black beans was considered low: 64%. Despite the high TD for black beans protein, the TD for its limiting AA, methionine and cystine, were very low (51% and 46%, respectively). According to this study (29), the TD of each of the nine indispensable AA should be taken into account and provide a more reliable value for the AA ratio named “Available AA Score”. This new score was used to recalculate the PDCAAS. For black beans, it was found to be 42%, which is even lower than the previous value of 64% (29). Based on our L-Lys values, the “Available AA Score” is significantly higher (97%) ( $1.0 \times 97\%$ ) than the previously assumed 62%. However, the “Available AA Score” for the remaining indispensable AA in rice still need to be assessed. In this sense, the MA using the IAAO technique is a better option since it is able to assess the actual amount of each AA provided in the diet that is effectively digested and used for protein synthesis.

The higher MA obtained in this study might be related to the low level of anti-nutritional factors, (e.g. fibre and phytate) that have a negative impact on bioavailability of nutrients in foods. We used polished white rice in our study. While the rice used in the current study has a similar nutrient profile to rice consumed in many rice eating countries around the world, it is possible that other kinds of rice with higher fibre content might have a lower MA.

The most important anti-nutritional food constituent in diets in low-income countries is phytate. It is present in cereal products and forms insoluble complexes with a range of nutrients, inhibiting the absorption of proteins (34). In CWR, the phytate content is remarkably low ( $1.2 - 3.7 \text{ mg.g}^{-1}$  dry matter) in comparison to other cereals and legumes (35). This is due to the fact that the germ and pericarp which contain 87.6% of the phytate are removed during industry processing of the rice grains. Besides that, thermal and soaking methods can reduce phytate content in cereals (34). These facts may explain the higher MA of Lys observed in our study.

Maillard reaction can decrease the availability of some essential amino acids (33, 34). In cereal-based foodstuffs L-Lys is the most reactive and, thus most affected (36). In our study we also aimed at demonstrating this effect on L-Lys in rice by first browning the rice in an oven before cooking. For this part of the experiment, only three out of the original five subjects were available. When they were fed the OBCR, we observed an upward shift in slope (namely, increment in the rate of  $\text{OX}_{\text{Phe}}$ ). It suggests that L-Lys incorporation into proteins was decreased after the rice was browned (MA = 70%). This result is important for populations where rice is considered the primary protein source, because excessive heat exposure resulting in burning of the rice would result in a decrease in its nutritional value. Since Maillard reaction can decrease the availability of some essential amino acids other than L-Lys (37), it is not known from this study, whether the change in the oxidation slope happened exclusively due to the impairment in L-Lys availability. This further illustrates the sensitivity of the IAAO technique to changes in amino acid content in the diets.

In summary, this was the first study to determine the MA of L-Lys in a store bought, whole food item: cooked white rice, using the IAAO technique. The MA of L-Lys in men (97%) was similar to that derived for its true digestibility in animals (100%) and much higher than that suggested by the PDCASS value for rice. The methodology applied in this study is suitable for assessing the MA of any indispensable AA in foods and, consequently, can be used to update the nutritional value of different dietary amino acids and protein sources.

## **Acknowledgements**

We thank Adisseo Brasil Nutrição Animal LTDA for performing the amino acid analysis (HPLC) in the rice; Bruna Sampaio for the bromatological analysis (protein, fat,



fibre, ash, water and carbohydrate) in the rice; Jasmine Donohue for making the experimental cookies; Dr. Karen Chapman for performing the calorimetry assessments.

### Statement of authors' contributions to manuscript

I. R. D. P., M. R., G.C-M., L. P. da S., R.O. B., P. B. P. designed research; I.R. D. P., M.R. conducted research; I. R. D. P., M. R., G. C-M., R. E., P.B.P. analyzed data; I. R. D. P., G. C.-M., R. E., R.O. B., P. B.P wrote the paper; G. C-M. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

**Table 1.**

Subject characteristics of healthy young men<sup>1</sup> who participated in the IAAO studies for the determination of MA of L-Lys in cooked white rice.

Characteristics	Value
Age, <i>y</i>	33.2 ± 7.3
Weight, <i>kg</i>	76.5 ± 9.1
Height, <i>m</i>	1.73 ± 0.08
BMI, <i>kg.m<sup>-2</sup></i>	25.4 ± 1.7
LBM <sup>2</sup> , <i>kg</i>	56.6 ± 7.6
REE <sup>3</sup> , <i>MJ</i>	6.7 ± 0.83

<sup>1</sup> Means ± SEM; *n* = 5.

<sup>2</sup> Lean-body mass, determined by Bioelectrical Impedance Analysis.

<sup>3</sup> Resting energy expenditure, determined by open-circuit indirect calorimetry.

Indicator amino acid oxidation (IAAO)

Metabolic availability (MA)

L-Lysine (L-Lys)

**Table 2.**

Amino acid composition of reference<sup>1</sup> and test protein<sup>2</sup> fed to subjects who participated in the IAAO study on MA of L-Lys in cooked white rice.

AA	AA MIX	Rice <sup>3</sup>
<i>mg.g<sup>-1</sup> protein</i>		
L-Arginine.HCl <sup>4</sup>	74.5	100
L-Asparagine	33.1	N.I.*
L-Aspartic acid	33.1	93.9
L-Lysine.HCl <sup>4</sup>	75.1	44.8
L-Cysteine	21.9	20.5
L-Glutamine	56.2	N.I.
L-Glutamic acid	56.2	194.9
L-Glycine	33.0	45.6
L-Histidine	22.5	23.5
L-Isoleucine	62.4	43.2
L-Leucine	82.6	82.7
L-Methionine	29.5	23.5
L-Phenylalanine	54.2	53.5
L-Proline	41.6	47.0
L-Serine	83.2	52.6
L-Threonine	46.7	35.8
L-Tryptophan	15.5	11.6
L-Tyrosine	40.4	33.4
L-Valine	69.7	61.0
L-Alanine	61.5	57.9
Total	993	1025

<sup>1</sup> The reference protein was a crystalline amino acid mixture (AA MIX) patterned after the AA composition of egg protein.

<sup>2</sup> The test protein was a combination of crystalline amino acids mixture (providing 10 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> of L-Lys (base) plus cooked polished white rice (2.05 or 3.68 g.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> of raw rice, providing 5 or 9 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> of L-Lys, to meet 42.9 or 54.3% of the daily L-Lys requirement of 35 mg.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectively).

<sup>3</sup> Polished white rice AA profile – USDA - National Nutrient Database for Standard Reference; values represent the mean among long, medium and short grain levels (24).

<sup>4</sup> Actual concentrations of amino acids in HCl form: in AA MIX - Arginine, 62.1 mg.g<sup>-1</sup>; and L-Lys, 60.6 mg.g<sup>-1</sup>; in raw rice- Arginine, 83.4 mg.g<sup>-1</sup>; and L-Lys, 36.2 mg.g<sup>-1</sup>.

\* N.I. – No information (from USDA tables)

Indicator amino acid oxidation (IAAO)

Metabolic availability (MA)

L-Lysine (L-Lys)

**Table 3.**

Metabolic availability (MA) of L-Lys in cooked white rice (CWR) and oven browned cooked rice (OBCR) based on IAAO of L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine.

Lysine source	n	Slope equation	MA (%)	P
AA MIX	5	- 0.00899x + 1.11	100 <sup>1</sup>	<0.01
CWR	5	- 0.00872x + 1.11	97	<0.01
OBCR	3	- 0.00630x + 1.11	70	0.02

<sup>1</sup> MA from AA MIX was assumed to be 100%.

Indicator amino acid oxidation (IAAO)

### Literature cited

1. Juliano BO. Rice in human nutrition. In: FAO Corporate Document Repository. Rome: International Rice Research Institute and FAO; 1993.
2. Batterham ES. Availability and utilization of amino acids for growing pigs. *Nutr Res Rev* 1992;5(1):1-18.
3. Eggum BO, Cabrera MI, Juliano BO. Protein and lysine digestibility and protein quality of cooked Filipino rice diets and milled rice in growing rats. *Plant Foods Hum Nutr* 1993;43(2):163-70.
4. Zello GA, Wykes LJ, Ball RO, Pencharz PB. Recent advances in methods of assessing dietary amino acid requirements for adult humans. *J Nutr* 1995;125(12):2907-15.
5. Eggum BO. Effect of cooking on nutritional value of milled rice in rats. *Nutr Rep Int* 1977;16:649-55.
6. O'Brien J, Morrissey PA. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1989;28(3):211-48.

7. Lee H, Friend BA, Shahani KM. Factors Affecting the Protein Quality of Yogurt and Acidophilus Milk. *J Dairy Sci* 1988;71(12):3203-13
8. Alm L. The effect of fermentation on the biological value of milk proteins evaluated using rats. A study on Swedish fermented milk products. *J Sci Food Agric* 1981;32(12):1247-53.
9. Schaafsma G. The Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)--a concept for describing protein quality in foods and food ingredients: a critical review. *J AOAC Int* 2005;88(3):988-94.
10. Moughan PJ. Amino acid availability: aspects of chemical analysis and bioassay methodology. *Nutr Res Rev* 2003;16(2):127-41.
11. Moughan PJ, Butts CA, van Wijk H, Rowan AM, Reynolds GW. An acute ileal amino acid digestibility assay is a valid procedure for use in human ileostomates. *J Nutr* 2005;135(3):404-9.
12. Moehn S, Shoveller AK, Rademacher M, Ball RO. An estimate of the methionine requirement and its variability in growing pigs using the indicator amino acid oxidation technique. *J Anim Sci* 2008;86(2):364-9.
13. Turner JM, Humayun MA, Elango R, Rafii M, Langos V, Ball RO, et al. Total sulfur amino acid requirement of healthy school-age children as determined by indicator amino acid oxidation technique. *Am J Clin Nutr* 2006;83(3):619-23.
14. Riazi R, Wykes LJ, Ball RO, Pencharz PB. The total branched-chain amino acid requirement in young healthy adult men determined by indicator amino acid oxidation by use of L-[1-13C]phenylalanine. *J Nutr* 2003;133(5):1383-9.
15. Kriengsinyos W, Wykes LJ, Goonewardene LA, Ball RO, Pencharz PB. Phase of menstrual cycle affects lysine requirement in healthy women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287(3):E489-96.
16. Moehn S, Bertolo RF, Pencharz PB, Ball RO. Development of the indicator amino acid oxidation technique to determine the availability of amino acids from dietary protein in pigs. *J Nutr* 2005;135(12):2866-70.
17. Levesque CL, Moehn S, Pencharz PB, Ball RO. The metabolic availability of threonine in common feedstuffs fed to adult sows is higher than published ileal digestibility estimates. *J Nutr* 2011;141(3):406-10.
18. Humayun MA, Elango R, Moehn S, Ball RO, Pencharz PB. Application of the indicator amino acid oxidation technique for the determination of metabolic availability of sulfur amino acids from casein versus soy protein isolate in adult men. *J Nutr* 2007;137(8):1874-9.
19. Elango R, Ball RO, Pencharz PB. Indicator amino acid oxidation: concept and application. *J Nutr* 2008;138(2):243-6.
20. Elango R, Ball RO, Pencharz PB. Amino acid requirements in humans: with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids. *Amino Acids* 2009;37(1):19-27.
21. Elango R, Levesque C, Ball RO, Pencharz PB. Available versus digestible amino acids - new stable isotope methods. *Br J Nutr* 2012;108 Suppl 2:S306-14.
22. Pencharz PB, Ball RO. Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu Rev Nutr* 2003;23:101-16.
23. Kriengsinyos W, Wykes LJ, Ball RO, Pencharz PB. Oral and intravenous tracer protocols of the indicator amino acid oxidation method provide the same estimate of the lysine requirement in healthy men. *J Nutr* 2002;132(8):2251-7.
24. U.S. Department of Agriculture ARS. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23, 2010 [cited 2012 Jul 16]. Available from: [http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq\\_no\\_115=257886](http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=257886)

25. Geigy C. Scientific tables. In. 7th ed ed: Basle (Switzerland): Ciba-Geigy Limited; 1970.
26. Zello GA, Ball RO. The design and validation of a diet for studies of amino acid metabolism in adult humans. *Nutr Res* 1990;10:1353-65.
27. Shiman R, Gray DW. Formation and fate of tyrosine. Intracellular partitioning of newly synthesized tyrosine in mammalian liver. *J Biol Chem* 1998;273(52):34760-9.
28. Schaafsma G. The protein digestibility-corrected amino acid score. *J Nutr* 2000;130(7):1865S-7S.
29. Sarwar G, Peace RW. Comparisons between true digestibility of total nitrogen and limiting amino acids in vegetable proteins fed to rats. *J Nutr* 1986;116(7):1172-84.
30. Di Buono M, Wykes LJ, Ball RO, Pencharz PB. Total sulfur amino acid requirement in young men as determined by indicator amino acid oxidation with L-[1-13C]phenylalanine. *Am J Clin Nutr* 2001;74(6):756-60.
31. Elango R, Humayun MA, Ball RO, Pencharz PB. Lysine requirement of healthy school-age children determined by the indicator amino acid oxidation method. *Am J Clin Nutr* 2007;86(2):360-5.
32. Chung TK, Baker DH. Apparent and true amino acid digestibility of a crystalline amino acid mixture and of casein: comparison of values obtained with ileal-cannulated pigs and cecectomized cockerels. *J Anim Sci* 1992;70(12):3781-90.
33. Golden MH. Proposed recommended nutrient densities for moderately malnourished children. *Food Nutr Bull* 2009;30(3 Suppl):S267-342.
34. Michaelsen KF, Hoppe C, Roos N, Kaestel P, Stougaard M, Lauritzen L, et al. Choice of foods and ingredients for moderately malnourished children 6 months to 5 years of age. *Food Nutr Bull* 2009;30(3 Suppl):S343-404.
35. Greiner R, Konietzny U. Phytase for food application. *Food Technol Biotechnol* 2006;44:125 - 40.
36. Fernandez-Artigas P, Garcia-Villanova B, Guerra-Hernandez E. Blockage of available lysine at different stages of infant cereal production. *J Sci Food Agric* 1999;79:851-4.
37. Ashoor SH, Zent JB. Maillard Browning of Common Amino Acids and Sugars. *Journal of Food Science* 1984;49(4):1206-7.
38. Chemists AOAC. Official methods of analysis of the Association of the Official Analysis Chemists. 16 ed: Arlington: ed. 16 ed: Arlington; 1995.

Online Supporting Material:

Supplemental table 1:

Biochemical profile and reference values from USDA tables of the rice used in the study for determination of MA of L-Lys in cooked white rice by IAAO.

	Rice used <sup>1</sup>	Reference values <sup>2</sup>	Difference
	g.100g <sup>-1</sup> rice		(%)
Protein	6.01	6.75	11.0
Fat	0.6	0.6	0
Fiber	2.5	1.3	48
Ash	0.6	0.6	0
Water	12.5	12.6	0.79
Carbohydrate <sup>3</sup>	77.7	78.2	0.64
Total	100	100	
	g.100g <sup>-1</sup> rice		
L-Lysine	0.20	0.24	16.7
L-phenylalanine	0.32	0.36	11.1
	mg.g <sup>-1</sup> Protein		
L-Lysine	33.3 <sup>4</sup>	35.5 <sup>5</sup>	6.19
L-phenylalanine	53.2 <sup>6</sup>	53.3 <sup>7</sup>	0.2

<sup>1</sup> Long grain white rice - Selection®;

<sup>2</sup> USDA Table;

<sup>3</sup> Calculated by difference.

<sup>4</sup> 33.3 = 0.20 g L-Lys . 6.0 g<sup>-1</sup> protein

<sup>5</sup> 35.5 = 0.24 g L-Lys . 6.75g<sup>-1</sup> protein

<sup>6</sup> 53.2 = 0.32 g L-Phe .6.0 g<sup>-1</sup> protein

<sup>7</sup> 53.3 = 0.36 g L-Phe . 6.75 g<sup>-1</sup> protein

The macronutrient content of the rice in the study was analyzed by the following methods:

Crude protein, method 960.52, conversion factor: 6.25; fat, method

920.39 with acid hydrolysis; total fiber, method 985.29; insoluble fiber, method 991.42; ash, method 923.03;

and water or moisture, method 925.10, according to the official methods of analysis recommended by the Association of the Official Analysis Chemists (38) AOAC. The carbohydrate content was obtained by difference (100 - (protein + fat + total fiber + ash + moisture)).

The indispensable AA profile of the rice used in the study (Long grain white rice - Selection®) was assessed by High Performance Liquid Chromatography – HPLC (hydrolysis by 6N HCL; precolumn derivatization of free amino acids with phenylisothiocyanate (PITC); separation of the derivatives by C18 reverse-phase column (Pico-Tag - 3.9 x300 mm); UV detection at 254 nm).

Indicator amino acid oxidation (IAAO); Metabolic availability (MA); L-Lysine (L-Lys); L-Phenylalanine (L-Phe)

### 3. DISCUSSÃO

Esta tese foi desenvolvida com os objetivos principais de avaliar o perfil de ingestão de nutrientes por um grupo de escolares, de testar alimentos feitos com co-produtos agroindustriais de baixo custo na alimentação escolar, e de verificar se esta intervenção nutricional determinaria efeitos nutricionais benéficos. Assim, selecionou-se uma Escola pública que atendia crianças de diferentes níveis sócio-econômicos, inclusive crianças muito carentes de uma comunidade próxima.

Os resultados apresentados por este estudo demonstraram a inadequação nutricional das dietas consumidas pelas crianças estudadas, tanto nos seus domicílios quanto na Escola.

Nos domicílios, foi observada inadequação principalmente em relação à ingestão calórica, de macro (carboidratos e fibras) e micronutrientes essenciais (vitaminas A e C, Ca e Fe). Ou seja, nas crianças avaliadas, a despeito do que supõe o Programa Nacional de Alimentação Escolar – PNAE (BRASIL. 2009b), a qualidade e a quantidade dos alimentos consumidos pelos alunos nos seus domicílios foram consideradas insuficientes para prover os 80% das necessidades nutricionais para a faixa etária estudada (Estudo científico 1).

Da mesma forma, na Escola selecionada, foram observadas inadequações nas dietas servidas, tanto em relação à ingestão calórica quanto de macro (carboidratos, proteínas, lipídios e fibras) e micronutrientes (vitaminas A e C, Ca e Fe). Ou seja, na escola avaliada, os cardápios utilizados foram considerados insuficientes para prover pelo menos 20% das necessidades nutricionais diárias das crianças estudadas, conforme proposto pelo PNAE (BRASIL. 2009b) (Estudo científico 1).

Uma observação interessante foi que no Estudo 1 detectamos uma prevalência elevada (38%) de excesso de peso entre as crianças avaliadas, mesmo com um consumo médio de calorias bem abaixo do recomendado: 60% das calorias recomendadas para ingestão no domicílio, e 70%, na Escola. No entanto, observamos um consumo elevado de proteínas pelas crianças em seus domicílios: 36 g / dia, o que corresponde a 239% da quantidade esperada. Além disto, quase metade das dietas fornecidas pela Escola apresentavam desequilíbrio aminoacídico, apresentando 2 ou mais AA em níveis abaixo dos limites recomendados, possivelmente comprometendo a utilização adequado dos demais AA destas dietas para a síntese protéica. Estes dois achados, ingestão protéica elevada e desequilíbrio aminoacídico, podem ter determinado o excesso de peso entre as crianças estudadas.

Estas constatações são vitais quando envolvem crianças em crescimento e reafirmam a necessidade de monitorização da real ingestão de nutrientes pelas populações carentes assistidas pelo PNAE, uma vez que muitas delas não consomem o mínimo recomendado para suprir suas necessidades nutricionais diárias. Este fato certamente colabora para a perpetuação do ciclo alimentação deficiente, baixo rendimento cognitivo, repetência e evasão escolares.

No entanto, estas constatações não são totalmente desconhecidas e têm estimulado grupos de pesquisa a buscarem fontes alimentares alternativas de baixo custo para serem incorporadas à alimentação servida nas escolas e nos domicílios de populações em insegurança alimentar. Porém, muitas destas intervenções nutricionais carecem de eficácia nutricional comprovada, servindo apenas como forma de amenizar a fome dos menos favorecidos (BITTENCOURT, 1998).

Este estudo foi capaz de demonstrar que o concentrado protéico de soja e a quirera de arroz podem originar uma mistura altamente nutritiva, tanto sob o ponto de vista protéico quanto aminoacídico. Foi possível demonstrar, também, que esta mistura pode ser incorporada na formulação de alimentos alternativos com grande aceitação e de baixo custo (Estudo científico 2). Nesta pesquisa, as formulações utilizadas foram “bolinhos” de diferentes sabores. Porém, o “mix” demonstrou ser passível de utilização em formulações salgadas como massas, molhos, sopas e ensopados de carne, com aumento do rendimento e elevação da qualidade nutricional destes alimentos. Assim, a utilização do “mix” como ingrediente em alimentos alternativos abre um horizonte de possibilidades a serem exploradas visando à obtenção de alimentos nutricionalmente adequados e de baixo custo.

Além das propriedades culinárias e sensoriais demonstradas, os alimentos alternativos formulados com o “mix” determinaram alterações surpreendentes na composição corporal das crianças estudadas, com redução significativa da massa gorda e aumento da massa magra (Estudo científico 3). Estas alterações foram mais pronunciadas nos grupos de criança com desvios nutricionais, principalmente para aquelas com excesso de peso. Apesar de a intervenção nutricional ter sido aplicada por um período relativamente curto, os efeitos nutricionais puderam ser observados por diferentes metodologias. A literatura cita diferentes explicações para os efeitos nutricionais de diferentes dietas (HALTON; HU, 2004; PAPADAKI et al, 2010; WEIGLE et al, 2005), principalmente aquelas formuladas com compostos de soja (ALI et al, 2004; BANZ et al, 2004; MANZONI et al, 2005). No nosso entendimento, os achados observados têm relação direta com o conceito de proteína ideal por nós utilizado na confecção dos alimentos experimentais. Assim, alimentos com adequado perfil energético-protéico e equilíbrio aminoacídico apresentam efeitos anabólicos protéicos



importantes, como já amplamente demonstrados em estudos relacionados à nutrição de animais de corte (ABDEL-MAKSOUUD et al, 2010).

Por fim, aminoácidos limitantes, devido aos seus baixos teores na proteína ingerida, têm papel importante na interrupção da síntese protéica determinando oxidação dos demais aminoácidos remanescentes não utilizados e considerados em excesso (ELANGO; BALL; PENCHARZ, 2009). Este mecanismo é responsável por perdas e custos desnecessários, e possível desvio dos compostos oriundos dos aminoácidos oxidados para a lipogênese indesejada. A baixa biodisponibilidade dos aminoácidos pode agravar a plena utilização dos aminoácidos já limitantes, prejudicando ainda mais o anabolismo protéico almejado, principalmente para crianças em crescimento. Neste estudo foi utilizada a técnica do indicador de oxidação de aminoácidos - IOAA (ELANGO; BALL; PENCHARZ, 2008) para avaliar a disponibilidade metabólica da lisina ofertada pelo arroz cozido (Estudo científico 4). Até então, a referida técnica havia sido amplamente utilizada na avaliação de requerimentos protéicos e aminoacídicos de diferentes grupos etários ou condições clínicas, e para a avaliação da biodisponibilidade de aminoácidos específicos a partir de fontes protéicas isoladas, como a caseína e o isolado protéico de soja. Esta foi a primeira vez em que a técnica do IOAA foi utilizada na avaliação da disponibilidade metabólica de um aminoácido limitante a partir de um alimento completo, neste caso, o arroz cozido. Os resultados demonstraram que, a despeito dos baixos níveis de lisina presentes neste cereal, sua biodisponibilidade no sítio da síntese protéica é próxima de 100%.

Concluindo, esta pesquisa demonstrou que a ingestão de nutrientes por escolares freqüentadores de Escolas participantes do PNAE pode não estar sendo suficiente para suprir os requerimentos nutricionais elevados e necessários ao pleno crescimento e desenvolvimento infantil. Demonstrou, também, que fontes protéicas alternativas podem ser utilizadas na formulação de alimentos nutritivos, saborosos, e que determinam efeitos nutricionais benéficos, principalmente entre crianças com distúrbios nutricionais.

## 4. CONCLUSÕES

Os resultados desta tese nos permitem concluir que:

1. No grupo estudado, a qualidade e a quantidade dos alimentos consumidos pelos alunos nos seus domicílios foram consideradas insuficientes para prover os 80% de suas necessidades nutricionais, principalmente em relação à ingestão calórica, de macro e de micronutrientes essenciais;
2. A alimentação escolar fornecida pela Escola selecionada foi considerada insuficiente para prover os 20% das necessidades nutricionais diárias, conforme proposto pelo PNAE, tanto quanto ao perfil nutricional dos cardápios servidos (calorias, macro e micronutrientes), quanto nas quantidades ingeridas pelos alunos;
3. A mistura de concentrado protéico de soja e quirera de arroz na proporção de 1:3 resultou em um “mix” altamente protéico e com elevando o escore aminoacídico;
4. Dentre os alimentos elaborados com o “mix” e testados por análise sensorial, bolinhos diferentes sabores foram os alimentos aprovados;
5. Houve redução de 18 a 24% nos custos dos alimentos aprovados quando os mesmos foram produzidos com o “mix”;
6. Houve alterações significativas na composição corporal das crianças estudadas, como aumento da massa magra e redução da massa gorda;
7. A técnica do IOA foi capaz de determinar a biodisponibilidade metabólica da lisina no arroz (=97%), demonstrando ser aplicável em estudos que avaliem a qualidade protéica e aminoacídica de alimentos alternativos.

## 5. BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, S.A. **Core indicators of nutritional state for difficult-to-sample populations.** The Journal of Nutrition, 120, 1557–1600, 1990.

ABDEL-MAKSOUUD, A.; YAN, F.; CERRATE, S.; COTO, C.; WANG, Z.; WALDROUP, P.W. **Effect of Dietary Crude Protein, Lysine Level and Amino Acid Balance on Performance of Broilers 0 to 18 Days of Age.** International Journal of Poultry Science 9 (1): 21-27, 2010.

ALI, A.A.; VELASQUEZ, M.T.; HANSEN, C.T.; MOHAMED, A.I.; BHATHENA, S.J. **Effects of soybean isoflavones, probiotics, and their interactions on lipid metabolism and endocrine system in an animal model of obesity and diabetes.** J Nutr Biochem 2004;15: 583-590.

BANZ, W.J.; DAVIS, J.; PETERSON, R.; IQBAL, M.J. **Gene expression and adiposity are modified by soy protein in male Zucker diabetic fatty rats.** Obes Res 2004; 12: 1907-1913.

BELIK, W. **Segurança alimentar: a contribuição das universidades.** São Paulo: Instituto Ethos; 2003.

BITTENCOURT, S.A. **Uma alternativa para a política nutricional brasileira?** Cad. Saúde Pública v.14 n.3 Rio de Janeiro jul./set. 1998.

BRASIL. 2009a. **Fome Zero.** Disponível em: <<http://www.fomezero.gov.br/o-que-e>>. Acesso em 25 jun. 2011.

BRASIL. 2009b. **Programa Nacional de Alimentação Escolar - PNAE.** Disponível em: <<http://www.fnde.gov.br/index.php/ae-apresentacao>>. Acesso em 22 nov. 2012.

BURLANDY, L.; ANJOS, L.A. **Acesso à alimentação escolar e estado nutricional de escolares no nordeste e sudeste do Brasil, 1997**. Cadernos de Saúde Pública, v. 23, n. 5, p.1217-1226, 2007.

CFN – Conselho Federal de Nutricionistas. **Posicionamento do Conselho Federal de Nutricionistas quanto à multimistura**. Brasília.1996. Disponível em: <<http://www.cfn.org.br/novosite/conteudo.aspx?IDMenu=61>>. Acesso em 22 nov. 2012.

CINTRA, I.P. et al. **Utilização do leite enriquecido com ferro na merenda escolar do município de São Paulo**. Pediatría Moderna, v. 38, n. 10, p. 475-479, 2002.

CONSEA – CONSELHO NACIONAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL. **A segurança alimentar e nutricional e o direito humano à alimentação adequada no Brasil - Indicadores e Monitoramento - da Constituição de 1988 aos dias atuais**. Brasília, novembro de 2010. Disponível em: <<http://www4.planalto.gov.br/consea/publicacoes/publiuacoes-arquivos/a-seguranca-alimentar-e-nutricional-e-o-direito-humano-a-alimentacao-adequada-no-brasil>>. Acesso em 01 jun. 2011.

CONSEA – CONSELHO NACIONAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL. **Segurança Alimentar e Nutricional**. Disponível em: <<http://www4.planalto.gov.br/consea/consea-2/consea-1/?searchterm=consumo de alimentos de qualidade duvidosa>>. Acesso em 25 jun. 2011.

ELANGO, R.; BALL, R.O.; PENCHARZ, P.B. **Indicator amino acid oxidation: concept and application**. The Journal of Nutrition, v. 138, n. 2, p.243-246, 2008..

ELANGO, R.; BALL, R.O.; PENCHARZ, P.B. **Amino acid requirements in humans: with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids**. Amino acids, v. 37, p.19-27, 2009.

FAO — Food and Agriculture Organization of United Nations. **Trade reforms and food security - Conceptualizing the Linkages**. Rome, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/y4671e/y4671e06.htm#fnB31>>. Acesso em 30 jun. 2011.

FARFAN, J.A. **Alimentação alternativa: análise crítica de uma proposta de intervenção nutricional**. Cadernos de Saúde Pública, v. 14, n. 1, p. 205-211, 1998.

FISBERG, M. et al. **Utilização de queijo *petit suisse* na prevenção da anemia carencial em pré-escolares**. JAMA – Pediatria, v. 2, p. 14-24, 1995.

HALTON, T.L.; HU, F.B. **The Effects of High Protein Diets on Thermogenesis, Satiety and Weight Loss: A Critical Review**. Journal of the American College of Nutrition, Vol. 23, No. 5, 373–385 (2004).

IBGE. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios – 2009 - Segurança alimentar**. Disponível em: <<http://www4.planalto.gov.br/conseanoticias/noticias/links/apresentacao-pnad-2009>>. Acesso em 01 jun. 2011.

KAMINSKI, T.A. et al. **Avaliação dos elementos tóxicos, antinutricionais e patógenos em multimisturas**. Alimentos e Nutrição, v. 17, n. 2, p. 179-187, 2006a.

KAMINSKI, T.A.; SILVA L.P.; BAGETTI M. **Composição centesimal e mineral de diferentes formulações de multimisturas provenientes da região central do Rio Grande do Sul**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 65, n. 3, p.186-193, 2006b.

MALTA, D.C.; GOULART, E.M.A.; COSTA, M.F.F.L. **Estado nutricional e variáveis sócio-econômicas na repetência escolar: um estudo prospectivo em crianças da primeira série em Belo Horizonte, Brasil**. Cadernos de Saúde Pública, v. 14, n. 1, p.157-164, 1998.

MANZONI, M.S.; ROSSI, E.A.; CARLOS, I.Z.; VENDRAMINI, R.C.; DUARTE, A.C.; DAMASO, A.R. **Fermented soy product supplemented with isoflavones affected fat depots in juvenile rats**. Nutrition 2005; 21: 1018-1024.

MELGAR-QUIÑONEZ, H.; KAISER, L. L.; MARTIN, A. C.; METZ, D.; OLIVARES, A. **Inseguridad alimentaria em latinos de Califórnia: observaicones de grupos focales**. Salud Pública de México, v. 45, n. 3, p. 198-205, may./jun. 2003.

MOYSÉS, M.A.A.; LIMA, G.Z. **Fracasso escolar, um fenômeno complexo: desnutrição, apenas mais um fator**. Pediatria (São Paulo), v. 5, p. 263-269, 1983.

PAPADAKI, A.; LINARDAKIS, M.; LARSEN, T.M.; VAN BAAK, M.A.; LINDROOS, A.K.; PFEIFFER, A.F.H.; MARTINEZ, A.; DARLENSKA, T.H.; KUNESOVÁ, M.; HOLST, C.; ASTRUP, A.; SARIS, W.H.M.; KAFATOS, A. **The Effect of Protein and Glycemic Index on Children's Body Composition: The DiOGenes Randomized Study.** PEDIATRICS Volume 126, Number 5, November 2010. doi:10.1542/peds.2009-3633.

SANTOS, L.A.S. et al. **Uso e percepções da alimentação alternativa no Estado da Bahia: um estudo preliminar.** Revista de Nutrição, v. 14, suplemento, p. 35-40, 2001.

TASCA, R.S. **Efeitos de formulado nutricional sobre a recuperação de crianças desnutridas.** Tese (Doutorado em Pediatria e Ciências Aplicadas) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.

TORIN, H.R.; DOMENE, S.M.; FARFAN, J.A. **Alimentação alternativa. Posição da Sociedade Brasileira de Pediatria.** Jornal de Nutrição Infantil, São Paulo.1995. [acesso 2011 Jun 28].Disponível em: [<http://www.sbp.com.br/img/documentos/Multimistura%20-%20final.pdf>]

TORRES, M.A.A.; SATO, K.; QUEIROZ, S.S. **Efeito do uso do leite fortificado com ferro e vitamina C sobre os níveis de hemoglobina e condição nutricional de crianças menores de dois anos.** Revista de Saúde Pública, v. 29, n. 4, p. 301-307, 1995.

WHITNEY, E.N.; CATALDO, C.B.; ROLFES, S.R. **Understanding normal and clinical nutrition.** 6<sup>a</sup> ed. USA: Wadsworth/Thomson Learning; 2002.

WEIGLE, D.S.; BREEN, P.A.; MATTHYS, C.C.; CALLAHAN, H.S.; MEEUWS, K.E.; BURDEN, V.R.; PURNELL, J.Q. **A high-protein diet induces sustained reductions in appetite, ad libitum caloric intake, and body weight despite compensatory changes in diurnal plasma leptin and ghrelin concentrations.** Am J Clin Nutr 2005; 82:41- 48.

ZAVIEZO, D. **Proteína ideal – novo conceito nutricional na formulação de rações para aves e suínos.** Avicultura Industrial, n.10, p. 16-20, 1998.

WEBB, P.; COATES, J.; FRONGILLO, E. A.; ROGERS, B. L.; SWINDALE, A.; BILINSKY, P. **Measuring household food insecurity: Why it's so important and yet so difficult do.** The Journal of Nutrition, v. 136, p. 1404S-08S, may 2006.

KAC G, VELÁSQUEZ-MELENDEZ G, SCHLÜSSEL MM, SEGALL-CÔRREA AM, SILVA AA, PÉREZ-ESCAMILLA R. **Severe food insecurity is associated with obesity among Brazilian adolescent females.** Public Health Nutr. 2012 Oct;15(10):1854-60.

ROLLAND-CACHERA MF, DEHEEGER M AND BELLISLE F. **Increasing prevalence of obesity among 18-year-old males in Sweden: evidence for early determinants.** Acta Paediatr. 1999;88:365–367. Invited commentary

## 6. APÊNDICES

### APÊNDICE 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

**Instituição:** Universidade Federal de Santa Maria / PPGCTA - Doutorado

**Pesquisador responsável:** Prof. Ivo Roberto Dorneles Prolla

**Pesquisador orientador:** Profa. Dra. Leila Picolli da Silva

**Título da Pesquisa:** Efeitos nutricionais da fortificação protéico-energética da merenda escolar de crianças em situação de insegurança alimentar.

Senhores pais do (a) menino (a)\_\_\_\_\_.

Vocês, juntamente com seu (sua) filho (a), estão sendo convidados a participar de um estudo sobre os efeitos nutritivos de um composto a base de soja e arroz, rico em proteínas. Este estudo faz parte de uma Tese de Doutorado do professor Ivo Prolla, médico gastroenterologista pediátrico do Hospital Universitário de Santa Maria e professor de pediatria da Universidade Federal de Santa Maria. Este composto nada mais é que uma mistura das farinhas de arroz e de soja, sendo muito nutritivo e rico em proteínas importantes para crianças em crescimento. Além disto, é muito barato e poderá ser uma ótima alternativa para enriquecermos vários tipos de alimentos que as crianças habitualmente consomem nas Escolas do município.

Este estudo pretende avaliar se a adição deste composto na merenda escolar pode realmente melhorar o ritmo de crescimento de crianças carentes que não têm uma alimentação mais completa em suas casas. Assim, uma pequena quantidade deste composto será misturada em alguns alimentos como biscoitos, bolos, bebida láctea e barras de cereal, e que serão servidos como um complemento da merenda da Escola onde seu (sua) filho (a) estuda. Estes alimentos mais nutritivos serão oferecidos à tarde, como um lanche, antes das crianças saírem para o recreio, e durante um período de 2 meses.

Neste estudo as crianças serão pesadas, medidas (altura) e avaliadas quanto à quantidade de gordura e de músculo no seu corpo.

Acreditamos que não haverá qualquer efeito colateral relevante devido a sua adição nos alimentos da merenda escolar, exceto se seu (sua) filho (a) tiver história de alergia à soja. Neste caso, ele (a) não poderá participar do estudo.



Se realmente conseguirmos demonstrar os efeitos nutritivos benéficos desta mistura (melhora do crescimento, redução do risco de anemia e aumento das proteínas do corpo) das crianças com ela alimentadas, as escolas públicas poderão passar a ofertar merenda com alimentos enriquecidos com este composto, tornando-os mais nutritivos e de baixo custo.

Sendo assim, se for de sua concordância voluntária que seu (sua) filho (a) participe deste estudo, solicito que assine no local indicado. Desta forma, estará declarando que foi devidamente informado e esclarecido quanto aos objetivos, metodologia, riscos e benefícios deste estudo. Além do responsável legal, seu (sua) filho (a) também necessitará concordar com este estudo e deverá autorizar que todos os passos descritos acima sejam realizados. Para isto, terá de dar seu assentimento (consentimento) no local indicado.

### **TERMO DE CONFIDENCIALIDADE**

Aproveitamos para informar que todos os dados coletados e resultantes desta pesquisa serão mantidos sob sigilo quanto à identidade dos participantes e ficarão arquivados pelo prazo de 5 (cinco) anos, no Departamento de Pediatria do CCS – UFSM, sob responsabilidade do pesquisador responsável. Após esta data os dados serão destruídos.

Por fim, gostaria de informar-lhe que durante qualquer etapa da pesquisa tanto os responsáveis legais quanto a própria criança participante poderão solicitar mais informações sobre os procedimentos a serem realizados. Além disto, se desejarem interromper a participação no estudo poderão fazê-lo, sem qualquer prejuízo ou discriminação por parte dos pesquisadores ou da escola.

---

Nome e assinatura do pai, mãe ou representante legal

---

Assentimento (assinatura da criança)

---

Testemunha

---

Local e data

---

Pesquisador

Senhores pais. Em caso de dúvidas ou necessidade de outras informações, favor entrar em contato com o pesquisador responsável, Prof. Ivo Prolla, por um dos telefones a seguir: 3220.85.20 –Departamento de Pediatria; 3223. 89.14 – residência, ou 99.76.86.71 – celular. Se desejarem, também poderão obter informações adicionais sobre este estudo

diretamente com Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM (Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - Sala 702 - Cidade Universitária - Bairro Camobi - CEP: 97105-900 - Santa Maria - RS; Tel.: (55)32209362 - Fax: (55)32208009; e-mail: [comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br](mailto:comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br)).

**APÊNDICE 2. VALOR EM REAIS DOS ALIMENTOS EXPERIMENTAIS APROVADOS PELO GRUPO DE CRIANÇAS.**

Alimentos ("muffins")	Custo (R\$)				Economia (%)
	Sem o "mix"		Com o "mix"		
	1 un	10.000 un	1 un	10.000 un	
Mel	0,16	1.585,00	0,14	1.369,00	14
Chocolate	0,09	900,00	0,07	709,00	21
Baunilha	0,11	1.083,00	0,08	823,00	24
Cenoura	0,09	906,00	0,07	715,00	21
Milho	0,11	1.090,00	0,09	890,00	18
Média	0,11	1.112,80	0,09	901,20	19,60

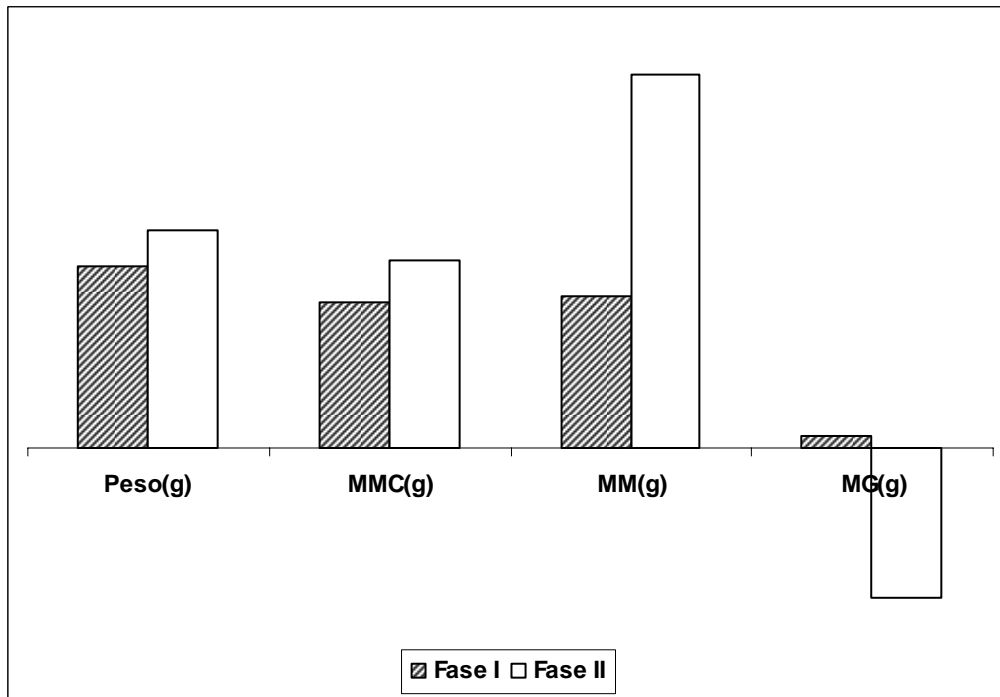
(um = unidade de 50 g)

**APÊNDICE 3. GANHO MÉDIO MENSAL DE PESO E ESTATURA CONFORME A FAIXA ETÁRIA E O SEXO.**

Idade (anos)	Meninos		Meninas	
	Peso (g)	Estatuta (cm)	Peso (g)	Estatuta (cm)
7 a 8	208	0,50	242	0,50
8 a 9	242	0,47	250	0,44
9 a 10	283	0,42	342	0,42
10 a 11	333	0,41	358	0,50
11 a 12	383	0,47	367	0,60
Média	290	0,45	312	0,49
Mediana	283	0,42	342	0,42

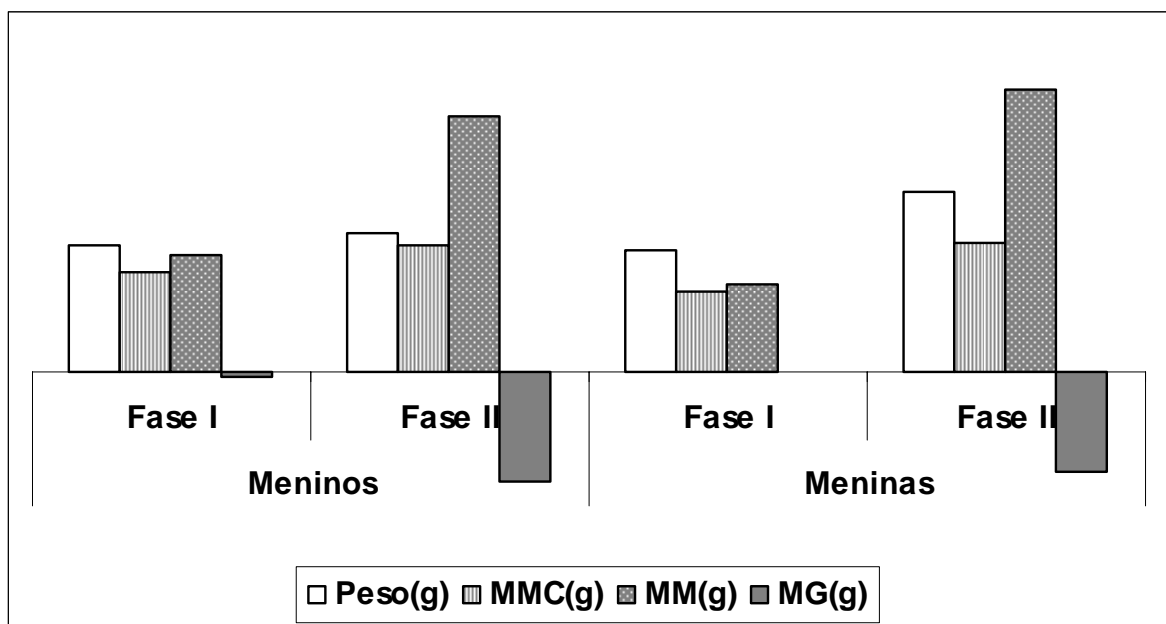
Tabela adaptada a partir de dados publicados em "CDC - Growth Charts", disponível em: [http://www.cdc.gov/growthcharts/html\\_charts/wtage.htm](http://www.cdc.gov/growthcharts/html_charts/wtage.htm)

**APÊNDICE 4. EFEITOS NUTRICIONAIS – TODAS AS CRIANÇAS (N=42).**



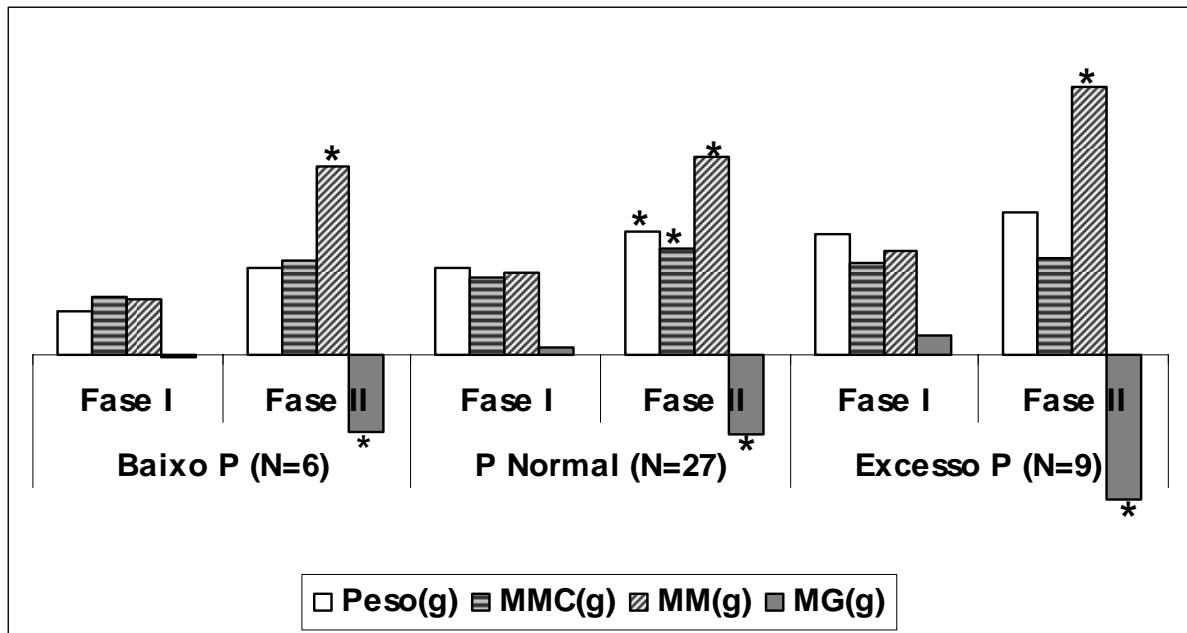
(\*P < 0,05)

**APÊNDICE 5. EFEITOS NUTRICIONAIS CONFORME O SEXO.**



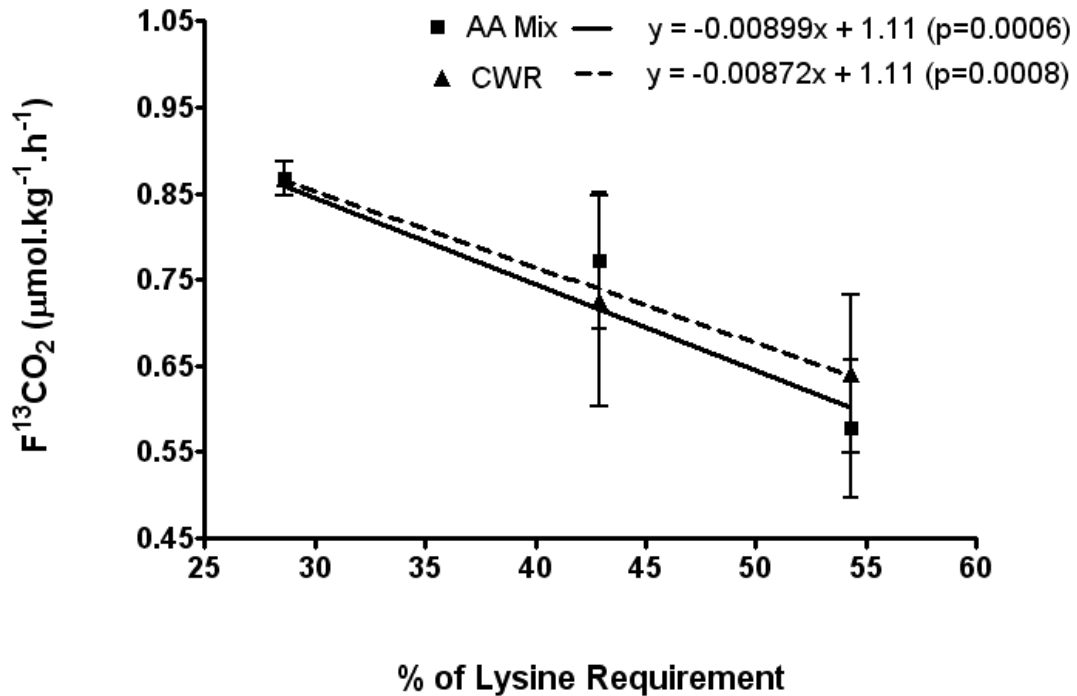
(\*P < 0,05)

**APÊNDICE 6. EFEITOS NUTRICIONAIS CONFORME O ESTADO NUTRICIONAL.**



(\*P < 0,05)

**APÊNDICE 7. BIODISPONIBILIDADE METABÓLICA DO ARROZ BRANCO COZIDO EM RELAÇÃO À CURVA DE REFERÊNCIA.**



**APÊNDICE 8. BIODISPONIBILIDADE METABÓLICA DO ARROZ BRANCO TOSTADO EM RELAÇÃO AO ARROZ BRANCO COZIDO.**

