



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DA SEMENTE DO PINHEIRO- DO-PARANÁ (*Araucaria angustifolia*)

Danielle Melo da Costa Leite
Nutricionista – Universidade Santa Úrsula (RJ)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Porto Alegre, Brasil
Janeiro 2007

Danielle Melo da Costa Leite
Nutricionista – Universidade Santa Úrsula (RJ)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em: 28/02/2007
Pela Banca Examinadora:

Homologada em: 04/04/2007

Por:

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Erna Vogt de Jong
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos (PPGCTA)

Profa. Dra. Erna Vogt de Jong
Co-orientador – PPGCTA/UFRGS

Profa. Dra. Leila Piccolli da Silva
Banca – UFSM

Profa. Dra. Martha Z. de Miranda
Banca – EMBRAPA

ADRIANO BRANDELI
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. ICTA/UFRGS

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz
Banca – ICTA/UFRGS

**Porto Alegre - RS
2007**

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora por iluminarem o meu caminho sempre.

Ao Prof. Dr. Adriano Brandelli pela orientação, confiança, conhecimentos transmitidos e paciência.

À Profa. Dra. Erna Vogt de Jong pela co-orientação, dedicação, exemplo profissional e pela pronta ajuda, sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Cassiano Noreña pela generosidade de ensinar e pela ajuda durante todo o curso.

A Rodrigo Maltez pelo apoio e por compreender e permitir a minha ausência em todos os momentos necessários.

Aos meus queridos colegas de curso, Ângela, Fernanda, Jozi, Marcelo, Michele e em especial a Flávia Twardowski Pinto pelo auxílio profissional e pessoal, fundamental durante todo o curso. A vocês muito obrigada.

A minha sogra Virgínia *in memoriam* por ter torcido sempre pelo meu sucesso e pela minha felicidade.

Ao meu marido Fábio pela parceria, paciência, compreensão, inspiração e amor, sem os quais seria impossível ter chegado aqui.

Ao meu pai Luiz Antônio e meu irmão Fabiano pelos conselhos, incentivos e pelo seu amor.

A minha mãe Eliane e minha avó Rosa, meus exemplos de vida, pela torcida, pelo apoio, dedicação e amor incondicional. Sem vocês nada faria sentido.

RESUMO

A semente da *Araucaria angustifolia*, denominada pinhão, é consumida no Sul e Sudeste do Brasil, como farinha em pratos regionais ou cozida. Há relativamente pouca informação a respeito da composição química e do valor nutricional da semente e de sua farinha. Neste trabalho, a farinha de pinhão, obtida através de diferentes tratamentos térmicos foi avaliada como complemento protéico em um experimento biológico com ratos recém-desmamados. Os animais experimentais consumiram cinco dietas (n=6) com diferentes fontes de proteína: dieta com caseína (CAS), dieta com 80% caseína e 20% (w/w) proteína de farinha de pinhão (PF) sem tratamento térmico (NATPIN), considerando 33.1 ± 1.4 g de proteína/kg desta farinha, dieta com 80% caseína e 20% PF seca a 50°C por 16 horas (PF50), considerando 49.2 ± 0.6 g de proteína/Kg desta farinha, dieta com 80% caseína e 20% PF seca a 80°C por 16 horas (PF80), considerando 50.5 ± 0.8 g de proteína/kg desta farinha e dieta aprotéica (APROT). Os valores de ganho de peso, ingesta de alimento, Coeficiente de Eficácia Alimentar (PER) e Razão Protéica Líquida (NPR) foram similares para as dietas CAS e FP80. O escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS) da PF80 foi o mais alto nas farinhas de pinhão testadas. O escore químico (CS) da farinha de pinhão se mostrou semelhante ao encontrado em outros cereais, sendo a lisina o principal aminoácido limitante, seguida da histidina. Valores mais baixos em todos os parâmetros nutricionais foram encontrados nos animais alimentados com dietas onde foi usada a farinha de pinhão. A farinha de pinhão seca a 80°C por 16 horas mostrou resultados similares nos parâmetros nutricionais ao grupo CAS, e pode ser utilizada, substituindo até 20% de uma proteína de alto valor biológico (AVB) em formulações alimentares.

Palavras-chave: Pinheiro-do-Paraná, Pinhão, Avaliação nutricional

ABSTRACT

The seeds of *Araucaria angustifolia*, namely “pinhão”, are consumed in South and Southeast of Brazil, like flour in regional dishes or baked. There is relatively few information about the chemical composition and nutritional value of the seed and its flour. In this work, “pinhão” flour obtained by different heat treatments was evaluated as an additive in biological experiment for growing rats. Wistar rats were fed five experimental diets (n=6) containing different protein sources: only casein (CAS), diet with 80% casein supplemented with 20% (w/w) “pinhão” flour (PF) protein without heat treatment (NATPIN), considering 33.1 ± 1.4 g of protein/kg of this flour, diet with 80% casein and 20% PF dried at 50°C for 16 hours (PF 50), considering 49.2 ± 0.6 g of protein/kg of this flour and diet with 80% casein and diet with 20% PF dried at 80°C for 16 hours (PF80), considering 50.5 ± 0.8 g of protein/kg of this flour and one aprotic diet (APROT). Values for weight gain, feed ingest, Protein Efficiency Ratio (PER) and Net Protein Ratio (NPR) were similar for diets CAS and PF80, and according to this, the Protein Digestibility Corrected Amino acid Score (PDCAAS) of PF80 was the highest of all the “pinhão” flours tested. The Chemical Score (CS) of “pinhão” flour showed similarity to the results found for other cereals, being lysine the limiting amino acid, followed by histidine. Lowest values for all nutritional parameters were observed for diets complemented with “pinhão” flour. “Pinhão” flour heated at 80°C for 16 hours and used as supplementary in diet had the most similar results in all nutritional parameters to casein-based diets, and can be used as complementary source, substituting until 20% of a high biological value protein in food formulations.

Key-words: “pinhão”; diet; digestibility; nutritional value; rat; trypsin inhibitor, vegetable protein; PDCAAS.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição “pinhão” cozido e cru (g/100g)*:	12
Tabela 2: Valores de digestibilidade de algumas proteínas para humanos	16

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2

Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets	41
Table 2. Chemical composition of “pinhão” flours	42
Table 3. Amino Acid composition of different “pinhão” flours	43
Table 4. Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)	44
Table 5. Food intake, growth performance and digestive utilization of nitrogen in rats fed experimental diets.....	45
Table 6. Weight of organs of rats fed experimental diets.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica de um aminoácido	13
Figura 2 : Reação de formação de um dipeptídeo a partir de dois aminoácidos (destacando-se a ligação peptídica em negrito).....	13

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2

Figure 1. Growth curves of wistar rats feeding the standard diet casein (CAS), “pinhão” flour heated at 50°C/16 hours (PF50), “pinhão” flour heated at 50°C/16 hours (PF80), and “pinhão” flour without heat treatment (NATPIN).	47
Figure 2. Food intake of wistar rats feeding the standard diet casein (CAS), “pinhão” flour heated at 50°C/16 hours (PF50), “pinhão” flour heated at 50°C/16 hours (PF80), and “pinhão” flour without heat treatment (NATPIN).	48
Figure 3. Histology of pancreatic cells of rats fed diet PF50 rat (A) and CAS (B).....	49
Figure 4. Trypsin inhibitor activity of “pinhão” flour extraction.....	50

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	9
1.2 <i>Araucaria angustifolia</i>	10
1.3 O Pinhão	131
1.4 Proteínas Vegetais e Animais	13
1.5 Valor Biológico das Proteínas	15
1.6 Métodos de Avaliação da Qualidade Nutricional de Proteínas.....	16
1.7 Inibidores de Tripsina	17
CAPÍTULO 2 – RESULTADOS	19
Artigo Científico: Nutritional Evaluation Of <i>Araucaria Angustifolia</i> Seed Flour as a Protein Complement for Growing Rats.....	20
CAPITULO 3 - DISCUSSÃO GERAL	51
REFERÊNCIAS.....	55

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O pinhão é a semente do Pinheiro Brasileiro ou Pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia*), pertence a família *Araucariaceae* (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006). Seu habitat natural são as florestas subtropicais (COZZO *et al.*, 1980). A distribuição geográfica da *A. Angustifolia* inclui a Argentina e o Brasil, onde concentra-se nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. É a espécie de conífera, nativa do Brasil, mais importante economicamente. A exploração descontrolada da madeira da Araucária reduziu dramaticamente a sua população, provocando impactos ambientais à diversidade biológica, bem como a toda a cadeia alimentar no ecossistema (ZANDAVALLI; DILLENBURG; SOUZA, 2004).

A semente é consumida, geralmente, após cozimento em água, sendo também utilizada como farinha em alguns pratos regionais. A produção da farinha é feita apenas de modo artesanal nas regiões onde ainda restam Araucárias, e, apesar de sua pouca expressão comercial, permite a confecção de broas, tortas e pães.

Há pouca informação científica a respeito dessa semente, mesmo sendo o seu consumo bastante alto nas épocas de safra (Abril a Agosto), principalmente pelos habitantes das regiões produtoras (Sul e Sudeste do Brasil).

Visando propor alternativas tecnológicas para uso do pinhão é necessário maior conhecimento sobre sua composição química, valor nutricional, e conhecer a qualidade da proteína presente no pinhão. Segundo Pires *et al.* (2006), uma proteína de boa qualidade ou de Alto Valor Biológico (AVB) deve fornecer boa digestibilidade, quantidades adequadas de aminoácidos essenciais e de nitrogênio total.

Os inibidores de enzimas digestivas, particularmente os inibidores de tripsina, e outros fatores anti-nutricionais como a lectina estão amplamente distribuídos em alimentos de origem vegetal. Existem trabalhos demonstrando a presença de lectina na semente do pinhão, mas não existem trabalhos sobre a fração protéica e possíveis inibidores de proteases neste produto. A determinação da atividade destes inibidores na semente do pinhão, e sua susceptibilidade a tratamentos térmicos são de grande importância para um melhor aproveitamento nutricional deste alimento.

O presente trabalho teve como objetivo determinar o perfil de aminoácidos presentes na farinha de pinhão submetida a diferentes tipos de tratamento térmico,

seu Escore Químico (CS) e o Escore Químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) e avaliar a presença de inibidores de tripsina. Para determinar os valores de Coeficiente de Eficácia Protéica (PER), Razão Protéica Líquida (NPR) e Digestibilidade Verdadeira (TD), foi realizado experimento biológico, onde 20% da proteína da caseína foi substituída pela proteína da farinha de pinhão com diferentes tipos de tratamento térmico.

1.2 *Araucaria angustifolia*

Pinheiro-do-paraná, pinheiro-brasileiro, pinheiro-caiova, pinheiro-das-missões, pinheiro-são-josé, são algumas das denominações pelas quais a Araucária é conhecida, sendo seu nome científico *Araucaria angustifolia*, pertence a família Araucariaceae (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006).

Tem como seu habitat natural as florestas subtropicais, a uma altitude entre 500 e 1800 m, ocorrendo de forma natural no Brasil, e em pequenas áreas no extremo nordeste da Argentina, na província das *Misiones* (COZZO *et al.*, 1980). Está presente na parte leste e central do Planalto Sul-Brasileiro, abrangendo Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, e em pequenos locais em São Paulo, Minas Gerais (AZEVEDO, 1962) e Rio de Janeiro.

A utilização da araucária é muito variada, aproveitando-se quase tudo (MAINIERI; CHIMELO, 1989):

- sua madeira é utilizada na construção civil, movelaria e marcenaria;
- a resina pode ser utilizada para produção de acetona, terebentina, vernizes e outros produtos químicos;
- os galhos e refugos servem para lenha e combustíveis de caldeiras;
- os nós formados pela inserção dos galhos ao tronco, são usados como fonte de energia e como matéria-prima para confecção de peças artesanais, pela sua durabilidade, coloração e formas atraentes;

O pinhão é alimento para inúmeros animais silvestres que também são seus dispersores (CARVALHO, 1950). Também são consumidos pelo homem, geralmente após o cozimento, adquirindo gosto semelhante ao de castanha cozida

(ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V., 1988).

Apesar de ocupar extensas áreas, a sua exploração indiscriminada colocou-a na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (BRASIL, 1992). Dos 20 milhões de hectares originalmente cobertos pela Floresta de Araucária, restam, atualmente, cerca de 2-4% dessa área (ASTARITA; FLOH; HANDRO, 2003). Particularmente no Estado do Paraná, as serrarias e o uso industrial foram as principais responsáveis pelo desmatamento (GUBERT FILHO, 1990).

Em plantios, a produção de sementes (pinhões) se inicia entre 10 e 15 anos; enquanto nas populações naturais, essa fase se inicia a partir do vigésimo ano. Iniciada a produção de sementes, a árvore produz pseudo-frutos reunidos em estróbilo feminino ou pinha (ovário), com 10 a 25 cm de diâmetro, composto de 700 a 1.200 escamas, com número variável de sementes (cinco a 150) e com até 4.700 g de peso. As pinhas são encontradas nos galhos, entre uma a duas em cada ramo, alcançando até quatorze num mesmo galho. O pinheiro produz em média 40 pinhas por ano ao longo de toda sua vida (mais de 200 anos) (MATTOS, 1972).

O pinheiro é uma planta dióica, apresentando exemplares machos e fêmeas, ambos produzindo flores. O macho fornece o pólen que, através do vento, dos pássaros, dos insetos e roedores menores, fecunda a fêmea, que produz o pinhão. A cutia, que costuma enterrar o pinhão para comê-lo depois, é um dos principais responsáveis pela disseminação do pinheiro (CARVALHO, 1950), assim como o papagaio-de-peito-roxo *Amazona vinacea* (SOLÓRZANO-FILHO; KRAUS, 1999).

1.3 O Pinhão

O pinhão garante a alimentação de muitas espécies animais, principalmente roedores e pássaros, também é item freqüente no cardápio de outono e inverno em milhares de residências, principalmente no Sul e Sudeste do país.

A polpa é a parte comestível, muito dura quando crua, e mais macia quando cozida, formada basicamente, de amido. A semente é consumida, geralmente, cozida na água, mas também é utilizada como farinha em pratos regionais. A farinha de pinhão, produzida apenas artesanalmente devido a pouca expressão comercial,

permite a confecção de broas, tortas e pães. Nas regiões onde ainda restam Araucárias é comum o preparo do pinhão cozido em conserva de salmoura e vinagre (CORDENUNSI *et al.* 2004).

A semente da araucária, o pinhão, é muito nutritiva, bastante rica em amido (Tabela 1) e uma importante fonte de alimento para animais (ZANDAVALLI *et al.* 2004). Pesquisas históricas e arqueológicas sobre as populações indígenas que viveram no Planalto Sul-Brasileiro, de 6000 anos até os nossos dias, registram a importância do pinhão no cotidiano desses grupos. Restos de cascas de pinhões aparecem em meio aos carvões das fogueiras acesas pelos antigos habitantes das florestas de araucária. Algumas tribos nativas brasileiras (Caingangues e Guaranis) consumiam o pinhão cozido e a farinha de pinhão desde sua origem até os dias atuais, e, especialmente no inverno, seu principal alimento era o pinhão.

Tabela 1: Composição “pinhão” cozido e cru (g/100g)*:

	Pinhão cru	Pinhão cozido
Umidade	49,5 ± 0,02	50,35 ± 0,71
Cinzas	1,60 ± 0,01	1,41 ± 0,02
Proteínas	3,57 ± 0,05	3,31 ± 0,05
Lipídios	1,26 ± 0,07	1,26 ± 0,09
Fibras solúveis	0,63 ± 0,13	0,55 ± 0,18
Fibras insolúveis	4,26 ± 0,20	5,17 ± 0,25
Amido	36,28 ± 0,11	34,48 ± 0,72
Açúcares solúveis	2,43 ± 0,16	0,64 ± 0,13

*Fonte: adaptada de Cordenunsi et al. (2004)

Segundo este mesmo autor, nos estados do Sul do Brasil, principalmente no interior do Paraná, nas regiões de maior pobreza, o pinhão tem grande importância sócio-econômica, representando uma fatia bastante expressiva do emprego e renda, com fortes impactos na qualidade de vida de um grande contingente de pessoas, tanto na produção como na comercialização deste produto (HOEFLICH, 2003).

Nos últimos anos, na época da safra, são realizadas no Sul e Sudeste do país, festas, feiras e festivais gastronômicos para promover o Pinhão. Esta é uma forma

de valorizar e incentivar o consumo da semente, agregando valor e ajudando na preservação da Araucária.

1.4 Proteínas Vegetais e Animais

As proteínas foram as primeiras substâncias a serem reconhecidas como parte vital dos tecidos vivos. O nome originou há mais de um século da palavra em grego que significa “de primeira importância” (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1989)

A base da estrutura da proteína é o aminoácido, dos quais pelo menos 20 foram reconhecidos como constituintes na maioria das proteínas. São diferenciados pela permanência de uma molécula (R), conforme Figura 1. Os aminoácidos se combinam para formar proteínas através de uma ligação peptídica que une carbonos carboxílicos de um aminoácido ao nitrogênio do outro (Figura 2).

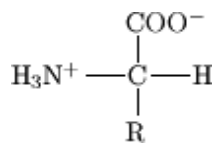


Figura 1: Estrutura básica de um aminoácido

Fonte: Lehninger; Nelson e Michael (1995).

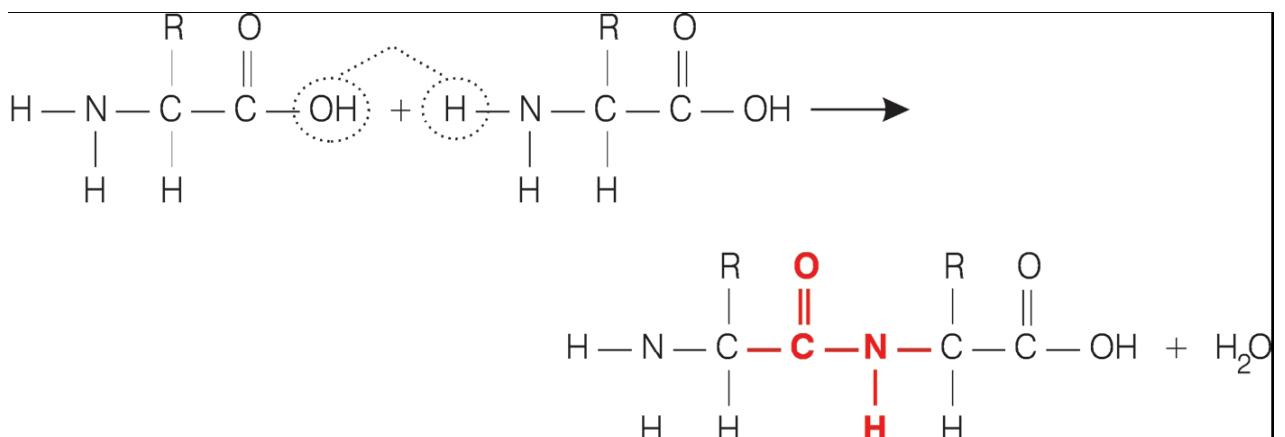


Figura 2 : Reação de formação de um dipeptídeo a partir de dois aminoácidos (destacando-se a ligação peptídica em negro)

Fonte: Lehninger; Nelson e Michael (1995).

As proteínas da dieta, através da digestão e subsequente absorção, fornecem aminoácidos ao organismo que terão três destinos principais: anabolismo (síntese de proteínas e polipeptídeos); catabolismo ou degradação (produção de energia) e síntese de compostos de pequeno peso molecular. Por essas vias os aminoácidos serão utilizados na construção e manutenção dos tecidos, formação de enzimas, hormônios, anticorpos, no fornecimento de energia e na regulação de processos metabólicos. O valor nutritivo de uma proteína dependerá de sua digestibilidade e de sua composição ou da presença dos aminoácidos essenciais em quantidade e proporções adequadas às necessidades do indivíduo devendo ainda estar em forma biodisponível (SGARBIERI,1996).

Para satisfazer as necessidades nutricionais o organismo necessita de elementos essenciais, entre eles, as proteínas, mais precisamente os aminoácidos (MOURA; ZUCAS, 1981). Alguns aminoácidos são classificados como essenciais, porque sua síntese no organismo é inadequada, portanto, para satisfazer as necessidades metabólicas eles devem ser fornecidos pela dieta. A composição de aminoácidos de uma proteína é tão importante como a quantidade consumida, pois alimentos deficientes em um ou mais aminoácidos essenciais prejudicam o processo de síntese de proteína, caso sejam a única fonte protéica da dieta. A qualidade de uma proteína está relacionada com sua capacidade de satisfazer as necessidades do ser humano, promovendo crescimento normal em crianças e a manutenção no adulto (LAJOLO; TIAPEGUI, 2000).

Ausência ou ingestão inadequada de aminoácidos essenciais resulta em balanço nitrogenado negativo (perda de N pelo organismo), perda de peso, crescimento menor em crianças e pré-escolares e sintomatologia clínica. Não há reserva de aminoácidos livres no organismo, qualquer quantidade acima das necessidades para a síntese protéica celular e dos compostos não-protéicos que contêm nitrogênio será metabolizada.

Os alimentos de origem animal, como carnes, leite, ovos, possuem proteínas de boa qualidade, e são as melhores fontes de aminoácidos essenciais. Mas por ter um custo bem mais elevado do que a proteína de origem vegetal, não são acessíveis a toda população.

Neste contexto, os alimentos de origem vegetal assumem significativa importância, sendo os cereais as principais fontes de proteína nos países em

desenvolvimento (JANSEN, 1978). Estes alimentos também são fontes significativas de proteínas (OLIVEIRA *et al.*, 2003). A digestibilidade da proteína dos alimentos de origem vegetal é menor devido a sua estrutura, que a faz mais resistente à ação das enzimas proteolíticas e a presença de certos fatores antinutricionais (PORRES *et al.*, 2002). O tratamento térmico é largamente utilizado para reduzir os fatores antinutricionais termolábeis que interferem no aproveitamento da proteína (LIENER; KAKADE, 1980).

Apesar das proteínas vegetais apresentarem aminoácidos limitantes, as dietas incluem vários alimentos que se complementam. As misturas de cereais com leguminosas ingeridas na mesma refeição como o feijão e o arroz, típico prato brasileiro, apresentam valor biológico de proteína considerado bom (JOSEPH; SWANSON, 1993, 1994; DARIO; SALGADO, 1994). No entanto, para fazer estas misturas protéicas é necessário conhecer a composição de aminoácidos de cada alimento para que haja equilíbrio da mistura ingerida na mesma refeição. Não há informação científica a respeito da qualidade da proteína do pinhão.

1.5 Valor Biológico das Proteínas

Uma mistura protéica de boa qualidade ou de alto valor biológico (AVB) deve ter boa digestibilidade, quantidades adequadas de aminoácidos essenciais e de nitrogênio total (PIRES *et al.*, 2006). Na Tabela 2 pode-se ver a digestibilidade verdadeira de algumas proteínas.

As proteínas de origem vegetal apresentam menor valor biológico, devido à presença de aminoácidos limitantes, como metionina e cisteína e a baixa digestibilidade (EVANS; BAUER, 1978; SARWAR; PEACE, 1986) como consequência de compostos anti-nutricionais nas sementes como inibidores de tripsina, lectinas, fitatos, taninos e fibra dietética (JAFFÉ, 1968).

Tabela 2: Valores de digestibilidade de algumas proteínas para humanos

Fontes de proteína	Digestibilidade verdadeira (média % + DP)
Ovo	97 ± 3
Leite e queijo	95 ± 3
Carne e peixe	94 ± 3
Milho	85 ± 3
Arroz polido	88 ± 4
Trigo inteiro	86 ± 5
Trigo refinado	96 ± 4
Aveia	86 ± 7
Farinha de soja	86 ± 7

Fonte: Lajolo e Tiapegui (2000).

1.6 Métodos de Avaliação da Qualidade Nutricional de Proteínas

Para avaliar a qualidade nutricional de uma proteína, pode-se recorrer a métodos químicos e biológicos.

Nos métodos químicos, tem-se o Escore Químico (CS) que se fundamenta na análise dos aminoácidos da proteína em estudo e sua comparação com o perfil de aminoácidos essenciais, obtidos de proteínas como a albumina e a caseína, consideradas proteínas de referência, cujo valor do escore químico é de 100%. Para as proteínas animais este método fornece resultados paralelos aos do ensaio biológico. Para as de origem vegetal ele só é útil se corrigido pela digestibilidade das proteínas (PDCAAS), que normalmente é baixa. O escore químico não considera o possível excesso de aminoácidos ou a presença de fatores tóxicos ou antinutricionais, que só é detectado em testes com animais (SCHAAFSMA, 1994).

Os métodos biológicos utilizados para avaliação do valor nutritivo de uma proteína baseiam-se na resposta do organismo à ingestão da proteína em estudo. Os parâmetros utilizados para se obter o valor biológico são, usualmente, o crescimento ou as alterações de nitrogênio na carcaça do animal. Este representa a

quantidade de nitrogênio da proteína ingerida que é utilizada pelo organismo (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1989).

Para compensar as limitações do cálculo químico, o método mais simples para determinação da qualidade da proteína é o Coeficiente de Eficácia Protéica (CEP) ou *Protein Efficiency Ratio* (PER). Esta técnica compara o crescimento de ratos alimentados com determinada proteína teste com o crescimento dos animais experimentais submetidos a uma dieta com proteína de referência, como a caseína, por exemplo. O PER é determinado de acordo com AOAC (1975), com a seguinte fórmula:

$$\text{PER} = \frac{\text{Variação de peso (g)}}{\text{Proteína ingerida (g)}}$$

A Razão Protéica Líquida (NPR), é determinada de acordo com Friedman (1996), no décimo dia de experimento, levando-se em consideração o ganho de peso do grupo teste, mais a perda de peso do grupo com dieta aprotéica em relação ao consumo de proteína do grupo teste. De acordo com a equação:

$$\text{NPR} = \frac{\text{ganho de peso do grupo teste (g)} - \text{perda de peso aprotéico (g)}}{\text{proteína consumida pelo grupo teste}}$$

1.7 Inibidores de Tripsina

Alimentos de origem vegetal apresentam fatores antinutricionais como hemoaglutininas, urease e inibidores enzimáticos. Algumas plantas, possuem inibidores de tripsina, que prejudicam a digestão, resultando em aumento da secreção das enzimas digestivas tripsina, quimiotripsina e elastase, como mecanismo compensatório pela perda devido à complexação destas com os inibidores (KENEDY, 1995; KENEDY, 1998; LAJOLO; TIAPEGUI, 2000).

No rato, a hiperestimulação das enzimas digestivas é provocada pelo aumento da liberação do hormônio colecistoquinina (CCK) pelas células endócrinas do jejuno. CCK é o mediador entre o pâncreas e a tripsina. As enzimas digestivas secretadas acabam sendo eliminadas nas fezes, representando perda endógena de

aminoácidos sulfurados. Como a proteína das leguminosas é deficiente nestes aminoácidos, aumenta o impacto nutricional destes inibidores (KENEDY, 1998).

O efeito negativo dos inibidores de proteases sobre o valor nutricional de leguminosas cruas, não resulta apenas na redução da digestão protéica no trato gastrointestinal, mas também induz a hipertrofia e hiperplasia pancreática (LIENER, 1994).

Os inibidores de proteases são encontrados em grande variedade de vegetais, incluindo a maioria das leguminosas, e estão associados aos mecanismos de defesa da planta. Esses inibidores podem ser divididos em duas classes principais: os do tipo Kunitz e os do tipo Bowman-Birk (LAJOLO; GENOVESE, 2000).

Os inibidores do tipo Kunitz, possuem peso molecular em torno de 20.000 Da, com duas pontes dissulfeto e são específicos para a tripsina, estando presentes principalmente nas leguminosas mais primitivas. Os da família Bowman-Birk estão presentes nas leguminosas mais avançadas, seu peso molecular varia de 6.000 a 10.000 Da, com alta percentagem de ligações dissulfeto e capacidade de inibir tanto a quimiotripsina como a tripsina simultaneamente em sítios de ligação independentes. Várias isoformas têm sido isoladas e caracterizadas, apresentando diferenças na seqüência de aminoácidos, mobilidade eletroforética e especificidade. Condições como o cozimento convencional, em panela aberta ou de pressão, são geralmente suficientes para inativar significativa ou completamente os inibidores de leguminosas (KENEDY, 1995; BRESSANI, 1993).

O inibidor Kunitz da soja apresenta menor termoestabilidade em relação aos inibidores do tipo Bowman-Birk. Apesar desse último apresentar uma estrutura mais compacta que a do Kunitz e ser mais termoestável quando isolado, as atividades residuais encontradas em produtos processados de soja parecem ocorrer devido ao inibidor Kunitz (LAJOLO; GENOVESE, 2000; KENEDY, 1995).

Embora os inibidores de tripsina geralmente apresentem elevada atividade em leguminosas, como o feijão e a soja (SGARBIERI e WHITAKER, 1982), a atividade destes inibidores enzimáticos tem sido descrita em uma série de outras espécies desta família como ervilha e lentilha (ZHAO et al., 2005).

CAPÍTULO 2 – RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na forma de um artigo científico a ser submetido para publicação no periódico *Journal of Nutritional Biochemistry*. Os experimentos foram conduzidos para avaliar o valor nutricional da proteína da farinha de pinhão adicionada em dietas experimentais, substituindo 20% da proteína caseína da dieta pela proteína da farinha de pinhão submetida a tratamentos térmicos de 50°C (dieta PF50) e 80°C (dieta PF80), ambos por 16 horas e sem tratamento térmico (dieta NATPIN).

**Artigo Científico: Nutritional Evaluation Of Araucaria Angustifolia Seed Flour
As A Protein Complement For Growing Rats**

Danielle M.C. Leite, Erna V. de Jong, Caciano P.Z. Noreña, Adriano Brandelli*

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Brasil

* Corresponding author: ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto
Alegre, Brazil; fax: +55 51 3316 7048; e-mail: abrand@ufrgs.br

ABSTRACT

The seeds of *Araucaria angustifolia*, namely “pinhão”, are consumed in South and Southeast of Brazil, like flour in regional dishes or baked. There is relatively few information about the chemical composition and nutritional value of the seed and its flour. In this work, “pinhão” flour obtained by different heat treatments was evaluated as an additive in biological experiment for growing rats. Wistar rats were fed five experimental diets (n=6) containing different protein sources: only casein (CAS), diet with 80% casein supplemented with 20% (w/w) “pinhão” flour (PF) protein without heat treatment (NATPIN), considering 33.1 ± 1.4 g of protein/kg of this flour, diet with 80% casein and 20% PF dried at 50°C for 16 hours (PF 50), considering 49.2 ± 0.6 g of protein/kg of this flour and diet with 80% casein and diet with 20% PF dried at 80°C for 16 hours (PF80), considering 50.5 ± 0.8 g of protein/kg of this flour and one aprotic diet (APROT). Values for weight gain, feed ingest, Protein Efficiency Ratio (PER) and Net Protein Ratio (NPR) were similar for diets CAS and PF80, and according to this, the Protein Digestibility Corrected Amino acid Score (PDCAAS) of PF80 was the highest of all the “pinhão” flours tested. The Chemical Score (CS) of “pinhão” flour showed similarity to the results found for other cereals, being lysine the limiting amino acid, followed by histidine. Lowest values for all nutritional parameters were observed for diets complemented with “pinhão” flour. “Pinhão” flour heated at 80°C for 16 hours and used as supplementary in diet had the most similar results in all nutritional parameters to casein-based diets, and can be used as complementary source, substituting until 20% of a high biological value protein in food formulations.

Key words: “pinhão”; diet; digestibility; nutritional value; rat; trypsin inhibitor, vegetable protein; PDCAAS.

1. Introduction

The Brazilian pine *Araucaria angustifolia* (syn. *Araucaria brasiliensis*) is the only native conifer of economic importance in Brazil, but timber exploration reduced dramatically this tree. Only 2-4% of the original population still exists [1].

The seeds of *A. angustifolia*, namely “pinhão”, are eaten by several animal species, mainly birds and rodents, and are also frequently consumed by humans particularly in the autumn and winter seasons in the South and Southeast of Brazil [2]. Brazilian natives have consumed baked “pinhão” for a long time, and especially during winter, “pinhão” was their mainly food [3].

A very resistant coat and an internal membrane cover the seed, which are removed after cooking. The eatable part presents a hard texture when raw, but soft when cooked. The seed is generally cooked in water, but is also used as flour in regional serving dishes. “Pinhão” flour can be used for the elaboration of cakes, bread and cookies, however it is only home-made produced since it has a limited commercial demand. In the regions where this tree exists, the preparation of cooked “pinhão” preserve in salt and vinegar is a common practice. Despite these seeds are consumed for a long date, few information about the chemical composition and nutritional properties is available [4]. Recently, more detailed studies on the chemical composition of “pinhão” were described. “Pinhão” is a good source of starch and dietary fiber and presents lower amounts of protein, lipids and soluble sugars and has a low glycemic index [3]. “Pinhão” starch has been characterized, showing attractive physicochemical and rheological properties for utilization in food industry [5]. “Pinhão” also contains several flavonoids that present potential scavenging properties against oxidative damage to biomolecules [6]. Polyphenols are widely

distributed in the plant kingdom and may have important beneficial roles in human health, probably associated with their antioxidant activities [7, 8].

Plant foods frequently show antinutritional factors such as inhibitors of digestive enzymes, lectins and urease [9, 10]. Indeed, the presence of lectins has been described in pinhão [11]. In addition, vegetable proteins often display limiting amino acids, thus diets must include complementary protein source to supply such deficiency. Effectively, some mixtures like beans and rice, a typical Brazilian meal, may result in a good protein biological value [12, 13, 14].

There are studies about “pinhão” starch, and inhibitors like lectins, but we didn't find works about the protein fraction and proteases inhibitors for this product. Considering that nutritional aspects of the use of “pinhão” flour in food formulations has never been evaluated, the aim of this study was to evaluate the flour produced from seeds of *Araucaria angustifolia* as protein complementary source in diets for growing rats.

2. Materials and methods

2.1. *“Pinhão” seeds*

“Pinhão” seeds were obtained from a local market in Porto Alegre, Brazil. The weight of the seeds varied between 7 and 10 g each. The seeds were selected eliminating all germinating seeds or those presenting any fungal or larval contamination. Selected seeds were washed with tap water, dried for two days at room temperature ($24 \pm 4^\circ\text{C}$), placed in polyethylene bags and stored at 8°C until used.

2.2. *“Pinhão” flour*

The seeds were longitudinally cut and dehulled, seed pulp was sliced into 3 parts resulting in semi-circles of about 5 mm. This material was separated into three parts, which received different treatments. One part was powdered and incorporated in the diets without any thermal treatment (NATPIN). A second part was dried at constant temperature 50°C (PF50) in a circulating air drier for 16 h, and the third part was dried at 80°C (PF80) in the same drier. After drying the seeds were milled at 0.5 mm particle size and the flours were stored in sealed polyethylene bags in a dry place.

2.3. *Analytical methods*

Total nitrogen content was determined in food and feces according to the micro

Kjeldahl's method [15], using mineralization (Block Digestor Kjeldatherm, Gerhardt, Bonn, Germany), distillation units (Marconi, Piracicaba, Brazil) and titration units (Schott-Geräte GmbH, Mainz, Germany). Crude protein was calculated as $N \times 6.25$ for diets and feces and $N \times 5.75$ for "pinhão". Moisture content was determined by drying to constant weight in an oven at $105 \pm 1^\circ\text{C}$. Total fat was determined by extraction with petroleum ether by the Soxhlet method [15]. Crude fiber was determined as insoluble organic residue after acid and alkaline digestion [16].

2.4. Amino acid composition

Determination of amino acid composition of the ground samples of PF50 and PF80 was performed at Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (UNESP, Ribeirão Preto, Brazil). Amino acid analysis was performed by ion-exchange chromatography [17]. The amino acids were obtained by peptide hydrolysis with 6 M HCl at $110 \pm 1^\circ\text{C}$ for 22 h and purified with Amberlite IR-120. Tryptophan was determined separately after hydrolysis was carried out in 4M LiOH at $110 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h as described by Penke *et al.* [18].

2.5. Chemical Score of amino acids (CS) and Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)

To calculate the CS, the amino acid composition (mg/g) of the "pinhão" flour samples was compared to the standard amino acid composition [19].

$$\text{CS} = \text{tested protein (mg/g)} / \text{standard protein (mg/g)}.$$

The PDCAAS was determined comparing the limiting essential amino acid profile

of the food, corrected for digestibility, to the FAO/WHO 2-5 year old essential amino acid requirement pattern. All proteins with PDCAAS of 1.0 are high-quality proteins, any score above 1.0 is rounded down to 1.0 for further calculations [20].

2.6. *Experimental diets*

The experimental diets were formulated according the AIN-93G, for growing rodents [21]. The composition is detailed in Table 1. Five protein formulations were tested: only casein (CAS), diet with 80% casein supplemented with 20% (w/w) “pinhão” flour (PF) protein without heat treatment (NATPIN), diet with 80% casein and 20% PF dried at 50°C for 16 hours (PF 50), diet with 80% casein and diet with 20% PF dried at 80°C for 16 hours (PF80) and one aprotic diet (APROT). Soybean protein and soybean oil were from Bunge (Esteio, Brazil), casein and cellulose were from Farmaquímica (São Paulo, Brazil), vitamin mix was from Roche (São Paulo, Brazil) and mineral mix was prepared according AIN-93G [21].

2.7. *Animals and experimental design*

Experimental design consisted of five complete random blocks. Thirty 3-week-old Wistar albino rats (recently weaned) with an initial mean live weight of 50 g were used. The animals were divided into five groups and kept in individual cages designed for separate collection of feces. The cages were placed in a well-ventilated, thermostatically controlled $22 \pm 2^\circ\text{C}$ room with 12 h light/dark periods. Before 3 days adaptation period to the diets, each group consumed *ad libitum* one of the experimental diets made up of different protein sources for a period of 28 days, which consisted of 7 days during which feces were collected on alternated days and stored

at -21°C until analyzed, and until 28 days were complete, daily food intake was determined by weighing the amounts of diet given, refused and spilled. Live weight was recorded daily. Throughout the trial, all rats had free access to water. This work followed the animal welfare guidelines of American Veterinary Medical Association [22] and was approved by the Ethics Research Committee of the University (Protocol 2005527). Animals were killed under ketamine anesthesia. Adequacy of anesthesia was tested by the absence of withdrawal response to toe pinching. The abdominal surface was shaved and the skin cleansed, and the organs were taken out through a cavity opened along *striae alba*.

2.8. *Histological analysis*

The liver and pancreas of all animals was removed and weight. Two organs from each experimental group were prepared for histological analysis. Pieces were fixed in 10% (w/v) formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 6.5 for 3 days. After this time, blocks were dehydrated and paraffin-embedded, and subsequently sectioned and stained. Histological sections were done with 3-5 mm thick, deparaffined, and stained with eosin-haematoxylin. Sections were analyzed in a bright field microscope at Laboratory of Veterinary Pathology (Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brazil).

2.9. *Biological indices*

True digestibility values were obtained by subtracting the endogenous excretion corrected for the amount of diet consumed from the apparent fecal losses [23]. The

Protein Efficiency Ratio (PER) and Net Protein Ratio (NPR) were calculated as follows: $PER = \text{gain in body weight (g)} / \text{protein consumed (g)}$; $NPR = (\text{weight gain of TPG} - \text{weight loss of NPG}) / \text{protein consumed (g)}$, where TPG = test protein group, and NPG = non protein group [24].

2.10. *Protein extraction*

Protein extraction of “pinhão” flour was performed by a modification of the method of Tremacoldi and Pascholati [25]. Samples of 10 g were added to 50 ml of 150 g/L NaCl and stirred for 30 min at room temperature (25°C). This material was centrifuged at 10,000 x g for 30 min at 4°C. The supernatant was extracted with 4 vol of cold acetone, stand for 5 min in an ice bath and then centrifuged at 10,000 x g for 30 min at 4°C. The resulting pellet was resuspended with 50 mM Tris pH 8.2 containing 20 mM CaCl₂ and stored at -18°C until analyzed for antinutritional factors.

2.11. *Trypsin inhibitor activity*

Trypsin inhibitor activity (TIA) was determined according to the method of Kakade et al. [26]. Samples (200 µl) of each extract were mixed into triplicate sets of test tubes with 500 µl of substrate BAPNA (4 mg/ml DMSO) diluted 10X with 50 mM Tris buffer (pH 8.2) containing 20 mM CaCl₂, previously heated to 37°C. Then 200 µl of trypsin solution (0.4 mg/ml in the same buffer) was added to each test tube. The tubes were incubated at 37°C for 10 min and the reaction was stopped with 100 µl of 30% (v/v) acetic acid. The tubes were centrifuged for 5 min at 10,000 x g and the absorbance at 410 nm was measured in the supernatants. The control representing

100% of enzymatic activity was obtained with the reaction mixture, without the protein extract, the buffer solution was used to adjust the volume. One trypsin unit (TU) was arbitrarily defined as an increase of 0.01 absorbance units at 410 nm per 1 ml of the reaction mixture. Trypsin inhibitor activity (TIU) is expressed in terms of trypsin units inhibited.

2.12. *Statistical analysis*

Experimental data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's highly significant difference test [27]. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. *Chemical composition of “pinhão” flours*

The protein, fat and fiber composition of “pinhão” flour was determined to equilibrate this component on the test diets (Table 2). The products receiving thermal treatment showed around 50 g/kg of crude protein when PF had 33 g/kg. The heat increased total fat.

3.2. *Amino acid composition*

The amino acid composition of “pinhão” flours are presented in Table 3. The product is rich in glutamate, aspartate and arginine residues and contains minor amounts of histidine and lysine. The percentage of amino acids involved in the proteolytic breakdown by trypsin-like (Lys and Arg), chymotrypsin-like (Tyr, Phe, Leu, Met) and elastase-like (Ala, Gly, Ser) proteases were 11.66, 18.84 and 15.03, respectively.

The amino acid composition of the PF50 product was similar to that of PF80, and it shows higher amount of the essential amino acids isoleucine, leucine, threonine, triptophan and valine (Table 3). The amount of the sulfur-containing amino acid cysteine and methionine was similar in the PF 80 compared to the PF 50.

3.3. *Chemical Score and PDCAAS*

Results of Chemical Score and PDCAAS are presented on Table 4. The

Chemical Score showed lysine as the limiting amino acid, followed by histidine on “pinhão” flour. The Chemical Score of all the other essential amino acids was higher than 1.0. The score of the two limiting amino acids of PF80 was higher than PF50, as well as the PDCAAS of PF80 (70.13%) and PF50 (63.02%).

3.4. *Dietary intake and weight gain*

Dietary intake of “pinhão”-containing diets by growing rats was high compared with a standard casein-based diet of similar protein concentration (Table 5). A considerably increased feed intake was observed for the diet containing “pinhão” without any thermal treatment (NATPIN). The protein source in diet formulation had no significant influence in the weight gain of the animals. Similar weight gain was observed for all the diets (Table 5). The growth curves are shown in the Fig. 1. The weight gain ratio was calculated from the slopes of growth curves as 5.96, 5.93, 5.79, 5.77 g/day and the intake was 14,08, 16,25, 15,47, 22,1 g/day for diets CAS, PF50, PF80 and NATPIN, respectively. The feed intake of different diets is shown in Fig. 2.

3.5. *Digestive utilization of protein*

The addition of “pinhão” flour to the diets resulted in decreased values of PER and NPR, although these differences were only significant for PF50 and NATPIN diets (Table 5). The diets CAS and PF80 showed no significant differences despite the later have the same amount of “pinhão” protein than other “pinhão”-containing diets.

True digestibility was affected by the substitution of the protein source by 20%

“pinhão” flour, when compared with casein. Significant differences were always observed when “pinhão” protein was added as protein source, mainly in the case of the diet FP50 (Table 5).

3.6. Weight and histology of organs

The weight of some individual organs was measured (Table 6). As observed for weight gain, the protein source had no influence in the final weight of liver. Although no significant differences were observed for pancreas an increase of about 30% was observed when animals received “pinhão” in the diet (Table 6).

The microscopic analysis of the pancreas from animals eating “pinhão” showed no changes on the pancreatic cells (Fig. 3A) in comparison with the control. Cell morphology and tissue characteristics were typical of pancreatic cells (Fig. 3B).

3.7. Activity of trypsin inhibitor

The activity of trypsin inhibitor was determined in the extracted protein fraction from pinhão flours. The trypsin inhibitor activity was detected in PF50 (93,5 UIT/mg protein) and NATPIN (116,19 UIT/mg protein), but not on PF80 (Fig. 4).

4. Discussion

The flour obtained from *Araucaria angustifolia* seed was used as protein source in experimental diets, showing a comparable performance in weight gain with standard casein diet when added at 20% (w/w) complementation. Dietary intake of “pinhão”-based diets by growing rats was high compared with a standard casein-based diet of similar protein concentration. In opposition to Fernandez *et al.* [28], Hurley *et al.* [29] and Carbonaro *et al.* [30] that related deficiency of essential amino acids to low dietary intake of some vegetable-based diets leading to nutrient imbalance and a consequent decrease in weight gain.

Our results for intake can be due to the presence of reducing sugars which improve the palatability of the diet, and to support the deficiency nutrients in “pinhão” flours, the rats increased their intake. Green *et al.* [31] reported overeating of palatable sweet foods ascribed to their high energy density and their weak satiating. The sensory attribute primarily associated with carbohydrates is known to stimulate energy intake [32]. Heat treatment generally improve the nutrient availability and palatability, but, if the treatment is prolonged it can have the opposite effect [9]. Because of the lower quality protein of diets NATPIN and PF50, showed on the results, the animals increased their intake of the diet and consequently their protein intake as a compensation mechanism so that the presence of antinutritional factors and essential amino acids deficiency did not interfere in their weight gain and growth. The diet PF80 had lower intake between test diets probably because it has a better quality protein.

The product PF50 was dried at 50°C, and the heat should be less harmful to the product than PF80, which was air-dried at 80°C. In fact, the amounts of sulfur-

containing amino acids, methionine and cysteine, were similar in PF80 (32,95) and PF50 (31,82). The amino acid composition resembles that observed for cereals, like wheat and corn [33], being lysine the limiting amino acid (Table 4), but, the protein of “pinhão” seed can be considered qualitatively better, because it has only two limiting amino acids (lysine and histidine) (Table 4). Porres *et al.* [34], affirms that the determination of amino acids of foods which have undergone the early Maillard reaction may lead to overestimation of the intake of lysine and hence of the digestibility. Some of the determined lysine will be doxyketosyl lysine, which has no nutritional value to the animal.

All test diets had lower digestibility, result expected for vegetable protein. PF80 had better PER, NPR than the other two tests, suggesting superior nutritional features. The PER values were comparable to those reported for seed proteins [35, 36], fish protein [37] and casein [38]. Proteins with PER values below 1.5 are considered as low quality, between 1.5 and 2.0 as intermediate and good quality for those that PER is higher than 2.0 [24]. However, as this study has supplemented only 20% of total casein protein diet, we cannot affirm that “pinhão” has a good quality protein based only on PER and NPR results.

The PDCAAS of PF80 (70,13%) was the highest among pinhão flour tests and also when comparing to the results of Pires *et al.* [33] for other legume seeds and cereals. Although, the diet PF80 itself cannot be considered a high quality protein, because it has lysine and histidine as limiting amino acids..

According to Armour *et al.* [39], heat treatment of soya bean at temperatures of 60°C or above reduced the levels of trypsin and chymotrypsin inhibiting activity in the beans, and heat-treatment of soya bean at 80°C for 40 min significantly improved

food consumption, feed conversion and growth in rats. These are in agreement with the absence of trypsin inhibitor (TI) in PF80, which also probably improve the results of PER and NPR. According to Lajolo and Genovese [40] trypsin inhibitors cause enlargement of the pancreas (hypertrophy and hyperplasia) in rodents and birds and hyper secretion of digestive enzymes. Despite of having TIA in the diet PF50 and in the diet NATPIN, the histological analysis showed no changes in pancreatic cells, but the weight of the pancreas of all test rats was higher than the casein-feed rats. Maybe, the quantity of “pinhão” flour complemented in diets was not sufficient to cause enlargement of the pancreas.

A diet with 80% high biological value protein and 20% of “pinhão” protein has a better PDCAAS than legume seeds, being lysine and histidine the limiting amino acids. “Pinhão” flour heated at 80°C for 16 hours and used as a complement in diet had the most similar results in all nutritional parameters to casein-based diets, and can be used as complementary source of protein in food formulations.

References

- [1] Astarita LV, Floh EIS, Handro W. 2003. Changes IIA, tryptophan and activity of soluble peroxidase associated with zygotic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). *Plant Growth Regulation* 39, 113-118
- [2] Santi-Gadelha T., Gadelha C.A.A., Aragão K.S., Oliveira C.C., Mota M.R.L., Gomes R.C., Pires A.F., Toyama M.H., Toyama D.O., Alencar A.M.N., Criddle A.N., Assreuy A.M.S., Cavada S.B., 2006. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (*Araucariaceae*) seed lectin. *Biochemichal and Biophysical Research Communications* 350, 1050-1055.
- [3] Cordenunsi, B.R., Menezes, E.W., Genovese, M.I., Colli, C., Souza, A.G., Lajolo, F.M., 2004. Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3412-3416.
- [4] Cladera-Olivera F, Pettermann A.C., Noreña C.P.Z., Wada K., Marczack L.D.F. 2007. Thermodynamic properties of moisture desorption of raw pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds). *International Journal of Food Science and Technology*; In Press.
- [5] Bello-Pérez, L.A., Garcia-Suárez, F.J., Méndez-Montealvo, G., Nascimento, J.R.O., Lajolo, F.M., Cordenunsi, B.R., 2006. Isolation and characterization of starch from seeds of *Araucaria brasiliensis*: a novel starch for application in food industry. *Starch* 58, 283-291.
- [6] Yamaguchi, L.F., Vassão, D.G., Kato, M.J., Di Mascio, P., 2005. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. *Phytochemistry* 66, 2238-2247.
- [7] Siddhuraju P, Becker K. 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L) walp.) seed extracts. *Food*

Chemistry 101, 10-19.

- [8] Wang KJ, Yang CR, Zhang YJ. 2007. Phenolic antioxidants from chinese toon (fresh young leaves and shoots of *toon a sinensis*). Food Chemistry 101, 365-371
- [9] Oliveira, L., Canul, R.R., Pacheco, F. P., Cockburn, J., Soldani, F., McKenzi, N.H., Duncan, M., Olvera-Novoa, M.A., Grant, G., 2003. Nutritional and Physiological Responses of young growing rats to diet containing raw cowpea seed meal, protein isolate (globulins) or starch. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 319-325
- [10] Yamada. T., Moriyama, R., Hattori, K. Ishimoto, M., 2005. Isolation of two α -amylase inhibitor gene of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) and their functional characterization in genically engeneered azuki bean. Plant Science 169, 502-511
- [11] Datta, P.K., Figueroa, M.O.D.C., Lajolo, F.M., 1993. Chemical modification and sugar binding properties of two major lectins from pinhão (*Araucaria brasiliensis*) seeds. J. Agric. Food Chem. 41, 1851-1855.
- [12] Joseph E., Swanson, B.G., 1994. Protein-Quality of idli, fermented steamed cakes prepared from beans (*Phaseolus vulgaris*) and rice. Nutrition Research 14, 553-568.
- [13] Joseph E., Swanson, B.G., 1993. Growth and nitrogen retention of rats feed bean (*Phaseolus vulgaris*) and rice diets. Food Research International 26, 261-269.
- [14] Dario, A.C., Salgado, J.M., 1994. Supplementation of irradiated and monoirradiated cowpea bean (*Vigna-unguiculata* L. walp) protein with cereal proteins-supplementation of soup with a protein blend of appropriate nutritional-value. Plant Foods for Human Nutrition 46, 213-219.

- [15] AOAC. 1995. Official methods of analysis, procedure 960.52, 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- [16] Brasil. Portaria, n. 108, 4 set. 1991. Normas gerais de amostragem para análise de rotina. Método número 11 – Fibra Bruta. Diário Oficial [República Federativa do Brasil], Brasília, p.19813, 19817.
- [17] Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S., 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30, 1190-1206.
- [18] Penke, B., Ferenczi, R., Kovacs, K., 1974. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. Anal. Biochem. 60, 45-50.
- [19] Food and Agriculture Organization / World Health Organization. 1985. Informe de una reunión consultiva conjunta FAO/WHO/UNU de expertos. Necesidades de energia y de proteínas. Ginebra, p.220
- [20] Henley EC, Kuster JM, 1994. Protein Quality Evaluation by Protein Digestibility Corrected Amino acid Scoring. Food Technology. 4, 74-77.
- [21] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey JC. 1993. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. J Nutr. 123:1939-51.
- [22] AVMA. 2000 Report of the AVMA panel on euthanasia. J Am Vet Med Assoc; 218, 669-696.
- [23] Wolsac A.; Bressan R.; Brenes R.G. 1981. A Comparison of in Vivo and in Vitro Estimates of Protein Digestibility of Native and Thermally Processed Vegetable Protein. Qualitas Plantarum: Plant Food for Human Nutrition. The Hague. 31, 31-43.
- [24] Friedman M. 1996. Factors value of proteins from different food sources. A

- review. *J Agric Food Chem*; 44, 6-29.
- [25] Tremacoldi, C.R., Pascholati, S.F., 2004. Trypsin inhibitor from roots of *Eucalyptus urophylla*. *Fitopatologia Brasileira*. 29, 134-140.
- [26] Kakade, M.L., Rackis, J.J., Mcghee, J.E., Puski, G. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry* 51, 376-382.
- [27] Rosner B. 1995. *Fundamentals of Biostatistics*. Duxbury Press, Pacific Grove, CA, USA.
- [28] Fernández M, López-Jurado M, Arand P, Urbano G. 1996. Nutritional assessment of raw and processed faba bean (*Vicia faba* L) cultivar *Major* in growing rats. *J Agric Food Chem*; 44, 2766-2772.
- [29] Hurley C., Richard D., Deshaies Y., Jacques H., 1998. Soy protein isolate in the presence of cornstarch reduces body fat gain in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 76, 1000-1007.
- [30] Carbonaro M, Cappelloni M, Nicoli S, Lucarini M, Carnovale E. 1997. Solubility-digestibility relationship of legume proteins. *J Agric Food Chem*; 45, 3387-3394.
- [31] Green SM, Burley VJ, Blundell JE, 1994. Effects of fat-and sucrose containing foods of the size of eating episodes and energy intake in lean males: potential for causing overconsumption. *European Journal of Clinical Nutrition*. 48: 547-555.
- [32] Stubbs RJ, Mazlan N, Whybrow S, 2001. Carbohydrates, Appetite and Feeding Behavior in Humans. *Journal of Nutrition*. 131: 2775S-2781S.
- [33] Pires, C.V., Oliveira M.G.A., Rosa J.C., Costa N.M.B., 2006. Qualidade Nutricional e Escore Químico de Aminoácidos de diferentes fontes protéicas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 179-187.
- [34] Porres J.M., Urbano G., Fernandez-Fígares I., Pietro C., Pérez L., Aguilera J.F.

2002. Digestive utilization of protein and amino acids from raw and heat lentils by growing rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82, 1740-1747.
- [35] Chavan, U.D., McKenzie, D.B., Shahidi, F., 2001. Protein classification of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chem.* 75, 145-153.
- [36] Bhagya, S., Sastry, M.C.S., 2003. Chemical, functional and nutritional properties of wet dehulled niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) seed flour. *Lebensm. Wiss. Technol.* 36, 703-708.
- [37] Abdul-Hamid, A., Bakar, J., Bee, G.H., 2002. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chem.* 78, 69-74.
- [38] Satterlee, L.D., Marshall, H.F., Tennyson, J.M., 1979. Measuring protein quality. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56, 103-109.
- [39] Armour J.C., Perera R.L.C., Buchan W.C., Grant G. 1998. Protease Inhibitors and Lectins in Soya Beans and Effects of Aqueous Heat-Treatment. *J Sci Food Agric* 78, 225-231
- [40] Lajolo FM, Genovese MI. 2002. Nutritional Significance of Lectins and Enzyme Inhibitors from Legumes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6592-6598.
- [41] Astarita LV, Floh EIS, Handro W. 2003/4. Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. *Biologia Plantarum* 47, 53-59.

Table 1

Ingredients and chemical composition of experimental diets

	Diets (g/kg)				
	CAS	FPIN50	FPIN80	NATPIN	APROT
“Pinhão” flour	-	412,63	400,83	612,81	-
Casein	134,22	109,03	108,67	108,84	-
Sucrose	100	101,57	101,24	101,4	100
Soybean oil	70	61,77	61,69	69,08	70
Cellulose	50	44,44	47,45	38,66	50
Mineral mix (AIN-93G-MX)	35	35,55	35,43	35,49	35
Vitamin mix (AIN-93G-VX)	10	10,16	10,12	10,14	10
L-cystine	2,63	2,67	2,66	2,66	-
Choline bitartrate	2,5	2,54	2,53	2,53	-
Terbutyl hydroquinone	0,01	0,01	0,01	0,01	-
Corn starch	q.s.q.	q.s.q.	q.s.q.	q.s.q.	q.s.q.

Feed formulation according AIN-93G for growing rodents (Reeves *et al.* [21]).

Table 2

Chemical composition of “pinhão” flours (g/kg)

	Crude fiber	Total fat	Protein	Moisture
PF50	15.4 ± 2.8	22.9 ± 1.1	49.2 ± 0.6	98.01 ± 0.1
PF80	8.2 ± 2.5	23.1 ± 1.0	50.5 ± 0.8	30.0 ± 0.1
NATPIN	19.8 ± 0.5	13.2 ± 0.4	33.1 ± 1.4	467 ± 2.0

Table 3

Amino acid composition of different “pinhão” flours.

Amino acid	mg amino acid/g crude protein	
	FPIN50	FPIN80
Ala	47,73	47,53
Arg	68,18	78,95
Asp	138,64	129,39
Cys	6,82	8,77
Glu	184,09	179,82
Gly	50	48,25
His	15,91	17,54
Ile	40,91	39,47
Leu	77,27	72,37
Lys	43,18	46,05
Met	25	24,18
Phe	56,82	54,82
Pro	50	48,25
Ser	54,55	52,63
Thr	40,91	39,47
Tyr	34,09	37,28
Trp	15,91	15,35
Val	68,18	67,98
Met + Cys	31,82	32,95
Phe + Tyr	90,91	92,1

Table 4

Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)

Essential Amino acids	Chemical Score	
	PF50	PF80
His	0,84	0,92
Ile	1,46	1,41
Leu	1,17	1,10
Lys	0,74	0,79
Thr	1,20	1,16
Trp	1,45	1,40
Val	1,95	1,94
Met + Cys	1,27	1,32
Phe + Tyr	1,44	1,46
TD	85,16	88,77
PDCAAS	0,6302	0,7013

TD – True digestibility

PDCAAS – Limiting amino acid X protein true digestibility, obtained from the experiment.

Table 5

Food intake, growth performance and digestive utilization of nitrogen in rats fed experimental diets.

	Diets			
	CAS	PF50	PF80	NATPIN
Weight gain (g)	156 ± 14a	156 ± 16a	152 ± 13a	155 ± 7a
Dietary intake (g)	403 ± 30a	461 ± 33b	438 ± 49ab	522 ± 55c
Feed:gain ratio	0.39 ± 0.02a	0.34 ± 0.02b	0.35 ± 0.02b	0.30 ± 0.03c
PER	3.77 ± 0.22a	3.14 ± 0.17b	3.54 ± 0.16a	2.83 ± 0.28b
NPR	5.17 ± 0.20a	4.25 ± 0.12b	4.83 ± 0.36a	2.92 ± 0.32c
True N digestibility (%)	96.6 ± 0.8a	85.2 ± 1.2b	88.8 ± 1.7c	88.8 ± 1.0c

PER, Protein Efficiency Ratio; NPR, Net Protein Ratio. Different letters in the same line indicate significant differences within the same row at $P \leq 0.05$.

Table 6

Weight of organs of rats fed experimental diets.

	Diets			
	CAS	PF50	PF80	NATPIN
Liver (g)	5.18±0.34a	4.82±0.31a	4.77±0.24a	4.63±0.59a
Pancreas (g)	0.27±0.04a	0.35±0.07a	0.36±0.09a	0.35±0.10a

Different letters in the same line indicate significant differences within the same row at $P \leq 0.05$.

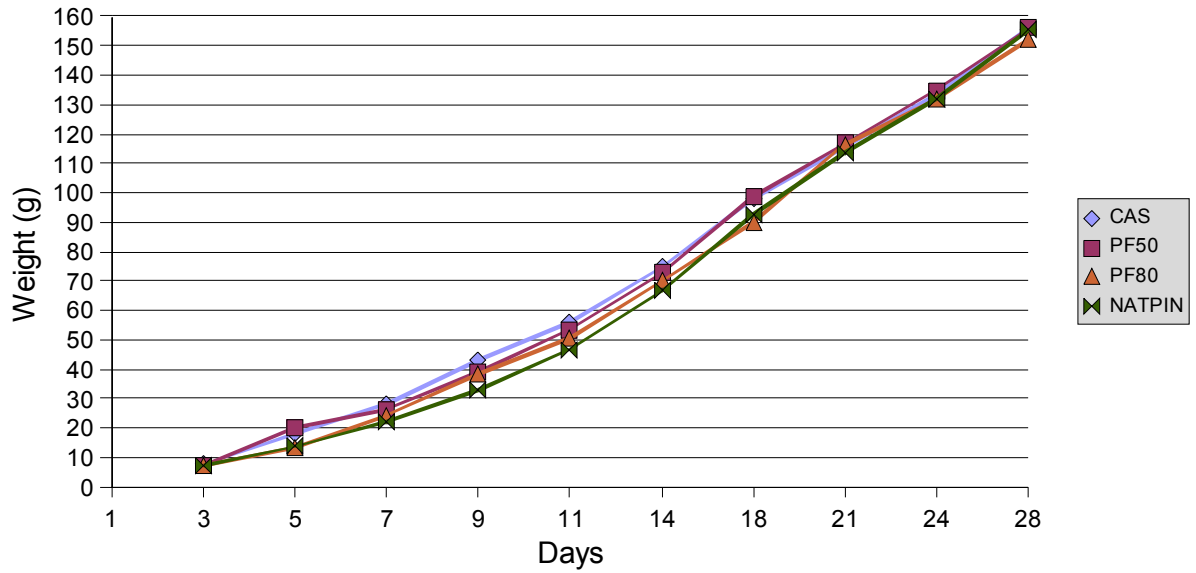


Fig. 1. Growth curves of wistar rats feeding the standard diet casein (CAS), “pinhão” flour heated at 50°C/16 hours (PF50), “pinhão” flour heated at 50°C/16 hours (PF80), and “pinhão” flour without het treatment (NATPIN). Each data point represents the mean of six animals.

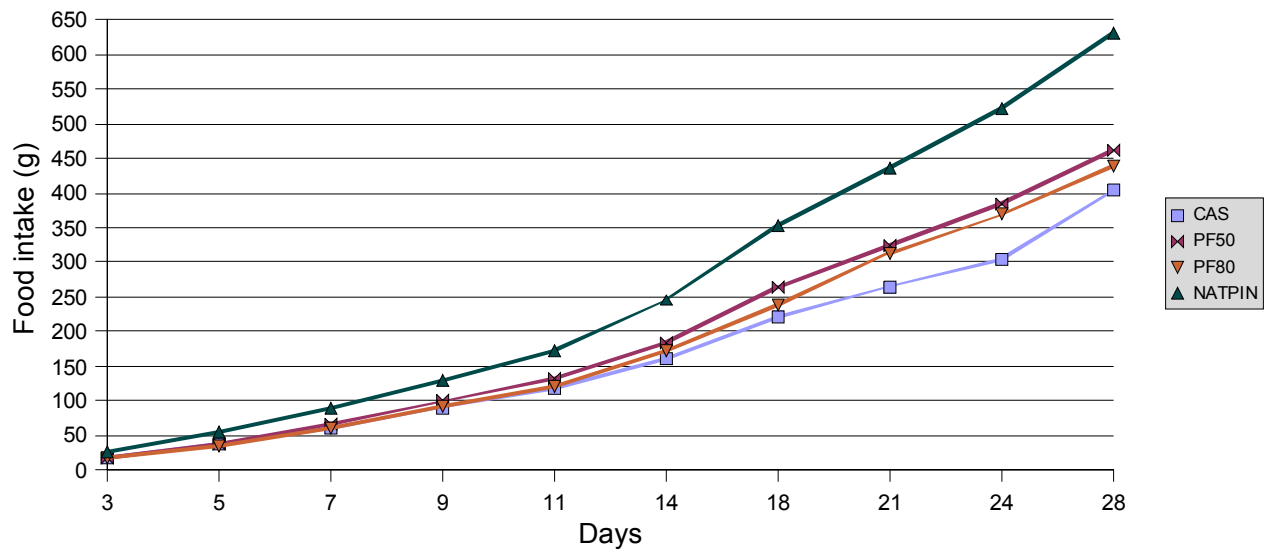
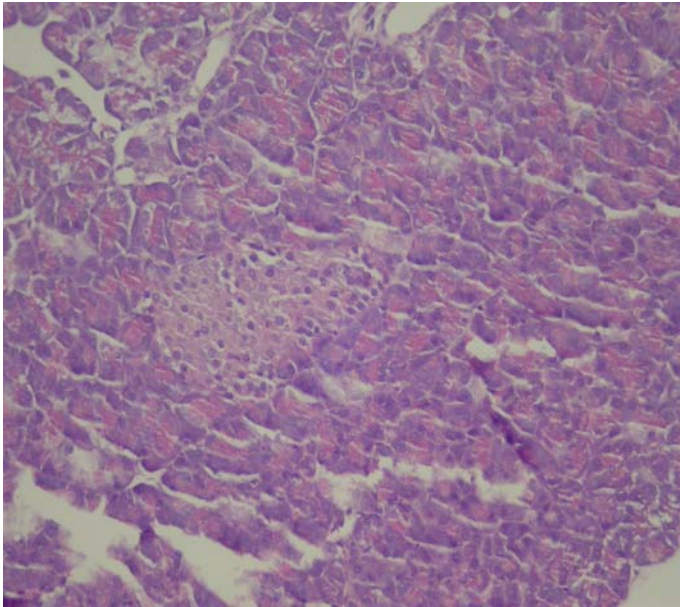
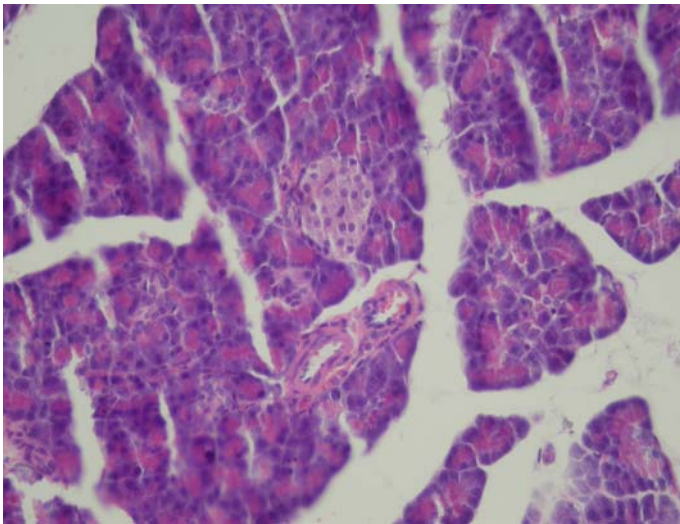


Fig. 2 - Food intake of wistar rats feeding the standard diet casein (CAS), “pinhão” flour heated at 50°C/16 hours (PF50), “pinhão” flour heated at 50°C/16 hours (PF80), and “pinhão” flour without heat treatment (NATPIN). Each data point represents the mean of six animals.



A



B

Fig 3. Histology of pancreatic cells of rats fed diet PF50 rat (A) and CAS (B)

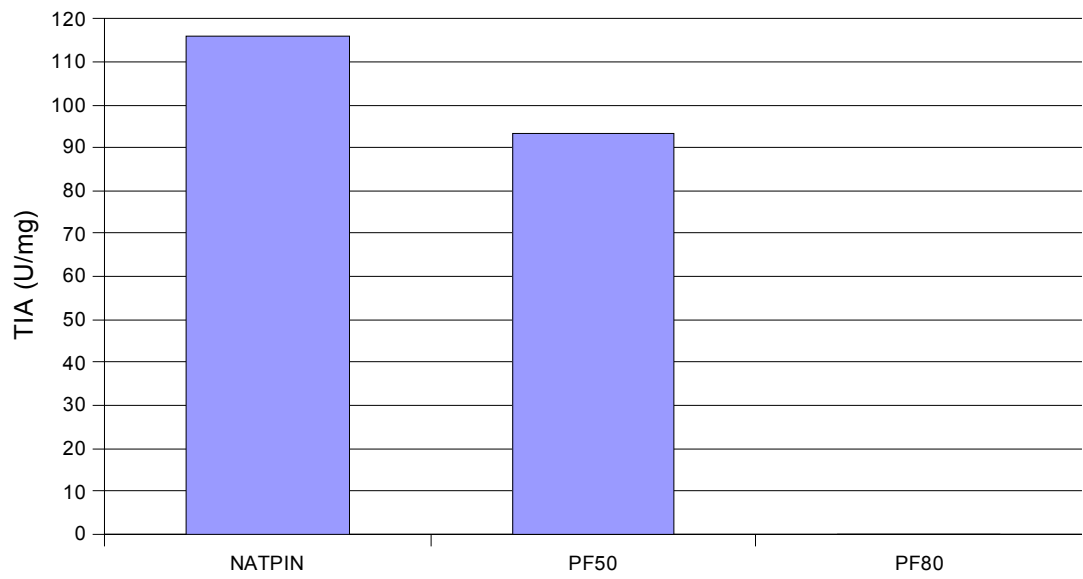


Fig. 4. Trypsin inhibitor activity of “pinhão” flour extraction

CAPITULO 3 - DISCUSSÃO GERAL

O pinheiro-do-paraná, *Araucaria angustifolia*, fornece uma fonte importante de alimento, sua semente, o pinhão. Esta semente garante a alimentação de muitas espécies animais, principalmente roedores e pássaros e também está presente no cardápio de muitas famílias no período de safra. É uma espécie ameaçada de extinção, portanto um maior conhecimento sobre seus aspectos tecnológicos e nutricionais tem forte apelo ambiental. Apesar do consumo expressivo, principalmente no Sul do país, há pouca informação científica a respeito do pinhão (CLADERA-OLIVERA *et al.* 2007). Recentemente foi descrito por Brasil *et al.* (2006), o uso da casca do pinhão como eficiente adsorvente para metais pesados, o que pode agregar valor ao produto e ir ao encontro dos esforços para preservação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a semente do pinhão, verificando a qualidade da proteína existente e a presença de inibidores de tripsina.

A farinha obtida da semente da *Araucaria angustifolia*, submetida a diferentes tipos de tratamento térmico, foi utilizada como fonte complementar de proteína, substituindo 20% da caseína, em experimento biológico, demonstrando performance similar ao resultado obtido com o grupo padrão em relação ao ganho de peso.

A ingestão diária de todos os grupos teste, com farinha de pinhão, foi significativamente maior que a do grupo padrão. Resultado contrário ao encontrado por Fernandez *et al.* (1996) que relacionou em seu estudo a deficiência de aminoácidos essenciais em alimentos vegetais a baixa ingestão da dieta.

O grupo alimentado com a dieta NATPIN obteve o maior consumo, e o grupo alimentado com a dieta PF80, o menor entre os grupos testados com farinha de pinhão. Esses resultados podem ter ocorrido devido a maior presença de açúcares redutores na farinha de pinhão sem tratamento térmico, o que melhora a palatabilidade da dieta. Green, Burley e Blundell (1994) descreveram a superingestão de alimentos doces devido a sua alta densidade energética e fraco poder de saciedade. Os atributos sensoriais primários, associados aos carboidratos são conhecidos por estimular a ingestão de energia (STUBBS; MAZLAN; WHYBROW, 2001). Outro provável fator é, pelo menor aproveitamento e menor qualidade da proteína da dieta NATPIN e PF50 demonstrados nos resultados, os

animais aumentaram a ingestão da dieta e, conseqüentemente da proteína como um mecanismo compensatório para que a deficiência de aminoácidos e a presença de fatores antinutricionais não interferissem no seu ganho de peso e no seu crescimento.

Fatores que não foram estudados neste experimento como a digestibilidade de outros nutrientes como os carboidratos ou presença de amido resistente também podem ter contribuído para ingestão significativamente maior, com ganho de peso similar.

Os resultados, obtidos através do aminograma, para os aminoácidos sulfurados foi bastante próximo na PF80 (32,95 mg/g de proteína) e na PF50 (31,82 mg/g de proteína). O perfil de aminoácidos da farinha de pinhão foi semelhante ao descrito para cereais, como o trigo e o milho (PIRES *et al.*, 2006), tendo como aminoácido limitante a lisina seguida da histidina. A proteína do pinhão substituindo 20% de uma proteína de AVB na dieta pode ser considerada de melhor qualidade, pois apesar dos aminoácidos limitantes (lisina e histidina), obteve melhor PDCAAS, quando comparado com o trigo, milho, soja e feijão (PIRES *et al.*, 2006). Segundo Porres *et al.* (2002), a determinação de aminoácidos em alimentos que não sofreram reação de Maillard pode levar a superestimar a ingestão de lisina e conseqüentemente a digestibilidade. Uma quantidade da lisina determinada será doxiquetosil-lisina, sem valor nutricional para o animal.

Dentre os grupos teste, todos apresentaram valores mais baixos para a digestibilidade, que o padrão CAS, o que era esperado para proteínas de origem vegetal. O grupo PF80 obteve melhores índices de PER e NPR do que os outros grupos teste, sugerindo a superioridade nutricional de sua farinha. Os valores de PER obtidos são comparáveis aos descritos para proteínas de sementes (CHAVAN; MCKENZIE; SHAHIDI, 2001; BHAGYA; SASTRY 2003), proteína de peixe (ABDUL-HAMID; BAKAR; BEE, 2002) e caseína (SATTERLEE; MARSHALL; TENNYSON, 1979). Entretanto, como neste estudo foi substituído apenas 20% do total da caseína pela proteína da farinha de pinhão, não há possibilidade de afirmar que o pinhão possui uma proteína de boa qualidade baseado apenas nos resultados do PER e NPR.

O PDCAAS da PF80 (70,13%) foi o mais alto entre as farinhas testadas, e, também, comparando com os resultados obtidos por Pires *et al.* (2006) para outras

leguminosas e cereais. Mesmo assim, PF80 não pode ser considerada uma proteína de alta qualidade ou alto valor biológico, pois mostrou através do aminograma, ter a lisina e a histidina como aminoácidos limitantes.

Os inibidores de proteases constituem um dos mecanismos vegetais de defesa contra microrganismos fitopatogênicos. Considera-se que eles atuem na defesa das plantas, principalmente retardando a proteólise de paredes celulares e de proteínas da membrana, reduzindo a desorganização celular e dificultando a atuação de patógenos (TREMACOLDI; PASCHOLATTI, 2004).

De acordo com Armour *et al.* (1998), o tratamento térmico da soja em temperaturas de 60°C ou acima reduz a atividade de inibidores de tripsina e quimiotripsina, inibindo a atividade em feijões, e o tratamento térmico a 80°C por quarenta minutos inibe a atividade na soja, aumentando significativamente o consumo alimentar e o crescimento dos ratos. O mesmo foi observado em nosso estudo, com a ausência de inibidores de tripsina na PF80, e melhores resultados do PER e NPR nos ratos alimentados com esta farinha.

De acordo com Lajolo e Genovese (2002), inibidores de tripsina provocam hipertrofia e hiperplasia pancreáticas em ratos e pássaros e causam hipersecreção de enzimas digestivas. Apesar da presença de inibidores de tripsina na PF50 e NATPIN, a análise histológica do tecido pancreático não demonstrou modificações nas células pancreáticas, mas o peso do pâncreas de todos os animais dos grupos teste foi, em média 30% maior que o grupo CAS, demonstrando uma tendência a hipertrofia e hiperplasia pancreáticas. Talvez, a quantidade da proteína do pinhão, 20% do total da proteína da dieta, junto ao tempo de experimento, 28 dias, não tenha sido suficiente para que ocorresse diferença significativa neste resultado.

Apesar da menor digestibilidade, menor aproveitamento da proteína, e presença de inibidores de tripsina na dieta dos grupos PF50 e NATPIN, o maior consumo das dietas que ocorreu nestes grupos funcionou como um mecanismo compensatório, havendo assim uma ingestão maior de proteínas, fazendo com que estes grupos atingissem ganho de peso similar aos outros que apresentaram proteínas de melhor qualidade de acordo com os resultados obtidos no estudo.

Foi demonstrado que uma dieta com 80% de proteína de AVB e 20% de proteína da farinha de pinhão, apesar dos aminoácidos limitantes nesta semente (lisina e histidina), possui um PDCAAS melhor que as leguminosas. PF80, utilizada como

complemento nas dietas obteve os resultados mais semelhantes em todos os parâmetros nutricionais aos encontrados para a caseína, e, portanto, pode ser utilizado como complemento em formulações alimentares.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G.H. Nutritional quality of spray dried portein hydrolysate from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chemistry**, London, v. 78, p. 69-74, 2002.
- ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V.V. **As frutas silvestres brasileiras**. Rio de Janeiro: Globo, 1998. p.204. (Coleção do agricultor)
- ARMOUR, J.C. et al. Protease Inhibitors and Lectins in Soya Beans and Effects of Aqueous Heat-Treatment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 78, p. 225-231, 1998.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington, 1975. p. 1.094.
- ASTARITA, L.V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, p. 53-59, 2003.
- AZEVEDO, L.G. de. Tipos de vegetação do Sul de Minas e Campos da Mantiqueira (Brasil). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 2, p. 225-234, 1962.
- BHAGYA, S.; SASTRY, M.C.S. Chemical, functional and nutritional properties of wet dehulled niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) seed flour. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 36, p. 703-708, 2003.
- BRASIL, J.L. et al. Statistical design of experiments as a tool for optimizing the batch conditions to Cr(VI) biosorption on *Araucaria angustifolia* wastes. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 133, p. 143-153, 2006.
- BRASIL. Portaria nº. 06-N, de 15 de janeiro de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, p. 870-872, 23 jan. 1992.

BRESSANI, R. Grain quality of common beans. **Food Reviews International**, New York, v. 9, p. 237-297, 1993.

CARVALHO, A.L. de. Contribuição ao estudo da biologia na Estação Florestal dos Pardos. **Anuário Brasileiro de Economia Florestal**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 3. p. 208-222, 1950.

CHAVAN, U.D.; MCKENZIE, D.B.; SHAHIDI, F. Protein classification of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). **Food Chemistry**, London, v. 75, p. 145-153, 2001.

CLADERA-OLIVERA, F. et al. Thermodynamic properties of moisture desorption of raw pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds). **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, 2007. In Press. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 30 jan. 2007.

CORDENUNSI, B.R. et al. Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 3412-3416, 2004.

COZZO, D. et al. Distribución fitogeográfica en la Argentina de *Araucaria araucana* y *A. angustifolia*. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS *ARAUCARIA*, 1., 1979, Curitiba. **Forestry problems of the genus *Araucaria***. Curitiba: FUPEF, 1980. p.1-3.

DARIO, A.C.; SALGADO, J.M. Supplementation of irradiated and monoirradiated cowpea bean (*Vigna-unguiculata* L. walp) protein with cereal proteins-supplementation of soup with a protein blend of appropriate nutritional-value. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht , v. 6, p. 213-219, 1994.

HOEFLICH, V.A. **Cultivo do Pinheiro-do-Paraná**. Embrapa Florestas, Colombo, PR, 2003. <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pinheiro-do-Parana/CultivodoPinheirodoParana/apresentacao.htm>> Acesso em: 09 set. 2006

EVANS, R.J.; BAUER, D.H. Studies of the poor utilization of the rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 26, n. 4, p. 779-784, 1978.

FERNÁNDEZ, M. et al. Nutritional assessment of raw and processed faba bean (*Vicia faba* L) cultivar *Major* in growing rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 9, p. 2766-2772, 1996.

FRIEDMAN, M. Factors value of proteins from different food sources: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 1, p. 6-29, 1996.

GREEN, S.M.; BURLEY, V.J.; BLUNDELL, J.E. Effects of fat-and sucrose containing foods of the size of eating episodes and energy intake in lean males: potential for causing over consumption. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 48, p. 547-555, 1994.

GUBERT FILHO, F. Proposta para a criação de um sistema de unidades de conservação da Araucária angustifolia no Estado do Paraná. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990. v. 3, p. 287-300.

JAFFÉ, W.G. Toxic factors in legumes. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 18, p.205-218, 1968.

JANSEN, G.R. Biological evaluation of protein quality. **Food Technology**, Chicago, v. 32, n. 12, p. 52-56, 1978.

JOSEPH, E.; SWANSON, B.G. Growth and nitrogen retention of rats feed bean (*Phaseolus vulgaris*) and rice diets. **Food Research International**, Barking, v. 26, p. 261-269, 1993.

JOSEPH, E.; SWANSON, B.G. Protein-Quality of idli, fermented steamed cakes prepared from beans (*Phaseolus vulgaris*) and rice. **Nutrition Research**, Tarrytown, USA, v. 14, p. 553-568, 1994.

KENEDY, A.R. The Evidence for soybean products as cancer preventive agents. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125 n. 3, p. 733S-743S, 1995.

KENEDY, A.R. The Bowman-Birk inhibitor from soybean as an anticarcinogenic agent. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 30, n. 3, p. 1406S-1412S, 1998.

LAJOLO, M.J.; TIAPEGUI, J. Proteínas e Aminoácidos. In: DUTRA DE OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. (ed.). **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 2000. Cap.3 p. 42-69.

LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Inativação dos inibidores de proteases de leguminosas: uma revisão. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 107-112, 2000.

LAJOLO, F.; NOVESE, M.I. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from Legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 6592-6598, 2002.

LEHNINGER, L.A.; NELSON, D.L.; MICHAEL M.C. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. Parte II – capítulo 5 p.82(fig.5.2), p.92(fig.5.15)

LIENER, I.E. Implications of anti nutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.

LIENER, I.E.; KAKADE M.L. **Protease inhibitors, in toxic constituents of plant stuff**. New York: Academic Press, 1980. p. 7-71.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Atheneu, 1989. Cap. 5: Proteínas, p.64-76,.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J.P. **Fichas de características das madeiras brasileiras**. São Paulo: IPT, 1989. p.418

MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. São Paulo: Grêmio Politécnico, 1972. p.620

MOURA, V.C.E.; ZUCAS, M.S. **Ensaio nutricional da proteína da soja, suplementada com farinha de castanha do Pará**. São Paulo: ABIA, 1981. p.06-17,

OLIVEIRA, L. et al. Nutritional and Physiological Responses of young growing rats to diet containing raw cowpea seed meal, protein isolate (globulins) or starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 319-325, 2003.

PIRES, C.V. et al. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 179-187, 2006.

PORRES, J.M. et al. Digestive utilization of protein and amino acids from raw and

heat lentils by growing rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, p. 1740-1747, 2002.

SARVAR, G.; PEACE, R.W. Comparison between true digestibility of total nitrogen and limiting amino acids in vegetable proteins fed to rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 116, p. 1172-1184, 1986.

SANTI-GADELHA, T. et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (*Araucariaceae*) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 350, p. 1050-1055, 2006.

SATTERLEE, L.D.; MARSHALL, H.F.; TENNYSON, J.M. Measuring protein quality. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 56, p. 103-109, 1979.

SCHAAFSMA, G. Nutritional appreciation of proteins. Report v. 94.135, **TNO Nutrition and Food Research Institute**, Zeist, Netherlands, 1994.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo: Varela, 1996. p.11-12,

SGARBIERI, V.C.; WHITAKER, J.R. Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. **Advances in Food Research**, San Diego, v. 28, p. 93-166, 1982.

SOLÓRZANO-FILHO, J.A.; KRAUS, J.E. Breve história das matas de araucária. In: INTERNATIONAL CONGRESS AND EXHIBITION ON FORESTS, 1999, Rio de Janeiro. **Forest 99**. Rio de Janeiro: Biosfera, 1999. p.37-40.

STUBBS, R.J.; MAZLAN, N.; WHYBROW, S. Carbohydrates, appetite and feeding behavior in humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, p. 2775S-2781S, 2001.

TREMACOLDI, C.R.; PASCHOLATI, S.F. Trypsin inhibitor from roots of *Eucalyptus urophylla*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 134-140, 2004.

ZANDAVALLI, R.B.; DILLENBURG, L.R.; SOUZA, P.V.D. Growth responses of *Araucaria angustifolia* (*Araucariaceae*) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 25, p.245-255, 2004.

ZHAO, Y.H. et al. Quality characteristics of spaghetti as affects by green and yellow pea, lentil, and chickpea flours. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 6, p. S371-S376, 2005.