



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**EFEITOS METABÓLICOS INDUZIDOS PELO CONSUMO DE DIETAS COM
CASEÍNA (PADRÃO) E PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE BOVINO
(ISOLADO E HIDROLISADO) USADAS COMO ÚNICA FONTE PROTÉICA
EM RATOS (WISTAR) SUBMETIDOS A TREINAMENTO FÍSICO EM
ESTEIRA**

Autora: María Inés Abecia Soria

Orientador: Prof.Dr.Celio Kenji Miyasaka

**Campinas-SP
2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

**EFEITOS METABÓLICOS INDUZIDOS PELO CONSUMO DE DIETAS COM
CASEÍNA (PADRÃO) E PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE BOVINO
(ISOLADO E HIDROLISADO) USADAS COMO ÚNICA FONTE PROTÉICA
EM RATOS (WISTAR) SUBMETIDOS A TREINAMENTO FÍSICO EM
ESTEIRA**

Autora: María Inés Abecia Soria

Orientador: Prof.Dr.Celio Kenji Miyasaka

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição-Área de Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Campinas-SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Ab33e Abecia-Soria, María Inés
Efeitos metabólicos induzidos pelo consumo de dietas com caseína (padrão) e proteínas de soro de leite bovino (isolado e hidrolisado) usadas como única fonte protéica em ratos (Wistar) submetidos a treinamento físico em esteira / María Inés Abecia-Soria. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Celio Kenji Miyasaka
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Atividade física. 2. Proteínas do soro de leite. 3. Ratos. I. Miyasaka, Celio Kenji. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Induced metabolic changes by consumption of casein (standard) and bovine milk whey protein (isolate and hydrolysate) used as the only protein source in rats (Wistar) submitted to physical training in mat

Palavras-chave em inglês (Keywords): 1. Physical activity. 2. Whey protein. 3. Rats

Área de concentração: Alimentos e Nutrição

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Celio Kenji Miyasaka

Valdemiro Carlos Sgarbieri

Janesca Alban Roman

Vera Sônia Nunes da Silva

Fernando Oliveira Catanho da Silva

Data de defesa: 30/04/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. CELIO KENJI MIYASAKA
Centro de Ciências Básicas e de Saúde
Universidade Cruzeiro do Sul-UNICSUL
Orientador

PROF. DR. VALDEMIRO CARLOS SGARBIERI
Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP
Membro

PROFA. DRA. JANESCA ALBAN ROMAN
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo.
Membro

PROFA. DRA. VERA SÔNIA NUNES DA SILVA
Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL
Membro

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. FERNANDO OLIVEIRA CATANHO DA SILVA

Departamento de Bioquímica
Instituto de Biologia-UNICAMP
Membro

PROFA. DRA. DENISE VAZ DE MACEDO

Departamento de Bioquímica
Instituto de Biologia-UNICAMP
Membro

PROF. DR. MARCELO PAES DE BARROS

Centro de Pós Graduação e Pesquisa, Química Ambiental, CBS.
Universidade Cruzeiro do Sul-UNICSUL
Membro

PROF. DR. JAIME AMAYA FARFAN

Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP
Membro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu amado pai, Carlos Abecia Navarro, pelo seu amor e apoio incondicional, pela sua coragem, força e por não desistir nesta etapa muito difícil na sua vida que está passando e que juntos conseguiremos superar.

À minha adorada Amparito Tapia V. (minha segunda mãe), pela força e apoio incondicional.

Aos dois, por tudo o que eles me forneceram em todo momento na minha formação pessoal e profissional.

*"Conhecimento real é saber a extensão da própria ignorância."
(Confúcio)*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por dar-me a saúde e força necessária para poder chegar até aqui e não desistir nos momentos difíceis.

Aos meus amados pais Carlos e Cristina por ter-me dado a vida, guiado meus passos, me encaminhar para minha vida futura, por ter-me ensinado todos meus princípios e valores. De coração, muito, muito obrigada!!!!

À minha adorada Amparito (minha segunda mãe) por tomar conta de mim e da minha família, por preocupar-se e cuidarmos a cada momento desde que minha mãe morreu. Ela faz parte de minha vida a mais de 20 anos, sempre me considerou como uma filha. Amparito, eu não tenho palavras para descrever tudo o que sinto por ti. Estou e estarei sempre infinitamente agradecida por tudo o que fizeste e fazes por mim e por minha família. MUCHAS GRACIAS Amparito!!!

À minha irmã da alma Mônica por todos os maravilhosos momentos, as conversas infinitas que tivemos, por apoiar-me sempre e por que sempre que voltei para casa, fizeste de tudo para que eu a passasse o melhor possível, do fundo do meu coração. Muito Obrigada!!!

Aos meus irmãos (Max, Luis Javier e Victor Hugo (TuTito)) e à minha adorada família por tudo o apoio incondicional em todo momento e que a pesar da distância sempre estiveram ao meu lado muito, Muito Obrigada!!!!

Ao meu querido e amado esposo Alexis por estar sempre ao meu lado apoiando-me, dando-me força, coragem em todo instante, por tolerar meus dias difíceis, por todos os minutos que passamos juntos, pelo seu amor incondicional e sua compreensão infinita, por tudo, quero dizer Muchísimas Gracias mí amor (“amorzinho”).

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), à Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) e em especial ao Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN) por ter-me acolhido nas suas instalações e proporcionar-me todo o material que foi necessário na realização deste trabalho.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos, Muito Obrigada!!!

Ao meu orientador Professor Celio Kenji Miyasaka, com quem aprendi muitas coisas, meu mais sincero agradecimento pela sua contribuição e aporte na minha vida profissional, por ter confiado em mim e aceitar-me como sua orientada.

Aos membros da banca pela sua imensa ajuda e aporte tanto na correção dos bonecos como de forma particular.

*Ao professor Jaime Amaya-Farfán por contribuir com minha formação profissional (mestrado e doutorado), pela doação das fontes protéicas utilizadas na realização deste trabalho. **Meu sincero muito obrigada!!!!***

*Ao pessoal, do Laboratório de Bioquímica do Exercício (LABEX) (Fernando, Rubinho, Renato, Rodrigo) por toda a ajuda prestada nos momentos que precisei e em especial à professora Doutora Denise Vaz de Macedo pela sua disposição e tempo dedicado em todos os momentos que foram necessários. **Muito obrigada.***

*Ao Cosme Perota (Secretaria de Pós- Graduação) pela sua ajuda sempre que precisei **Muito obrigada!!***

Aos funcionários do DEPAN por toda a ajuda oferecida e carinho que recebi em todo momento que precisei. Um especial agradecimento a Fátima Valentino (Fatiminha) pela sua valiosa ajuda prestada sempre. Ao Francisco Carraro (Chico) pela sua paciência e disposição para me ensinar a mexer com os diferentes aparelhos que usei durante o desenvolvimento da minha tese. À Maria Aparecida Vasconcelos Osteti (Cidinha) Secretária de DEPAN, uma pessoa muito querida que sempre esteve disposta para me ajudar. A minhas queridas técnicas dos diferentes laboratórios Carla De Marco Greghi, Eliana Maria Pettirossi Motta, Iara Fagnani Honório e Soely Maria Pissini Machado muito obrigada pela sua paciência, dedicação e cuidado que tiveram para me ensinar tantas coisas.

*À minha querida Erenice dos Santos (Nice) pelo seu carinho incondicional e por sempre estar aí presente. **Obrigada de coração***

*À minha querida Maria Susana Correias Cunha Correa de Alves (minha mãe brasileira) a quem estarei infinitamente agradecida porque sem me conhecer deu um voto de confiança e ajudou-me com as cartas de manutenção e por estar presente sempre que precisei. **Meu mais sincero agradecimento.***

*A todos os estagiários (Isabela, Charles, Ellen, Elisa, Prísila) que fizeram parte deste trabalho e que me ajudaram nas diferentes fases da realização da tese, de coração **muito muito abrigada.** E em especial à minha querida Juliana Horita quem me ajudou a em todo momento (sábados, domingos e até feriados) e de quem aprendi muito, **meu mais sincero muito obrigada***

*Aos meus queridos amigos do laboratório (Claudia e Alcy, Elis e Marcelo, Fabi e Julio, Cris e família, Karen e Roni, Luciano e Dri, Pablo e em especial à Laura Cavalheiro por tantos maravilhosos momentos que compartilhados juntos dentro e fora do laboratório, por brindar-me sua amizade e por fazer muito mais agradável minha estadia aqui. **Muito obrigada!!!***

À minha querida irmãzinha **Janesca Alban Roman**, um especial agradecimento pela sua amizade incondicional, por todos os momentos que passamos juntas, pela sua ajuda e colaboração, por compartilhar comigo momentos inesquecíveis e por fazer parte de minha banca **Muito obrigada por tudo!!!**

Às minhas queridas meninas (**Alice, Dani, Glaucia, Luciane (Lu) e Paulita**) por quem sinto um imenso carinho quero lhes agradecer pelo seu carinho, amizade e afeito que sempre mostraram por mim. **Muito obrigada por tudo...**

À **Iara Carvalho** e à **Ana Claudia Coelho** por sua amizade, paciência e dedicação na realização conjunta da parte experimental da tese **um sincero agradecimento.**

À minha querida **Lucia de La Hoz** por sempre estar aí em todos os momentos, pela sua amizade incondicional. **Muito muito obrigada!!!**

À **Giovana** pelas inúmeras conversações e aportes nos resultados deste trabalho. **Obrigada!!!!**

Ao **Jonas Messias do Santos** (do Xerox) pela imensa ajuda que ele me prestou nas inúmeras vezes que precisei. **Muito obrigada!!**

Ao **personal da limpeza** que sempre manteve limpo o lugar de trabalho e os diferentes ambientes do Departamento **meu sincero agradecimento.**

A todos os meus queridos amigos (lista infinita), por fazer minha vida muito mais alegre e agradável, por todos os momentos que passamos juntos (aniversários, bem-vindas, despedidas, e diferentes comemorações) só posso dizer. **De coração Muito Obrigada.**

Finalmente a todos que de alguma maneira estiveram presentes nessa fase da minha vida **Muito Obrigada.**

RESUMO

As proteínas do soro de leite são consideradas de alto valor nutritivo. Elas têm escore químico superior às de outras proteínas de origem animal, possuem elevadas concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), com excelente balanço e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais. As proteínas de soro de leite vêm sendo largamente utilizadas pela indústria de alimentos como suplemento na alimentação de esportistas, devido às suas características fisiológicas e funcionais, destacando-se o uso dos hidrolisados, que tem sido recomendado para situações de estresse metabólico como o exercício físico em que a reposição de proteínas no organismo se torna necessária. O presente trabalho teve como objetivo avaliar alterações metabólicas induzidas pelo consumo de proteínas do soro de leite [isolado (ISL) e seu hidrolisado (HSL) com grau de hidrólise 10%] em comparação com a dieta padrão [caseína (CAS)], utilizadas como única fonte protéica em ratos submetidos ao exercício físico. Foram utilizados 96 ratos machos Wistar (~100g) divididos em grupos segundo o tipo de dieta (CAS, ISL e HSL) e a intensidade do exercício físico [treinados (T), treinados exaustos (TEX), sedentários (S) e sedentários exaustos (SEX)] durante 35 dias. Os seguintes parâmetros foram analisados: tempo de exaustão, concentração de lactato no sangue, glicogênio hepático (GH) e muscular (GM), atividade das enzimas marcadoras de lesão tecidual, incluindo lactato desidrogenase (LDH), creatina quinase (CK), alanina e aspartato aminotransferase (ALT e AST, respectivamente). Os animais alimentados com HSL nos grupos TEX e SEX conseguiram correr por muito mais tempo até atingir a exaustão em relação aos que receberam as dietas com CAS e ISL ($p < 0.05$). O tempo de exaustão em relação à dieta CAS foi 72 min maior no grupo TEX e 44 min maior no grupo SEX. A diferença no tempo de exaustão entre os animais alimentados com as dietas de HSL e ISL foi de 40 min. no grupo TEX e de 13 min no grupo SEX. A concentração de lactato dos animais alimentados com ISL e HSL foi significativamente menor em relação aos alimentados com CAS nos grupos T e S ($p < 0,05$). A concentração de glicogênio hepático dos

animais que receberam as dietas com ISL e HSL foi estatisticamente superior em comparação com os que consumiram CAS nos grupos T(46%) e S (61%). A concentração de glicogênio muscular não apresentou diferenças significativas entre as três dietas nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S). A atividade da ALT dos animais que consumiram HSL nos grupos SEX e S foi estatisticamente menor que os que receberam CAS. A atividade da AST dos animais alimentados com HSL foi significativamente menor que a dos que consumiram a dieta com CAS nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S). A atividade da CK e LDH dos ratos que receberam a dieta com HSL foi estatisticamente menor que dos alimentados com CAS em todos os grupos de treinamento exceto no grupo S.

Dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que o uso das proteínas do soro de leite [principalmente o hidrolisado (10% grau de hidrólise)] em relação à proteína padrão (CAS) como única fonte protéica em ratos submetidos a exercício físico, promoveu a) menor ganho de peso em todos os grupos, b) maior resistência à exaustão tanto no grupo TEX como no SEX, c) maior concentração de glicogênio hepático nos grupos T e S e d) maior proteção contra possíveis lesões hepáticas e musculares nos diferentes grupos estudados (TEX, SEX, T e S).

Palavras-chave: Proteína do soro de leite, hidrolisado, isolado protéico, recuperação, ratos, exercício físico, treinamento físico.

ABSTRACT

The milk whey proteins are considered to be of high nutritive value and superior chemical score in comparison to other proteins of animal origin. They have high concentrations of branched-chain amino acids (BCAA) with excellent balance and bioavailability of essential amino acids. The milk whey proteins are widely used in the food industry as supplements for sportsmen due to their physiological and functional properties, and their hydrolysates are thought to be more efficient in the recovery of debilitated organisms under pronounced catabolic state because of their great stimulation to protein synthesis. In view of the energy value of proteins in exhaustive exercise, several studies on exercise and protein metabolism have been carried out in the attempt to elucidate the proper amount of protein that must be consumed by sportsmen. The present work had the objective of evaluating the metabolic changes induced by consumption of milk whey proteins [isolate (WPI) and its hydrolysate (WPH) with hydrolysis degree 10%] used as the only protein source in comparison to the standard diet [casein (CAS)] in rats submitted to physical exercise. 96 male Wistar rats (~100g) were divided in groups according to the type of diet (CAS, ISL and HSL) and the intensity of physical exercise [trained (T), trained taken to exhaustion (TEX), sedentary (S) and sedentary exhausted (SEX)] during 35 days. The following parameters were analyzed: time of exhaustion (min.), blood lactate concentration (mmol/L), liver glycogen (LG) and muscular glycogen (MG) (g/100g of tissue), activity of tissue injury marker enzymes (U/L) including lactate deshydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST respectively). The results showed that the animals fed with HSL in the groups TEX and SEX ran for much longer times until exhaustion in relation to the ones that received the diets with CAS and ISL ($p < 0.05$). The exhaustion time in relation to the CAS diet was 72 min longer for the TEX group and 44 min longer for the SEX group. The difference in exhaustion time between the animals fed with the WPH and WPI diets was of 40 min for the group TEX and 13 min for the SEX group. The lactate concentration in the

animals fed with WPI and WPH was statistically lower than in the ones fed with CAS in the groups T and S ($p < 0,05$). The concentration of liver glycogen in the animals that received the diets with WPI and WPH was statistically higher than in the animals that consumed CAS in the groups T (46%) and S (61%). The concentration of muscular glycogen did not have significant differences between the three types of diet in the different groups of training (TEX, SEX, T and S). The activity of the ALT of the animals that consumed WPH in the groups SEX and S was statistically lower than that of the animals that received CAS. The activity of the AST of the animals fed with WPH was significantly lower than that of the animals that consumed the diet with CAS in all of the groups of training (TEX, SEX, T and S). The activity of CK and LDH in the rats fed with HSL diet was statistical lower than in the ones fed with CAS in all of the groups of training except in the group S.

From the results obtained in this work it can be concluded that the use of milk whey proteins [mainly the whey protein hydrolysate (10% hydrolysis degree)] in relation to the standard protein (CAS) as the only protein source in rats submitted to physical exercise promoted a) lesser weight gain in all of the groups, b) higher resistance to exhaustion in groups TEX and SEX, c) higher hepatic glycogen concentration in groups T and S and d) higher protection against possible hepatic and muscular injuries in all of the studied groups (TEX, SEX, T and S).

Keywords: physical activity, protein hydrolysate, isolates, whey protein, protein, exercise, recovery, rats.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO -----	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA -----	3
REVISÃO -----	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	7
2.1. PROTEÍNA-----	7
➤ 2.1.1. <i>Classificação das proteínas</i> -----	9
➤ 2.1.2. <i>Balanço de nitrogênio no organismo</i> -----	10
➤ 2.1.3. <i>Recomendações nutricionais para proteínas</i> -----	11
2.2. PROTEÍNAS DO LEITE-----	12
➤ 2.2.1. <i>Proteínas do soro do leite (whey protein)</i> .-----	13
2.3. AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA (BCAA)-----	18
2.4. CICLO DE ALANINA-GLICOSE-----	21
2.5. ENZIMAS DE IMPORTÂNCIA DIAGNÓSTICA-----	25
➤ 2.5.1. <i>Alanina aminotransferase (ALT/TGP)</i> -----	26
➤ 2.5.2. <i>Aspartato Aminotransferase (AST/TGO)</i> -----	27
➤ 2.5.3. <i>Creatina Quinase (CK)</i> -----	28
➤ 2.5.4. <i>Lactato Desidrogenase (LDH) intracelular</i> -----	29
2.6. ATIVIDADE FÍSICA-----	30
➤ 2.6.1. <i>Vias que fornecem energia na atividade física</i> -----	36
2.6.1.1. <i>Produção anaeróbica de ATP</i> -----	36
2.6.1.2. <i>Produção aeróbica de ATP</i> -----	40
➤ 2.6.2. <i>Fontes de proteínas durante o exercício</i> -----	42
2.7. GLICOGÊNIO-----	43
➤ 2.7.1. <i>Glicogênio hepático</i> -----	44
➤ 2.7.2. <i>Glicogênio Muscular</i> -----	45
2.8. LACTATO-----	47
➤ 2.8.1. <i>Metabolismo do Lactato no exercício</i> -----	51
➤ 2.8.2. <i>Consumo de lactato</i> -----	53
➤ 2.8.3. <i>Lactato auxiliando na redução da acidose intramuscular</i> -----	54
OBJETIVOS -----	57
3. OBJETIVOS -----	59
3.1. GERAL-----	59
3.2. ESPECÍFICOS-----	59
MATERIAL E MÉTODOS -----	61
4. MATERIAIS E MÉTODOS -----	63
4.1. DIETAS EXPERIMENTAIS-----	64
4.2. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS-----	66
4.3. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS EXPERIMENTAIS E DA RAÇÃO COMERCIAL-----	68
➤ 4.3.1. <i>Determinação de proteína da dieta pelo método de Kjeldahl</i> -----	69
➤ 4.3.2. <i>Determinação de lipídeos da dieta pelo método de Bligh & Dyer</i> -----	69
➤ 4.3.3. <i>Determinação de gordura por Mojonnier (método para o leite e derivados)</i> -----	70
➤ 4.3.4. <i>Determinação de umidade</i> -----	70
➤ 4.3.5. <i>Determinação de cinza</i> -----	71
4.4. ANÁLISE DAS FONTES PROTÉICAS-----	71
➤ 4.4.1. <i>O perfil de aminoácidos das fontes protéicas (CAS, ISL e HSL)</i> -----	71

➤ 4.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) -----	72
➤ 4.4.3. Análise do grau de hidrólise (GH) da proteína parcialmente hidrolisada do soro de leite (HSL) utilizada -----	72
4.5. ENSAIO BIOLÓGICO -----	72
➤ 4.5.1. Balanço de nitrogênio -----	74
4.6. PARÂMETROS BIOLÓGICOS -----	75
➤ 4.6.1. Consumo da dieta e ganho de peso dos animais -----	75
➤ 4.6.2. Protocolo de treinamento -----	76
4.6.3.1. Exaustão -----	78
4.7. MÉTODOS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS -----	79
➤ 4.7.1. Determinação da concentração de lactato sanguíneo -----	79
➤ 4.7.2. Coleta de sangue e tecidos -----	79
➤ 4.7.3. Determinação do glicogênio hepático e muscular -----	81
4.8. DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA NO SORO SANGUÍNEO. -----	82
➤ 4.8.1. Alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) EC 2.6.1.2 -----	82
➤ 4.8.2. Aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO) EC 2.6.1.78 -----	83
➤ 4.8.3. Creatina Quinase (CK) EC 2.7.3.2 -----	83
➤ 4.8.4. Lactato desidrogenase (LDH) EC 1.1.1.27 -----	84
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA -----	85
RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	88
5.1. DIETAS EXPERIMENTAIS -----	88
5.2. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS EXPERIMENTAIS E DA RAÇÃO COMERCIAL -----	88
5.3. ANÁLISE DAS FONTES PROTÉICAS -----	90
➤ 5.3.1. Perfil de aminoácidos (aa) das fontes protéicas utilizadas [Caseína (CAS/padrão), isolado (ISL) e hidrolisado (HSL) de soro de leite] -----	90
➤ 5.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-Tricina -----	91
➤ 5.3.3. Análise do grau de hidrólise da proteína parcialmente hidrolisada utilizada na dieta experimental -----	93
5.4. BALANÇO DE NITROGÊNIO (BN) -----	94
5.5. PARÂMETROS BIOLÓGICOS -----	95
➤ 5.5.1. Consumo alimentar -----	95
➤ 5.5.2. Crescimento dos animais -----	96
➤ 5.5.3. Ganho médio de peso dos animais -----	98
➤ 5.5.4. Indicador tipo "PER" (Razão de Eficiência Protéica= proteína ingerida/ganho de peso) -----	101
5.7. TEMPO MÉDIO DE EXAUSTÃO DOS GRUPOS TEX E SEX -----	103
➤ 5.7.1. Grupo TEX -----	104
➤ 5.7.2. Grupo SEX -----	106
➤ 5.7.3. Grupo TEX vs grupo SEX -----	108
5.8. LACTATO SANGUÍNEO -----	111
5.9. GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR -----	113
➤ 5.9.1. Concentração de glicogênio no tecido hepático -----	114
➤ 5.9.2. Concentração de glicogênio no tecido muscular -----	117
5.9.2.1 Glicogênio muscular no gastrocnêmio (GMG) -----	118
5.9.2.2 Glicogênio muscular no sóleo (GMS) -----	121

5.10. ATIVIDADE DAS ENZIMAS TGP, TGO, CK E LDH NO SORO SANGUÍNEO DOS ANIMAIS ALIMENTADOS COM AS DIETAS CAS, ISL E HSL NOS DIFERENTES GRUPOS DE TREINAMENTO. -----	123
➤ 5.10.1. <i>Transaminase glutâmico-pirúvica (TGP/ALT)</i> -----	124
➤ 5.10.2. <i>Transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO/AST)</i> -----	127
➤ 5.10.3. <i>Creatina Quinase (HK)</i> -----	129
➤ 5.10.4. <i>Lactato desidrogenase (LDH)</i> -----	132
➤ 5.10.5. <i>Discussão geral sobre a atividade enzimática</i> -----	134
CONCLUSÕES -----	137
6. CONCLUSÕES -----	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	141
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS* -----	143
ANEXOS -----	165
8. ANEXOS -----	168
8.1. ACEPTAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL -----	168
8.2. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO E PROTEÍNA BRUTA PELO MÉTODO DE KJELDAHL (SEMI-MICRO) -----	169
8.3. DETERMINAÇÃO DE AMINOACIDOS SÉRICOS LIVRES -----	175
8.4. ELETROFORESES EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS-TRICINA PARA SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DE BAIXO PESO MOLECULAR- MÉTODO 02/2002 -----	178
8.5. PROTOCOLO UTILIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE POR TNBS (EM BASE AO ARTIGO ORIGINAL)-----	182
8.6. LIPÍDEOS X MÉTODO DE Blich Dyer -----	186
8.7. DETERMINAÇÃO DE GORDURA POR MOJONNIER (MÉTODO PARA O LEITE E DERIVADOS AOAC) -----	189
8.8. SÓLIDOS TOTAIS E UMIDADE -----	190
8.9. DETERMINAÇÃO DE CINZAS -----	193
8.10. DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR (GASTROCNÊMIO E SÓLEO)-----	195
8.11. MÉTODO PARA DETERMINAR ALANINA AMINOTRANSFERASE -----	198
8.12. MÉTODO PARA DETERMINAR ASPARTATO AMINOTRANSFERASE -----	199
8.13. MÉTODO PARA DETERMINAR CREATINA QUINASE -----	200
8.14. MÉTODO PARA DETERMINAR LACTATO DESIDROGENASE -----	201

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica dos aminoácidos.....	8
Figura 2. Ciclo da alanina-glicose	23
Figura 3. Hidrólise do ATP e ressíntese pela fosfocreatina	36
Figura 3.1. Adenilato quinase (mioquinase)	37
Figura 4. Resumo do metabolismo anaeróbico da glicose	39
Figura 5. Glicólise aeróbia	41
Figura 6. O ciclo de Cori.....	52
Figura 7. Queda de pH tradicionalmente associada ao acúmulo de lactato intramuscular ..	54
Figura 8. Esquema da divisão dos animais em 12 grupos para o ensaio biológico	74
Figura 9. Gaiola metabólica.	75
Figura 10. Esteira rolante para o treinamento físico dos animais	77
Figura 11. Decapitação	80
Figura 12. Coleta do sangue.....	80
Figura 13. Coleta do músculo sóleo	80
Figura 14. Coleta do fígado	80
Figura 15. Curva padrão de glicogênio	81
Figura 16. Perfil de aminoácidos das três fontes protéicas utilizadas caseína (CAS) e proteínas do soro de leite isolado (ISL) e hidrolisado (HSL) e comparadas com o perfil de aminoácidos essenciais FAO.....	90
Figura 17. Eletroforeses em gel de poliacrilamida-SDS-Tricina das proteínas do soro de leite isolado (ISL) e hidrolisado (HSL)	92
Figura 18. Consumo diário médio (g) de dieta \pm erro padrão da média (EPM) durante 35 dias.....	95
Figura 19. Ganho médio de peso dos animais (g) \pm erro padrão da média (EPM) durante 35 dias.....	98
Figura 20. Razão de Eficiência Protéica (Tipo PER) \pm erro padrão da média (EPM) durante 35	102

Figura 21. Tempo médio de exaustão (min.) dos animais do grupo treinado exausto (TEX) ± erro padrão da média (EPM) nas três dietas utilizadas, caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL), durante 35 dias	104
Figura 22. Tempo médio de exaustão (min.) dos animais do grupo sedentário exausto (SEX) ± erro padrão da média (EPM) nas três dietas utilizadas, caseína, caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL), durante 35 dias	106
Figura 23. Tempo médio de exaustão (min.) dos grupos treinado exausto (TEX) e sedentário exausto (SEX) ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias.....	108
Figura 24 Concentração de lactato sanguíneo (mmol/L) ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias.....	111
Figura 25. Concentração média de glicogênio hepático (GHep) dos animais (g/100g de tecido) ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias	114
Figura 26. Concentração média de glicogênio muscular (Gastrocnêmio) (GMG) dos animais (g/100g de tecido) ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias.....	118
Figura 27. Concentração média de glicogênio muscular (Sóleo) (GMS) dos animais (g/100g de tecido) ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias.....	121
Figura 28. Atividade enzimática média (U/L) da TGP/ALT no soro sanguíneo dos animais ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias.....	124
Figura 29. Atividade enzimática média (U/L) da TGO/AST no soro sanguíneo dos animais ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias.....	127
Figura 30. Atividade enzimática média (U/L) da CK no soro sanguíneo dos animais ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias	129
Figura 31. Atividade enzimática média (U/L) da LDH no soro sanguíneo dos animais ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos nutrientes e frações protéicas do leite humano e bovino	13
Tabela 2.- Composição (g/Kg de dieta) das dietas utilizadas no ensaio biológico (35 dias)	66
Tabela 3.- Composição da mistura mineral (g/Kg mistura) utilizada para a realização do ensaio biológico (35 dias)	67
Tabela 4.- Composição da mistura vitamínica (g/Kg mistura) utilizada para a realização do ensaio biológico (35 dias)	68
Tabela 5.- Protocolo de treinamento (6 vezes/semana) durante 4 semanas.	78
Tabla 6.- Protocolo da exaustão	78
Tabela 7. Concentração protéica das diferentes fontes usadas em base seca.	88
Tabela 8. Composição centesimal (%) das dietas consumidas pelos animais durante o ensaio biológico.	89
Tabela 9. Pesos (g) médios semanais dos animais durante o ensaio biológico (42 dias). Letras maiúsculas comparam as diferentes fontes protéicas (CAS, ISL, e HSL) entre si nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S)	97

LISTA DE ABREVIATURAS

- α -La** α -lactoalbumina
aa Aminoácidos
AAAB Ácido α -aminobutírico
ADP Adenosina-difosfato
ALA Alanina
ARG Arginina
ASP Ácido Aspártico
ATP Adenosina trifosfato
BCAA Aminoácidos de cadeia ramificada
BN Balanço nitrogenado
BSA Albumina sérica
CAS Caseína
CEMI B Centro de Bioterismo
CIS Cisteína
CK Creatina quinase
CP Creatina fosfato
CPK Creatina fosfoquinase
DEPAN Departamento de Alimentos e Nutrição
EPM Erro padrão da média
FAD Flavina adenina dinucleotídeo
GH Grau de hidrólise
GHep Glicogênio hepático
GLI Glicina
GLU Ácido glutâmico
GMG Glicogênio muscular do gastrocnêmio
GMP Glicomacropéptídeos
GMS Glicogênio muscular do Sóleo
HIS Histidina
HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência
HSL Hidrolisado de soro de leite
Ig Imunoglobulinas
I LE Isoleucina
ISL isolado de soro de leite
IUB União Internacional de Bioquímica

LABEX Laboratório de Bioquímica do Exercício
LDH Lactato desidrogenase
LEU Leucina
LIS Lisina
M Músculo
MET Metionina
NAD Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosofato
NF Nitrogênio nas fezes
NI Nitrogênio ingerido
NU Nitrogênio na urina
OMS Organização Mundial de Saúde
PAVB Proteínas de alto valor biológico
PBVB Proteínas de baixo valor biológico
PER Razão de eficiência protéica
PHE Fenilalanina
Pi Fósforo inorgânico ,
PITC Fenilisotilcianato
PLP Piridoxal-5-fosfato
PRO Prolina
PSL Proteínas do soro do leite
S Sedentário
SER Serina
SEX Sedentário exausto
SNC Sistema nervoso central
T Treinado
TEX Treinado exausto
TGO/ AST Aspartato aminotransferase
TGP/ ALT Alanina aminotransferase
THR Treonina
TYR Tirosina
UV Radiações ultravioletas
VAL Valina
VO₂ máx. Consumo máximo de oxigênio

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, numerosas pesquisas vêm demonstrando as qualidades nutricionais das proteínas do soro do leite (PSL) também conhecido com *whey protein*, que são geradas durante o processo de fabricação do queijo, sendo consideradas pela indústria de alimentos como subproduto. Registros na literatura italiana do início do século XVII demonstraram os efeitos benéficos do soro de leite à saúde. Por muitos séculos o soro de leite fez parte da cultura popular de várias sociedades, sendo utilizado na prevenção e no tratamento de doenças (BARICELLUS, 1603, apud McINTOSH et al., 1998). Somente a partir da década de 70, os cientistas passaram a estudar as propriedades dessas proteínas. Em 1971, o Dr. Paavo Airola, descreveu-as como parte importante no tratamento e prevenção de flatulências, prisão de ventre e putrefação intestinal (SALZANO, 2002).

Estudos realizados em diferentes modelos experimentais (animais, humanos e células *in vitro*), utilizando a proteína do soro de leite, têm comprovado a eficácia deste produto no aumento da capacidade imunomodulatória, aumento no combate a infecções e processos inflamatórios, além da ação antibacteriana e antiviral, estímulo da absorção e função intestinal, aumento na absorção de minerais, aumento na síntese de hormônios, ação anticancerígena, e efeito citoprotetor a partir da promoção da síntese de glutathione (SGARBIERI; PACHECO, 1999; PACHECO et al., 2006).

As proteínas do soro do leite perfazem cerca do 20% das proteínas do leite. Elas são consideradas de alto valor econômico, não só por ser fonte de proteínas de alto valor biológico com excelente balanço de aminoácidos (JAYAPRAKASHA; BRUECKNER, 1999), mas também pelas características que lhes são atribuídas como alimento funcional. As proteínas do soro do leite também são fonte de peptídeos bioativos com funções fisiológicas e nutricionais (SGARBIERI; PACHECO, 1999; SALZANO, 2002; LÖNNERDAL, 2003; HARAGUCHI et al., 2006). Além disso, elas vêm sendo muito utilizadas na indústria de alimentos, oferecendo uma gama variada de oportunidades de aplicação (McINTOSH et al.,

1998), sobretudo na produção de alimentos para esportistas e na utilização com objetivos clínicos, principalmente devido à peculiaridade de serem rapidamente absorvidas pelo intestino em comparação às proteínas intactas, inclusive a caseína do leite (MEREDITH et al., 1990).

O exercício físico regular incrementa as necessidades de proteína no organismo, apesar que este tem sido um tópico controverso durante muitos anos (BROUNS et al, 1989; MEREDITH et al., 1989; FIELDING; PARKINGTON, 2002). Pesquisas sobre exercício físico e metabolismo protéico têm sido realizadas na tentativa de elucidar qual é a quantidade de proteína que deve ser consumida pelo esportista (BRUKE;READ, 1993; FIELDING; PARKINGTON, 2002).

Segundo estudos feitos com ratos alimentados com hidrolisado de soro de leite e submetidos a exercício físico, houve melhora na capacidade de preservar o glicogênio muscular, glicose e albumina sérica (TASSI et al., 1998), além de proporcionar menores concentrações de lactato, maiores concentrações de glicogênio hepático e maior resistência à exaustão (ABECIA-SORIA, 2003; PIMENTA et al., 2006).

Em vista disso, decidiu-se avaliar as alterações metabólicas bioquímicas ocorridas em ratos submetidos ao treinamento físico em esteira e alimentados com as proteínas do soro de leite (isolado e hidrolisado) como única fonte protéica.

REVISÃO

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteína

A palavra proteína foi criada pelo sueco Berzelius (1779-1848) a partir da palavra grega *proteios*, que significa primeiro, ou de principal importância (CONN; STUMPF, 1980; LEHNINGER, 1986).

As proteínas são as moléculas mais abundantes e funcionalmente diversas nos sistemas biológicos. Praticamente todos os processos vitais dependem desta classe de moléculas (CHAMPE; HARVEY, 1996), definidas como "compostos nitrogenados orgânicos complexos, presentes de forma vital em todas as células vivas, formadas por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo, etc." (CONN; STUMPF, 1980; LEHNINGER; BOZAL, 1986; COLGAN, 1993).

As proteínas são fundamentais na síntese de novos tecidos, no processo de renovação dos mesmos e, principalmente, no crescimento. Elas participam em quase todos os processos vitais: formação da maior parte dos músculos, órgãos internos e externos, tecido conectivo e cartilaginoso, permitindo a sustentação, movimento e a contração (actina e miosina, tubulina, etc); nos ossos atuam como elementos estruturais, (colágeno forma uma rede para a deposição de cristais de fosfato de cálcio); na corrente sanguínea agem como veículo de transporte (hemoglobina e albumina plasmática) para gorduras, vitaminas, alguns minerais e o oxigênio. As proteínas são também importantes na defesa do organismo (imunoglobulinas destroem as bactérias e vírus que invadem o organismo) e atuam como fontes de nutrientes e de reserva (ovoalbumina, caseína, ferritina) e fonte alternativa de energia quando a dieta é deficiente em fontes convencionais de energia (carboidratos e lipídios) além de apresentar atividade enzimática e de regulação do metabolismo corporal (CONN; STUMPF, 1980; LEHNINGER; BOZAL, 1986; COLGAN, 1993; CHAMPE; HARVEY, 1996).

As proteínas apresentam uma incrível diversidade de funções, embora todas compartilhem a característica estrutural comum de serem polímeros lineares de aminoácidos (aa), unidos em longas cadeias, em várias formas e combinações químicas para formar estruturas protéicas muito diversas (CONN; STUMPF, 1980; COLGAN, 1993; LEHNINGER et al., 1995).

Vinte aa têm sido identificados como responsáveis pela constituição da maioria das proteínas, classificados em nutricionalmente essenciais (8) e não essenciais (12). São considerados aminoácidos essenciais ou também denominados indispensáveis: valina, triptofano, treonina, metionina, lisina, leucina, isoleucina, fenilalanina e histidina (a histidina é considerada essencial para os recém-nascidos), pois não são sintetizados pelo organismo humano. Dentre os aminoácidos não essenciais temos: tirosina, glicina, alanina, cisteína, serina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico, glutamina, prolina e arginina (LEHNINGER, 1989; SGARBIERI, 1996; AMAYA-FARFAN; PACHECO, 2003).

Todos eles têm em comum um átomo de carbono (C_{α}) no qual está ligado um átomo de hidrogênio, um grupo amino (NH_3), um grupo carboxílico ($COOH$) e uma cadeia lateral distinta ("grupo R"). O que diferencia um aminoácido do outro é a cadeia lateral que está ligada na quarta valência do C_{α} (Figura1).

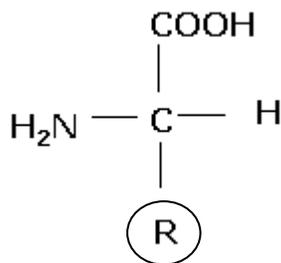


Figura 1. Estrutura básica dos aminoácidos (CHAMPE; HARVEY, 1996)

O único aminoácido que não segue esse padrão é a prolina porque a cadeia lateral deste aminoácido e o grupo alfa-amino formam uma estrutura em anel, e assim a prolina difere de outros aminoácidos, pois contém um grupo imino em vez de um grupo amino. Os

aminoácidos são unidos covalentemente por ligações peptídicas, entre o grupo alfa-amino de um aminoácido e o grupo alfa-carboxila de outro aminoácido. Em pH fisiológico (aproximadamente 7,4), o grupo carboxila é dissociado, formando o íon carboxilato (COO^-), carregado negativamente e o grupo amino é protonado (NH_3^+) (LEHNINGER, 1989; AMAYA-FARFAN; PACHECO, 2003).

➤ **2.1.1. Classificação das proteínas**

1. Proteínas de alto valor biológico (PAVB) fornecem todos os aminoácidos essenciais, em quantidade e proporção corretas, proporcionam um equilíbrio nitrogenado e mantêm o crescimento normal. São encontradas no leite e derivados, ovos, carnes e em algumas combinações de origem vegetal.
2. Proteínas de baixo valor biológico (PBVB) ou chamadas de proteínas incompletas porque falta um ou mais aminoácidos essenciais na sua composição, limitando a absorção como um todo. São encontradas em fontes de origem vegetal. Recomenda-se que estas proteínas devam ser consumidas sempre junto com outras proteínas para que exista uma complementação dos aminoácidos entre elas.

Os humanos ingerem tipicamente cerca de 10 a 15% (0,8-1g/Kg de peso corporal) de suas calorias totais como proteína. Durante a digestão, a proteína é hidrolisada em seus aminoácidos constituintes a fim de ser absorvida pelo intestino delgado. Em situações específicas (crescimento, gestação, atividade física e convalescença), necessita-se de uma quantidade maior de proteínas dietéticas para manter um balanço nitrogenado positivo (LEMON, 1997).

➤ **2.1.2. Balanço de nitrogênio no organismo**

O conhecimento sobre o metabolismo intermediário dos aminoácidos e proteínas está fundamentado nas primeiras investigações nutricionais. Osborne e Mendel demonstraram em 1914 que ratos em crescimento requeriam lisina e triptofano na dieta. Rose (1943) mostrou que pelo menos oito aminoácidos eram requeridos para o crescimento dos ratos. Experimentos sobre o requerimento em humanos foram desenvolvidos principalmente durante a segunda guerra mundial, quando voluntários foram submetidos a dietas sintéticas, contendo aminoácidos livres em diferentes combinações. Esses experimentos revelaram que os aminoácidos lisina, triptofano, fenilalanina, treonina, valina, metionina, leucina e isoleucina eram indispensáveis na dieta para a manutenção do balanço de nitrogênio nesses indivíduos (SGARBIERI, 1987).

Dizemos que existe um balanço de nitrogênio quando se verifica que o nitrogênio consumido diariamente com a dieta é igual à quantidade de nitrogênio excretado nas fezes e na urina. O indivíduo adulto só se manterá em equilíbrio nitrogenado quando ingerir quantidade adequada de nitrogênio para atender suas necessidades metabólicas mínimas. Nos indivíduos em crescimento deve-se encontrar o chamado "balanço positivo" em que o nitrogênio ingerido deverá ser superior à soma do nitrogênio excretado (fezes e urina). Essa situação de retenção do nitrogênio é necessária sempre que houver necessidade de formação de novo tecido pelo organismo. Este estado também se verifica em determinados estados fisiológicos (gravidez, lactação, período de recuperação após ferimentos). Contudo, parte desse nitrogênio não poderá ser fornecido na forma de NH_3 ou de qualquer outro composto nitrogenado e sim como aminoácidos indispensáveis (SGARBIERI, 1987).

Por outro lado, existem várias condições em que o "balanço" de nitrogênio poderá ser negativo. Esta situação ocorre em estados mórbidos ou patológicos ou em idade muito avançada em que se verifica uma perda maior de nitrogênio endógeno como consequência da predominância do catabolismo sobre anabolismo. Também pode-se verificar após a

ingestão contínua de uma dieta desbalanceada, contendo proteínas de má qualidade e que não contenham um ou mais aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 1987).

➤ **2.1.3. Recomendações nutricionais para proteínas**

Em média recomenda-se o consumo diário de proteína de 0,83g por kg de massa corpórea. A necessidade e a quantidade de proteínas diminuem com a idade, enquanto que em situações de estresse e doenças aumentam o requerimento protéico. A recomendação protéica diária para lactentes e crianças em crescimento é de 2 a 4g por kg de massa corpórea, enquanto para gestantes é 20g e para lactantes é 10g. (TORNOPOLSKY et al., 1988; LEMON; PROCTOR, 1991; TORRES et al., 2004; CAMPBELL et al., 2007).

A necessidade de proteínas para atletas que estão em crescimento moderado é tema de debate. Em geral, o aumento no consumo de proteínas dos atletas seria para compensar o aumento no gasto energético. Homens e mulheres fisiculturistas e halterofilistas e outros atletas de força costumam ingerir entre 0,5 a 4 vezes mais do que o RDA (Recommended Dietary Allowance) recomenda para proteína por dia (TORNOPOLSKY et al., 1988; LEMON; PROCTOR, 1991; TORRES et al., 2004; TARNOPOLSKY, 2008).

O aumento da ingestão de proteínas superior ao nível recomendado não aumenta o desempenho físico durante o treinamento intensivo. Para atletas, a massa muscular não aumenta simplesmente através de uma alimentação rica em proteína. Calorias adicionais na forma de proteínas são, depois da desaminação (remoção do nitrogênio), usadas diretamente como componentes de outras moléculas, incluindo lipídeos que são estocados em depósitos subcutâneos (TORNOPOLSKY et al., 1988; LEMON; PROCTOR, 1991; TORRES et al., 2004, TARNOPOLSKY, 2008).

Assim, se numa dieta com excesso de proteínas os tecidos não tiverem condições de utilizar os aminoácidos para sua renovação, as cadeias carbônicas serão usadas na gliconeogênese e o nitrogênio excedente será excretado pela urina. O aumento da excreção

de nitrogênio leva a uma maior necessidade de água, uma vez que ele é incorporado à uréia e esta à urina. Isto a longo prazo pode sobrecarregar os rins e causar desidratação (TORRES et al., 2004).

2.2. Proteínas do leite

O leite, produto da secreção das glândulas mamárias, é um fluido viscoso constituído de uma fase líquida e partículas em suspensão, formando uma emulsão natural, estável em condições normais de temperatura ou de refrigeração. O leite possui elevado valor nutritivo, sendo o único alimento que satisfaz as necessidades nutricionais e metabólicas do recém-nascido de cada espécie nos primeiros meses de vida (SGARBIERI, 1996). O leite bovino contém aproximadamente 87% água, 3,9% de gordura, 3,3% de proteína, 5% de lactose e 0,7% de minerais, sendo suas principais proteínas a caseína (~80%) e as do soro (~20%). Dentre as proteínas que compõem o soro de leite destacam-se a β -Lactoglobulina (55%) e α -Lactoalbumina (25%), entre outras (WONG et al., 1996; PUNIDADAS; RIZVI 1998).

As caseínas compreendem cerca de ~80% das proteínas do leite bovino, sendo as mais importantes as frações α_{s1} ; α_{s2} ; β e κ caseínas. O leite humano contém pouco α_s caseínas; a β caseína compreende cerca de 30 a 35% do total das caseínas sendo as γ caseínas fragmentos proteolíticos das β e a κ caseína é a única das caseínas que contém cisteína. As micelas das caseínas são unidas através das pontes de fosfato formando submicelas. No interior das micelas existem misturas de α e β caseínas e na superfície das κ caseínas que possuem alta hidrofobicidade (PUNIDADAS; RIZVI, 1998; GINGER; GRIGOR, 1999). As proporções dos diferentes componentes do leite humano e bovino são observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos nutrientes e frações protéicas do leite humano e bovino

COMPONENTES	LEITE HUMANO	LEITE BOVINO
Lactose %	6,9	4,8
Gordura %	4,4	3,9
Minerais %	0,1	0,7
Proteína %	1,3	3,4
CASEÍNAS g/L	3-5	26
α_{s1} -caseína		10
α_{s2} -caseína		2,6
β -caseína	3-5	9,3
γ -caseína		0,8
κ -caseína	1-3	3,3
PROTEÍNAS DO SORO g/L	4-6	5-7
α -lactoalbumina	2-3	0,8-1.2
β -lactoglobulina		5-7
Albumina sérica	0,3	0.4
IMUNOGLOBULINAS g/L		
IgA	0,1	7-11
IgG	0,01	2-3
IgM	0,02	0,05
Lactoferrina	1-3	traço

USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 15 (August 2002).

➤ 2.2.1. Proteínas do soro do leite (whey protein).

O soro de leite pode ser definido como o líquido que permanece após a coagulação ácida ou enzimática da caseína, processo que ocorre durante a fabricação do queijo (EIGEL et al., 1984; SGARBIERI, 1996; MCINTOSH et al., 1998). Atualmente, o soro de leite é visto com um rico e variado composto de proteínas com funções químicas, físicas, nutricionais e funcionais (SMITHERS et al., 1996; BOUNOUS, 2000).

As proteínas do soro de leite também são fonte de peptídeos bioativos (componentes que podem aumentar a proteção passiva contra infecções, modular processos digestivos e

metabólicos e atuar como fatores de crescimento para diferentes tipos de células, tecidos e órgãos), com funções fisiológicas e nutricionais. Estes peptídeos podem ter diversas funções interessantes como a estimulação do sistema imune, atividades antimicrobianas e efeitos antitrombóticos. Os peptídeos bioativos podem também ser produzidos *in vitro* por hidrólise enzimática das proteínas do leite. Além disso, durante a produção dos derivados do leite, como por exemplo, o processamento do queijo, os peptídeos podem ser formados. Na maioria dos casos os peptídeos bioativos são inativos quando eles são parte das proteínas, mas eles se tornam ativos apenas quando são liberados (SGARBIERI; PACHECO, 1999; SALZANO, 2002; LÖNNERDAL, 2003; HARAGUCHI et al., 2006).

A relação caseínas:proteína do soro é bastante variável entre as espécies de mamíferos. Esta relação é de 80,0: 20,0 (%) no leite bovino, 20,0:80,0 (%) no leite humano, 80,0:20,0 (%) no leite de búfala e 82,2:15,8 (%) no de cabra. Observa-se que no leite humano a proporção de proteínas de soro é 4 vezes a das caseínas, comparadas com as do leite de vaca e de búfala. Outro aspecto muito importante a considerar sobre o leite, como primeiro e único alimento dos recém-nascidos, é que a primeira secreção das glândulas mamárias, após o parto, tem composição muito diferente do leite e recebe o nome de colostro. O colostro é um líquido amarelado, mais viscoso que o leite e a sua composição varia muito para todas as espécies nas primeiras 72h após o parto (HAMBREUS, 1992 HENG; 1999; SGARBIERI, 2004).

As proteínas do soro de leite constituem um grupo bastante diversificado de proteínas com características estruturais bem diferentes (WONG et al., 1996; SGARBIERI. 2005). Apresentam estruturas globulares com pontes de dissulfeto, situação não usual em estruturas protéicas, o que confere uma estabilidade estrutural a estas proteínas; apresentam todos os aminoácidos dieteticamente indispensáveis na sua composição, que superam as recomendações preconizadas pela FAO (Food and Agriculture Organization) exceto para os aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), mas atendem às

recomendações para todas as idades (COLGAN, 1993; REGESTER et al., 1996; SGARBIERI, 1996; ZINSLY et al., 2001; SGARBIERI, 2005; PACHECO et al., 2006).

Estas proteínas oferecem alta digestibilidade (em comparação com a proteína intacta) e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, portanto elevado valor biológico e escore químico superior à de outras proteínas de origem animal. São estas características especiais que ajudam na recuperação mais rápida de organismos debilitados, estimulando a síntese protéica no sangue e nos tecidos (COLGAN, 1993; REGESTER et al., 1996; SGARBIERI, 1996; ZINSLY et al., 2001; SGARBIERI, 2005; PACHECO et al., 2006) a tal ponto que alguns pesquisadores as classificam como proteínas de metabolização rápida, muito adequadas para situações de estresse metabólico em que a reposição de proteínas no organismo se torna emergencial (BOIRIE et al., 1997; FRÜHBECK, 1998; DANGIN et al., 2001; MANNINEN, 2009).

O soro de leite é um subproduto do leite, obtido durante a produção de queijo ou de caseína, contém de 4-7g de proteína/L, sendo que a concentração real depende do tipo de soro (ácido ou doce, tipo de queijo e caseína), estágio de lactação e condições de processamento (MARSHALL; HARPER, 1988; LÖNNERDAL, 2003). Pode ser obtido em laboratório ou na indústria por três processos principais (MAUBOIS et al 2001; ZINSLY et al, 2001): a) pelo processo de coagulação enzimática (enzima quimosina), resultando no coágulo de caseínas, matéria-prima para a produção de queijos, e no soro "doce"; b) precipitação ácida no pH isoelétrico (pI), resultando na caseína isoelétrica, que é transformada em caseínatos e no soro ácido ou c) separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado protéico.

Com o surgimento de novas tecnologias, o soro tornou-se um ingrediente muito valorizado pelas suas propriedades nutricionais e funcionais (solubilidade, formação e estabilidade de espuma, emulsibilidade, geleificação, formação de filmes e cápsulas

protetoras) (WONG et al., 1996; MODLER, 2000). As proteínas nativas do soro são separadas das caseínas do leite bovino pela sua solubilidade em pH 4,6. Estas apresentam diferentes sensibilidades para temperaturas maiores que 50°C. O grau de desnaturação depende dos componentes da proteína, da concentração total dos sólidos e temperatura, tempo de exposição, pH e força iônica (MARSHALL; HARPER, 1988; GINGER; GRIGOR, 1999; PUNIDADAS; RIZVI 1998).

A proteína do leite bovino contém cerca de 80% de caseína e 20% de proteínas do soro, percentual que pode variar em função da raça do animal da ração fornecida e do país de origem (SALZANO, 2002). No leite humano, o percentual das proteínas do soro é modificado ao longo da lactação, sendo que no colostro se encontram em torno de 80% e, na sequência, esse percentual diminui para 50% (LÖNNERDAL, 2003).

Dentre as proteínas do soro de leite destacam-se: a β -Lactoglobulina (β -Lg), α -lactalbumina (α -La), imunoglobulinas (Ig), albumina sérica (BSA) e glicomacropéptidos (GMP). Essas frações podem variar em tamanho, peso molecular e função, fornecendo características especiais (KINSELLA; WHITEHEAD, 1989; AIMUTIS, 2004).

A β -Lg é o peptídeo do soro em maior quantidade (45,0-57,0%), representando, no leite bovino, em torno de 3,2g/L, com peso molecular entre 18,4 e 36,8kDa, o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo, portanto, absorvida no intestino delgado (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2008). É a fração que apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), ao redor de 25,1%, importantes no funcionamento do ciclo alanina-glicose (De WIT, 1998). Estes aminoácidos entram no ciclo alanina-glicose gerando fontes de energia a partir de compostos não nitrogenados como o piruvato, podendo sustentar a atividade física por mais tempo.

A α -La é o segundo peptídeo do soro (15%-25%) do leite bovino e o principal do leite humano. Com peso molecular de 14,2kDa, caracteriza-se por ser de fácil e rápida digestão. Contém o maior teor de triptofano (6%) entre todas as fontes protéicas alimentares, sendo,

também, rica em lisina, leucina, treonina e cistina (KINSELLA; WHITEHEAD, 1989; MARKUS; OLIVER, 2002).

A BSA corresponde a cerca de 10% das proteínas do soro do leite. É um peptídeo de alto peso molecular (66kDa), rico em cisteína (aproximadamente 6%) e relevante precursor da síntese de glutathiona (De WIT, 1998; KINSELLA; WHITEHEAD, 1989; SALZANO, 2002).

As Ig's são proteínas de alto peso molecular (150-1.000kDa). Quatro das cinco classes das Ig's estão presentes no leite bovino (IgG, IgA, IgM e IgE), sendo a IgG a principal, constituindo cerca de 80% do total. Já no caso do leite humano, este está constituído predominantemente por IgA (>90%). As principais ações biológicas das Ig's residem na imunidade e atividade antioxidante (De WIT, 1998; KINSELLA; WHITEHEAD, 1989; SALZANO, 2002; HA; ZEMEL, 2003).

O GMP (6,7kDa) é um peptídeo derivado da digestão da κ -caseína pela ação da quimosina durante a coagulação do leite. Essa fração está presente em um tipo de proteína do soro conhecida como *whey rennet* (SALZANO, 2002; ETZEL, 2004).

As proteínas do soro podem exibir diferenças na sua composição de macronutrientes e micronutrientes, dependendo da forma utilizada para sua obtenção. Segundo Salzano (2002), 100g de concentrado protéico do soro do leite possui, em média, 414kcal, 80g de proteína, 7g de gordura e 8g de carboidratos. Em relação aos micronutrientes, possuem, em média, 1.2mg de ferro, 170mg de sódio e 600mg de cálcio por 100g de concentrado protéico oferecendo uma vantagem sobre o leite como fonte de cálcio. De acordo com Etzel (2004), a composição média de aminoácidos (mg aa/g proteína) é: triptofano (1,3), cisteína (1,7), glicina (1,7), histidina (1,7), arginina (2,4), fenilalanina (3,0), metionina (3,1), glutamina (3,4), tirosina (3,4), asparagina (3,8), serina (3,9), prolina (4,2), treonina (4,6), isoleucina (4,7), valina (4,7), alanina (4,9), lisina (9,5), ácido aspártico (10,7), leucina (11,8) e ácido glutâmico (15,4) (HARAGUCHI et al., 2006).

Sabe-se que os hidrolisados protéicos contendo peptídeos de pequeno tamanho, di e tripeptídeos, são absorvidos numa velocidade maior, tanto em relação às proteínas como aos aminoácidos livres. Estes hidrolisados preservam a estabilidade de alguns aminoácidos em processos de esterilização e estocagem, aumentando a solubilidade sem prejudicar a osmolaridade no produto final (BOIRIE et al., 1997; FRÜHBECK, 1998; AMAYA-FARFÁN; PACHECO, 2003; MANNINEN, 2009).

De todas as proteínas alimentícias, as do soro de leite apresentam a maior concentração em BCAA (isoleucina, leucina e valina) além de servirem de substrato energético para o crescimento e desenvolvimento do organismo, as proteínas também desempenham funções diversas como: regulação do metabolismo, transporte de nutrientes, catalisadores naturais, defesa imunológica, receptores de membranas, dentre outras. (ALEXANDER; GOTTSCHLISH, 1990). Estão descritos estudos onde a suplementação nutricional com estes tipos de aminoácidos em desportistas previne a degradação protéica e a perda de massa muscular associada ao exercício intenso e de longa duração (WALZEM et al., 2002). Os BCAA totalizam 21,2% das proteínas do soro de leite e todos os aminoácidos essenciais constituem 42,7%. (COLGAN, 1993; HARAGUCHI et al., 2006; HAYES; CRIBB, 2008).

2.3. Aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA)

Os BCAA (isoleucina, leucina e valina) são considerados aminoácidos bioquimicamente essenciais porque nosso organismo não pode sintetizá-los e devem ser adquiridos através da dieta. Estes aa são encontrados principalmente em proteínas de origem animal como o leite e derivados (VAN HALL et al., 1995). Representam de 15 a 20% dos aminoácidos das proteínas do músculo, sendo responsáveis por até 20% do fornecimento de energia para o mesmo, são oxidados diretamente nos músculos periféricos, enquanto os demais são metabolizados no fígado (GOODMAN, 1988; COLGAN, 1993; LANCHÁ; HERBERT, 1996; VAN HALL et al., 1998; CARVALHO, 2005).

Estes aminoácidos também colaboram na conversão de glutamina em alanina, aminoácido importante na manutenção da glicose sanguínea, diminuem o tempo de recuperação das microlesões resultantes do esforço físico, como também as evitando. Estes aminoácidos são liberados na circulação sanguínea pelo fígado durante a atividade física, atingindo a musculatura exercitada. Os BCAA agem como fonte de combustível quando os estoques de glicogênio estão baixos e mantêm o balanço de nitrogênio neutro prevenindo o estado de catabolismo ocasionado pelo excesso de treino (HOOD; TERJUNG, 1987; LANCHÁ; HERBERT, 1996; UCHIDA et al., 2008).

Durante o exercício físico intenso e prolongado a oxidação de BCAA, pelo músculo esquelético, fornece energia para o músculo exercitado. Esse fato leva a uma diminuição das concentrações plasmáticas de BCAA, além de uma menor produção do aminoácido glutamina no músculo esquelético. Como consequência, ocorre um desequilíbrio de aminoácidos, podendo acarretar a fadiga muscular (CARVALHO, 2005; NEWSHOLME; BLOMSTRAND, 2006; UCHIDA et al., 2008).

Os processos de fadiga podem ter origem periférica e/ou central. Os mecanismos de fadiga periférica estão relacionados com os grupos musculares envolvidos, sendo que esta fadiga pode acontecer pela depleção de compostos ricos em energia (ATP/CP) e de glicogênio muscular. O principal mecanismo causador da fadiga periférica é a falta de ATP consequente de diferentes fatores (esgotamento de glicogênio, ou fosfocreatina e acúmulo de prótons). Desta forma, sem ATP (por diferentes razões) o músculo estriado esquelético não é capaz de continuar a contrair na intensidade requerida e diminui a sua atividade, caracterizando assim a fadiga periférica. (NEWSHOLME; BLOMSTRAND, 2006).

A fadiga central está ligada ao sistema nervoso central (SNC) e pode ocorrer pela queda da concentração de glicose plasmática (hipoglicemia) ou pelo aumento da serotonina (ou 5-hidroxitriptamina), neurotransmissor responsável por respostas fisiológicas como o sono, que por sua vez é um mediador potencial da fadiga central (CAPERUT et al., 2009).

Sabe-se que os BCAA e o triptofano-livre competem entre si em situações em que os níveis plasmáticos de BCAA se encontram reduzidos (exercícios prolongados); isto facilitaria a entrada de triptofano-livre no cérebro (SNC), levando à geração de 5 hidroxitriptamina, precursor da serotonina. Portanto, acredita-se que a suplementação de BCAA poderia reduzir a formação da serotonina, retardando assim a fadiga e conseqüentemente, melhorando o desempenho esportivo (NEWSHOLME E BLOMSTRAND, 2006)

Os BCAA regulam a produção de serotonina a partir da competição pelo transportador de membrana com o triptofano. Assim, quando a concentração dos BCAA estiver em equilíbrio com a concentração do triptofano, a produção de serotonina será reduzida (NEWSHOLEME; LEENCH, 1988; MARQUEZI; LANCHÁ JUNIOR, 1997; SARTORI et al., 2007).

Estudos mostraram que o alto teor de BCAA das proteínas do soro de leite afetam os processos metabólicos da regulação energética, favorecendo o controle e a redução da gordura corporal. Estudos feitos por Layman, (2003); Layman; Baum, (2004) mostraram que dietas com maior relação proteína/carboidratos são mais eficientes para o controle da glicemia e da insulina pós-prandial, favorecendo dessa forma a redução da gordura corporal e a preservação da massa muscular durante a perda de peso. Além disso, pelo fato da leucina atuar nos processos de síntese protéica, altas concentrações desse aminoácido favorecem a manutenção da massa muscular durante a perda de peso.

Os BCAA também estão presentes nos suplementos alimentares na forma isolada ou combinada. Os suplementos de aminoácidos apresentam como vantagem uma absorção mais rápida em relação às proteínas, pois não precisam passar pelo processo de digestão, encontrando-se já se na sua forma livre. Foi mostrado que os BCAA podem suprimir o uso de outros aminoácidos para geração de energia durante o exercício prolongado evitando assim o catabolismo protéico durante as atividades extenuantes e com isso, preservando a massa muscular. Também foi observado que existe uma relação entre suplementação dos BCAA e o aumento da concentração do glicogênio muscular existindo diminuição do

transporte de glicose para o interior da célula, retardando o consumo de glicogênio muscular e a acidose metabólica, causadores da fadiga (COLGAN, 1993; VAN HALL et al., 1995).

LAYMAN (2003) observou que a suplementação com os BCAA também estimula a secreção de insulina. O uso do BCAA resulta do efeito da leucina em promover a secreção de insulina que é o ativador do anabolismo direto no processo de síntese de proteínas musculares. Por estes motivos, usualmente recomenda-se a ingestão de BCAA até uma hora antes ou duas horas depois do treino (DE REZENDE; TIRAPEGUI, 2000; SARTORI et al., 2007).

É sabido que os BCAA atuam no ciclo da alanina-glicose servindo de substratos para a produção de glicose (HOOD; TERJUNG, 1990), enquanto a asparagina e o aspartato (que sofre ação da aspartato aminotransferase no tecido muscular) atuam como precursores de oxaloacetato no ciclo de Krebs. Estes aminoácidos modulam assim as respostas metabólicas dos carboidratos ao preservarem o conteúdo de glicogênio muscular, reduzirem o transporte de glicose para o interior da célula muscular e manterem a atividade do ciclo de Krebs a partir da síntese direta de oxaloacetato, ou pelo ciclo alanina-glicose (HOOD; TERJUNG, 1990; MARQUEZI; LANCHÁ JUNIOR, 1997; BLOMSTRAND; SALTIN, 2001; SARTORI et al., 2007).

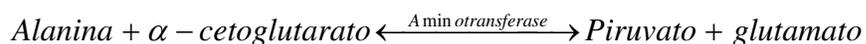
2.4. Ciclo de alanina-glicose

Os aminoácidos provenientes da degradação das proteínas endógenas e da digestão de proteínas da dieta apresentam um número elevado de reações, tornando difícil a visualização desse metabolismo como um sistema integrado. No entanto, algumas reações são comuns para a maioria dos aminoácidos (MOTTA, 2005).

O primeiro passo no catabolismo dos aminoácidos é a transferência do seu grupo α -amino para o α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs. Os produtos dessa reação

são um α -cetoácido resultante do aminoácido anterior, que perde o seu grupo α -amino, e o ácido glutâmico, resultante do α -cetoglutarato após receber o grupo α -amino.

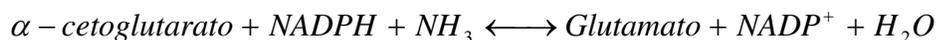
O α -cetoglutarato desempenha um papel central no metabolismo dos aminoácidos, pois aceita grupos amino de outros aminoácidos e se transforma em glutamato (ou ácido glutâmico).



Essa transferência de grupos amino de um esqueleto carbonado para outro, é catalisada por uma família de enzimas denominada de aminotransferases (anteriormente denominadas de transaminases) e as reações catalisadas por essas enzimas são denominadas de reações de transaminação. Transaminação, tal como o nome indica, é um processo de transferência de um grupo amino de uma molécula para outra. As aminotransferases são encontradas no citoplasma de todas as células, mas especialmente nas células do fígado, rins e músculo. Todos os aminoácidos, exceto a lisina e a treonina, perdem os seus grupos amina por transaminação (MOTTA, 2005).

No ciclo alanina-glicose os produtos são o α -cetoglutarato ou oxaloacetato e glutamato ou aspartato que podem ser desaminados. A desaminação oxidativa consiste na remoção do grupo amino de um aminoácido, sob a forma de amônia livre. Esta reação é catalisada pela enzima glutamato desidrogenase e ocorre principalmente no fígado e no rim. No fígado, esta enzima está localizada na matriz mitocondrial e emprega o NAD^+ ou NADP^+ como aceptor de elétrons. As reações de desaminação fornecem α -cetoácidos, que podem entrar nas vias centrais do metabolismo energético, e amônia, que serve para a síntese da uréia. Parte da amônia livre é neutralizada, por reversão da reação catalisada pela

glutamato-desidrogenase, formando glutamato a partir do α -cetoglutarato. Nesses casos o NADPH é empregado como coenzima (MOTTA, 2005).



Assim, o glutamato pode ser responsável pela biossíntese de aminoácidos através do processo de transaminação a partir dos α -cetoácidos correspondentes (McARDLE et al., 1998, 2002; MOTTA, 2005). O glutamato formado também pode ser usado como doador de grupo amino na síntese de aa não essenciais (CHAMPE; HARVEY, 1996), como ocorre no ciclo da alanina-glicose (Figura 2).

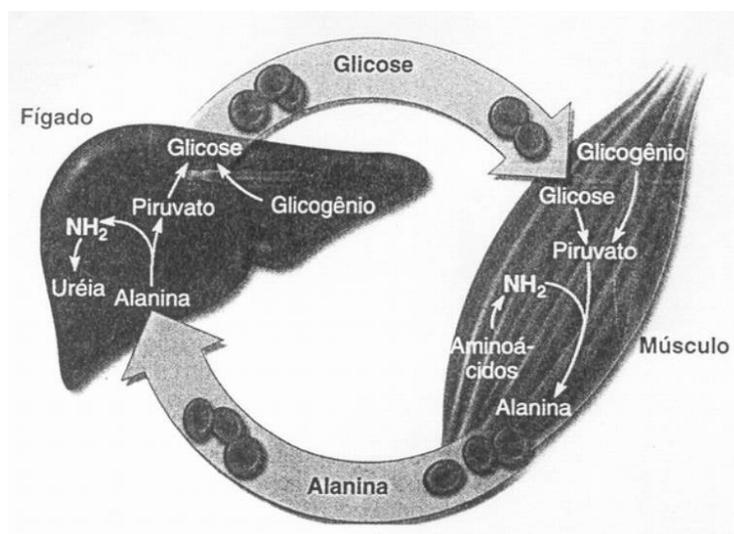


Figura 2. Ciclo da alanina-glicose (McARDLE et al., 2002).

Neste ciclo a alanina é sintetizada no músculo esquelético através das reações de transaminação que sofrem a maioria dos aa e a partir do piruvato. A alanina produzida é transportada pelo sangue ao fígado (onde transfere o seu grupo amino para α -cetoglutarato por meio da alanina-transferase, formando glutamato; este, por desaminação, produz α -cetoglutarato e amônia pela ação glutamato-desidrogenase). A amônia formada é convertida em uréia, a qual é filtrada pelos rins e excretada na urina. O piruvato, por sua vez, é

convertido a oxaloacetato (pela piruvato carboxilase), sendo posteriormente convertido a fosfoenolpiruvato (pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase) que pode ser convertido em glicose através da gliconeogênese (NEWHOLME; LEENCH 1988; HOOD; TERJUNG, 1990; LANCHÁ; JUNIOR, 1996; MOTTA, 2005).

No músculo, os BCAA geram cetoácidos de cadeia ramificada permitindo, através da transaminação, a formação de aminoácidos a partir de compostos orgânicos que não têm nitrogênio e que são formados no metabolismo (como o piruvato) (MOTTA, 2005).

Durante o exercício é maior a produção e exportação de alanina pelo músculo. Isso ajuda a manter a glicemia para atender as necessidades do sistema nervoso central e dos músculos. Estima-se que 10 a 15% da demanda energética total do exercício pode ser gerada por este ciclo, sobretudo nos exercícios prolongados de alta intensidade. Nos indivíduos bem nutridos em repouso, o fracionamento das proteínas contribui com 2 a 5% da demanda energética corporal total. Com o aumento da demanda energética durante o exercício, principalmente o de longa duração, as proteínas podem ser utilizadas como fonte de energia (MCARDLE et al., 2001).

McArdle et al. (1998, 2002) relataram que há maior liberação de alanina (e possivelmente glutamina) pelos músculos ativos das extremidades inferiores à medida que a intensidade do exercício aumenta observando-se um aumento proporcional na produção de alanina, mantendo-se os níveis de glicose sanguínea para atender as necessidades do sistema nervoso e dos músculos ativos. Após 4 horas de exercício contínuo de baixa intensidade, a produção hepática de glicose derivada de alanina pode ser responsável por 45% da glicose total liberada pelo fígado.

As reações de transaminação anteriormente mencionadas são catalisadas pela alanina e aspartato aminotransferase. Todos os aa, com a exceção da lisina e leucina, participam na transaminação em algum ponto de seu catabolismo. Estas enzimas são muito utilizadas na determinação de lesão hepática (alanina aminotransferase) e muscular

(aspartato aminotransferase) junto com a creatina quinase e a lactato desidrogenase, em situações extremas como, por exemplo, esforço físico.

2.5. Enzimas de importância diagnóstica

Estudos de enzimologia iniciaram em 1901 com Vitor Henri e foram intensificados a partir de 1910 com Leonor Michaelis. Apenas em 1927 foi descrita a primeira enzima, a fosfatase alcalina por King e Armstrong. Na década dos 60 foi iniciado o uso da enzimologia no diagnóstico na medicina humana e apenas na década dos 80 seu uso foi ampliado também na medicina veterinária (PELLEGRINOTTI, 1989; LOPES, 1998).

A enzimologia clínica é de grande importância diagnóstica, principalmente em relação às enzimas presentes na corrente sanguínea, várias das quais são incluídas no estudo do perfil enzimático. Para uso na rotina de um laboratório de análises, existem kits comerciais que oferecem os reagentes e o protocolo. Normalmente, as enzimas são determinadas de forma indireta. Em outras palavras, não se determina a atividade de uma enzima pela sua concentração molar ou massa total, mas pela sua atividade catalítica. A União Internacional de Bioquímica (IUB) definiu como unidade internacional de atividade enzimática (U), a quantidade de enzima que catalisa a conversão de um mol de substrato por minuto (PELLEGRINOTTI, 1989; LOPES, 1998).

O uso de enzimas como meio de diagnóstico requer alguns cuidados adicionais, como prestar atenção para evitar a hemólise nas amostras. Da mesma forma, se deve ter cuidado ao interpretar resultados de amostras muito ictericas. Deve-se evitar congelar ou descongelar muitas vezes a mesma amostra, pois este processo pode causar a desnaturação de algumas enzimas (PELLEGRINOTTI, 1989; LOPES, 1998).

Na determinação das lesões hepática e muscular as enzimas mais utilizadas são as aminotransferases: alanina aminotransferase (ALT) para o fígado e aspartato

aminotransferase (AST), a creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) para o músculo esquelético.

➤ **2.5.1. Alanina aminotransferase (ALT/ TGP)**

A ALT, também conhecida como transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), está presente em tecidos como fígado, rins e músculos esquelético e cardíaco, com metabolismo ativo de aminoácidos. Catalisa a transferência reversível do grupo amino da alanina ao α -cetoglutarato, resultando na formação de piruvato e glutamato, como se observa na reação.



Sendo considerada hepato-específica porque um significativo aumento em sua atividade sérica somente é observado na degradação ou necrose hepatocelular em humanos. A necrose muscular severa pode elevar os valores de ALT em cães sem que haja doença hepática concomitante, no entanto degenerações ou necrose focal da massa muscular não elevam sua atividade sérica (KRAMER; HOFFMANN, 1997).

É uma enzima indicadora principalmente de dano hepático; ela está presente no citoplasma em (90%) e nas mitocôndrias (10%). É uma enzima que não tem isoenzimas (WILLARD et al., 1993).

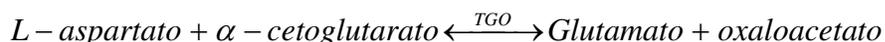
Segundo Bush (1991), a determinação de aminotransferase é a melhor maneira de verificar dano hepático em pequenos animais. Embora presente no coração, nos rins, músculos e eritrócitos, a enzima oriunda destes órgãos não é capaz de fazer a ALT aumentar muito mais do que três vezes (WILLARD; TVEDTEN, TURNWALD, 1993).

O aumento da ALT está relacionada com o número de células envolvidas, ou seja, com a extensão, e não com a gravidade da lesão. Na realidade, mesmo uma lesão que não

cause morte celular, pode ser suficiente para que ocorra a liberação de ALT na corrente sanguínea. De forma geral, em primatas, cães, gatos, coelhos e ratos, a ALT pode ser considerada uma enzima indicadora de dano hepático (BUSH, 1991).

➤ **2.5.2. Aspartato Aminotransferase (AST/ TGO)**

A enzima aspartato aminotransferase conhecida também por transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO), Esta enzima catalisa a transaminação reversível de aspartato e α -cetoglutarato em oxalacetato e glutamato como se observa na reação abaixo.

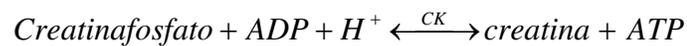


A AST é usada para avaliar condicionamento físico em animais treinados, pois é encontrada principalmente no fígado, eritrócitos e músculos esquelético e cardíaco; é utilizada para avaliar lesão muscular em conjunto com a CK e LDH. Na avaliação sua produção é menor que CK, mas se estendem por um tempo maior (TADICH et al., 2003).

Perez et al (1997) sugerem que AST deva ser incluída na monitoração de problemas musculares, sua utilização em conjunto com a CK pode oferecer informações mais precisas sobre o estado em que se encontra a lesão. A AST, por ser uma enzima mitocondrial e citossólica, necessita de uma lesão maior para ser liberada na corrente sanguínea. Por outro lado, CK e LDH, por serem citossólicas e de tamanho pequeno, conseguem ultrapassar a membrana celular mesmo que não exista um dano tecidual muito grande (PEREZ et al., 1997). Esta enzima também pode ser utilizada para determinar lesão hepática em pequenos animais da mesma forma que a ALT, porém com especificidade menor (TADICH et al., 2003).

➤ **2.5.3. Creatina Quinase (CK)**

A enzima creatina quinase (CK) também é conhecida pelo nome de creatina fosfoquinase (CPK), catalisa a fosforilação intracelular reversível da creatina pela adenosina trifosfato (ATP) com a formação de creatina fosfato, está associada com a geração de ATP nos sistemas contráteis ou de transporte. É um dímero composto por subunidades derivadas do músculo (M) ou do cérebro (B), apresentando quatro isoenzimas: CK-MM, presente nos músculos-esquelético e cardíaco; CK-BB presente no cérebro; CK-MB, encontrada principalmente no coração e a CK-Mt enzima mitocondrial que responde por até 15% da atividade da CK cardíaca. A creatina quinase é a enzima mais sensível para indicar lesão muscular cardíaca (KRAMER; HOFFMANN, 1997).



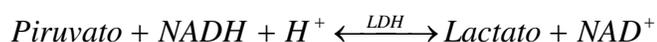
Sua função fisiológica predominante desta enzima ocorre nas células musculares, onde está envolvida no armazenamento de creatina fosfato (composto rico em energia). Cada ciclo de contração muscular promove o consumo de ATP com formação de ADP. A CK é amplamente distribuída nos tecidos, com atividades mais elevadas no músculo esquelético, cérebro e tecido cardíaco. Quantidades menores são encontradas no rim, diafragma, próstata, baço, reto, cólon, estômago e pâncreas. O fígado e eritrócitos são essencialmente desprovidos desta enzima (LANG; WURZBURG, 1982; JONES; SWAMINATHAN, 1990).

Pode ocorrer um incremento na atividade plásmatica desta enzima por injeção intramuscular, decúbito prolongado, convulsões, excesso de exercício, traumas, etc. Em problemas musculares é conveniente dosar também AST. A atividade da CK aparece elevada antes da AST e também desaparece primeiro. Assim, o padrão enzimático dessas enzimas pode indicar o estágio do problema. A atividade da CK aumentada com baixa atividade da AST indica lesão recente; níveis de atividade persistentemente altos das duas indicam lesão

continuada, enquanto que níveis de atividade baixos de CK e altos de AST indicam processo de recuperação (KRAMER; HOFFMANN, 1997).

➤ **2.5.4. Lactato Desidrogenase (LDH) intracelular**

A lactato desidrogenase é uma enzima da classe das oxidoreduases que catalisa a oxidação reversível do lactato a piruvato, em presença da coenzima NAD^+ que atua como doador ou aceptor de hidrogênio.



A LDH é uma enzima amplamente distribuída, presente no citoplasma de todas as células do organismo, encontrando-se em altas concentrações no fígado, rins, hemácias, músculos esquelético e cardíaco entre outros tecidos do organismo. Esta enzima pode ser utilizada para avaliar cardiomiopatias diversas (isquemia, endocardite bacteriana, dirofilariose, trombose aórtica e infarto do miocárdio). A LDH é considerada um bom indicador de lesão muscular em mamíferos. Lesões musculares de etiologias variadas podem estar relacionadas ao aumento da LDH (STURK; SANDERS, 1990).

A determinação da atividade da LDH é útil no diagnóstico de doenças hepáticas ou cardíacas se é determinada com outras enzimas como a CK ou quando é fracionada em isoenzimas (LDH_5 , presente no fígado e no músculo esquelético). A LDH isoladamente não é específica para nenhum órgão (STURK; SANDERS, 1990).

Garcia (1999) determinou a atividade da LDH em conjunto com CK para monitorar a intensidade do exercício físico em cavalos crioulos, obtendo êxito na quantificação das lesões musculares destes mamíferos. Na utilização destas enzimas em conjunto observou-se que a LDH aumenta menos rapidamente que a CK, mas também se mantém os valores elevados por mais tempo.

Cornelius (1996) observou que a concentração da LDH nos eritrócitos é 150 vezes maior do que no plasma. Portanto, uma hemólise leve é detectada por aumento nos níveis desta enzima no soro sanguíneo. Nos tecidos, a atividade da LDH é aproximadamente 500 vezes maior do que a encontrada no soro sanguíneo. Portanto, pequenas lesões produzidas nos tecidos provocarão concentrações elevadas desta enzima. Lesões musculares de etiologia variada podem estar relacionadas ao aumento da LDH (STURK; SANDERS, 1990).

Em relação aos efeitos da atividade física sobre o comportamento enzimático, pesquisas demonstraram que várias enzimas têm suas atividades aumentadas em diferentes atividades físicas. Foi observado que indivíduos treinados apresentaram níveis mais elevados de atividade enzimática do que indivíduos sedentários. A atividade enzimática é acompanhada a fim de se evitar lesões musculares de grande extensão (PELLEGRINOTTI, 1989; LOLLO, 2007).

2.6. Atividade física

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a prática de atividade física regular reduz o risco de mortes prematuras, doenças do coração, acidente vascular cerebral, câncer de cólon, mama e diabetes tipo II. Também na prevenção ou redução da hipertensão arterial, previne o ganho de peso (diminuindo o risco de obesidade), auxilia na prevenção ou redução da osteoporose, promove bem-estar, reduz o estresse, a ansiedade e a depressão. Especialmente em crianças e jovens, a atividade física interage positivamente com as estratégias para adoção de uma dieta saudável, desestimula o uso do tabaco, do álcool, das drogas, reduz a violência e promove a integração social (OMS, 2004).

O rápido crescimento das doenças crônicas associadas à inatividade física vem sendo registrado tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. A maioria da população adulta nos países desenvolvidos é inativa (JEBB; MOORE, 1999; WHO, 2002).

A prática de atividade física regular é um dos principais componentes na prevenção do crescimento da carga global de doenças crônicas. A inatividade física é responsável por aproximadamente 2 milhões de mortes no mundo. Anualmente, estima-se que ela seja responsável por 10–16% dos casos de cânceres de cólon, mama e de diabetes e 22% das doenças isquêmicas do coração. Nos Estados Unidos, o sedentarismo associado a uma dieta inadequada é responsável por aproximadamente 300 mil mortes por ano (MATSUDO, 2002).

A inatividade física não representa apenas um risco de desenvolvimento de doenças crônicas, mas também acarreta um custo econômico para o indivíduo, para a família e para a sociedade. Segundo dados do *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, só nos Estados Unidos, no ano 2000, o sedentarismo foi responsável pelo gasto de 76 bilhões de dólares com custos médicos, mostrando assim que seu combate merece prioridade na agenda de saúde pública (MATSUDO et al., 2002).

Segundo a estratégia global para dieta, a atividade física e saúde da OMS é recomendado que indivíduos se envolvam em níveis adequados de atividade física e que esse comportamento seja mantido para a vida toda. Diferentes tipos, frequência e duração de atividade física são requeridos para diferentes resultados de saúde. Pelo menos 30 minutos de atividade física regular, de intensidade moderada, na maioria dos dias da semana, reduz o risco de doenças cardiovasculares, diabetes, câncer de cólon e mama (MATSUDO et al., 2002).

O exercício físico regular e sistematizado promove alterações importantes no metabolismo protéico, que podem resultar em respostas anabólicas ou catabólicas, na dependência não só da intensidade, duração e frequência do exercício como também da ingestão alimentar, especialmente quantidade e qualidade da dieta consumida (LEMON; PROCTOR, 1991; LEMON, 1997; 1998; LOLLO et al., 2007).

Existem evidências de que o exercício de longa duração ocasiona aumento no consumo de diversos aminoácidos como fonte energética (HARALAMBIE; BERG, 1976;

LEMON; MULIN, 1980; BROOKS, 1987), especialmente os de cadeia ramificada (LEMON et al., 1982; WHITE; BROOKS, 1981). Acredita-se que o exercício de resistência aeróbia promova este tipo de resposta de catabolismo protéico principalmente se a ingestão de aminoácidos e energia for inadequada (DOHM et al., 1977).

Embora o treinamento de força possa ser extremamente intenso, as sessões são rápidas, tornando pouco provável que a oxidação de aminoácidos tenha papel relevante no suprimento de energia nesse tipo de exercício, sendo então os carboidratos os principais combustíveis após o treino ter terminado. O aumento do trabalho muscular é capaz de elicitar várias reações bioquímicas que são essenciais à hipertrofia do músculo (KRAEMER et al., 1996).

A captação de aminoácidos pelo músculo esquelético é um evento precoce para iniciar a hipertrofia, no entanto, esse processo decresce rapidamente após desnervação do músculo ou inativação por secção espinal. Estudos com músculos isolados têm demonstrado que a taxa de transporte de aminoácidos é proporcional à atividade contrátil, independente da ação da insulina (GOLDBERG, 1979).

Dentro das alterações metabólicas ocorridas durante o exercício físico contínuo de longa duração, a intensidade no qual o treinamento é realizado, assume importância para a sua discussão. Uma medida quantitativa da capacidade individual de sustentar um exercício contínuo é dada pelo consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx). Assim, o VO_2 máx, se refere à captação máxima de oxigênio e é uma variável preditiva do desempenho em exercícios contínuos de longa duração.

Nos experimentos que investigam a fadiga proveniente de exercício físico, a intensidade no qual ele é realizado se situa na faixa de 60-90% VO_2 máx, durante um período de tempo determinado. Assim, temos que, de acordo com a duração e intensidade do exercício, há ativação de sistemas energéticos e metabólicos específicos (LANCHA JUNIOR, 1996). Durante exercício físico intenso e prolongado, a fadiga se relaciona,

principalmente com a hipoglicemia, pois, tanto a glicose como a proporção da oxidação de carboidratos diminui. Ocorre a manutenção de altos níveis de oxidação de carboidratos quando esse é ingerido durante o exercício; levando à hipótese de que apenas indivíduos que demonstram queda na glicose sanguínea beneficiam-se da ingestão de bebidas com carboidratos. Outro fator de destaque é a relação entre depleção de estoques de glicogênio muscular e hepático, e a resistência ao exercício, correlacionados pelo nível de glicogênio pré-exercício. (SNYDER, 1998; TSINTZAS; WILLIAMS, 1998; MANNINEN, 2009).

Em intensidades de exercício mais altas e de curta duração (90% acima do $VO_{2máx}$), além do ATP produzido, outros metabolitos são produzidos em altas concentrações (lactato, H^+ , Pi, ADP), cujo acúmulo no organismo irá gerar diminuição no rendimento. É importante, ainda, observar que nestas condições, há depleção de fosfatos de alta energia no músculo. O exercício de alta intensidade depleta o glicogênio hepático e muscular (McLESTER JUNIOR, 1997; ROSSI; TIRAPEGUI, 1999).

Exercícios físicos, principalmente os resistidos com pesos, são de extrema importância para impedir a atrofia e favorecer o processo de hipertrofia muscular (PHILLIPS et al., 1999; YARASHESKI et al., 1999; HASTEN et al., 2000). Além disso, a nutrição exerce papel fundamental nesse processo. Pessoas fisicamente ativas e atletas necessitam de maior quantidade protéica que as estabelecidas para indivíduos sedentários. Segundo Lemon (1998), pessoas envolvidas em treinos de resistência necessitam de 1,2 a 1,4g de proteína por quilograma de peso ao dia, enquanto que atletas de força, 1,6 a 1,7g por kg de peso/dia, bem superior aos 0,8-1,0g por kg de peso/dia, estabelecidos para indivíduos sedentários. A ingestão de proteína ou aminoácidos, após exercícios físicos, favorece a recuperação e à síntese protéica muscular (LEMON, 1998; IVY et al., 2002; BØRSHEIN et al., 2004; HARAGUCHI, 2006).

Nos últimos anos tem-se verificado um avanço importante da nutrição esportiva, com base em princípios fisiológicos e bioquímicos (DAVIS; BAILEY, 1987; SGARBIERI, 2004).

Uma alimentação especial pode promover melhor saúde e otimizar os benefícios do treinamento. Sabe-se que aminoácidos e peptídios, como precursores da síntese protéica, exercem papel fundamental no organismo. Tem-se observado que a oxidação da leucina, em ratos treinados, é superior à de ratos não treinados (HENDERSON et al., 1985), portanto, o condicionamento físico aumenta o turnover e a oxidação da leucina e essa oxidação é acelerada na medida em que o organismo esteja mais depletado de glicogênio (SGARBIERI, 2004)

O exercício físico, em geral, requer um maior aporte protéico, o que se deve a uma maior utilização de aminoácidos como fonte energética no metabolismo. Na atividade física, a diminuição da disponibilidade de aminoácidos pode limitar o efeito estimulatório da insulina sobre a síntese tecidual de proteínas (BIOLO et al., 1999). Excessos na ingestão de proteínas podem, contudo, proporcionar efeitos negativos no metabolismo hepático e renal (SGARBIERI, 2004; MANNINEN, 2009).

Estudos com animais de laboratório, exercitados à exaustão, utilizando dietas com proteínas de soro de leite ou seus hidrolisados, levaram a conclusões ligeiramente diferentes em função do tipo de dieta usada (BIOLO et al., 1999; SGARBIERI, 2004; IVY et al., 2008).

Tassi (1996), utilizando proteína de soro com 15% de grau de hidrólise, observou que ratos submetidos a exercício exaustivo foram capazes de manter os teores séricos de glicose, albumina e do glicogênio muscular após o esforço realizado. Por outro lado, Ramos (2001), utilizando também ratos levados a exaustão e um hidrolisado protéico de soro lácteo, com 30% de grau de hidrólise em não observou o mesmo efeito protetor observado na pesquisa anterior. O autor atribuiu estes resultados provavelmente a que o hidrolisado com 30% de grau de hidrólise não tenha sido tão bem absorvido e metabolizado quanto o de menor grau de hidrólise (15%).

Dieta suplementada com as proteínas de soro de leite parcialmente hidrolisadas e carboidrato foi capaz de estimular a secreção de insulina e aumentar os níveis de

aminoácidos plasmáticos com maior eficiência que dietas suplementadas com proteína intacta (não hidrolisada) ou com apenas carboidrato em 80 indivíduos após um jejum noturno (VAN LOON et al., 2000).

Pimenta (2002) e Abecia-Soria (2003) utilizaram ratos *Wistar* jovens recebendo dois tipos de dieta: proteína de soro isolada ou um hidrolisado (grau de hidrólise 7.8%) resultante do mesmo isolado, submetidos a três condições experimentais: grupo sedentário, grupo treinado e grupo treinado à exaustão. Foram avaliados a evolução ponderal, tempo de exaustão, concentração de lactato sanguíneo, glicose, albumina e proteínas totais séricas, além de glicogênio e proteína muscular.

Os resultados mais relevantes neste estudo mostraram que a proteína hidrolisada promoveu melhor desempenho físico nos animais treinados, evidenciado pela maior resistência à exaustão. O consumo da dieta com hidrolisado de soro de leite promoveu redução na concentração do lactato sanguíneo e apresentou vantagem significativa quanto à manutenção dos níveis de albumina e de proteínas séricas totais. Foi possível inferir, desta pesquisa, que o grupo de animais alimentados com hidrolisado de soro tiveram melhor desempenho metabólico e foram significativamente mais resistentes à exaustão que os ratos que receberam a dieta com proteínas de soro íntegras (não hidrolisadas) (TASSI et al., 1998; ABECIA-SORIA, 2003; PIMENTA et al., 2006).

O exercício físico exaustivo pode causar depressão imunológica, produção de radicais livres e catabolismo protéico. As proteínas do soro de leite e seus hidrolisados agem estimulando o sistema imune (celular e humoral) através do estímulo linfocitário e produção de anticorpos; seus produtos metabólicos são antioxidantes e sequestrantes de radicais livres. Essas proteínas são rapidamente digeridas e absorvidas e a composição de aminoácidos das mesmas favorece a síntese de proteínas musculares, é de se esperar que sua ação seja benéfica ao organismo humano e animal, antes, durante e após períodos de exercícios intensos e/ou prolongados (ELPHICH et al., 2003; SMITH, 2003).

➤ 2.6.1. Vias que fornecem energia na atividade física

Como o exercício muscular requer um suprimento constante de ATP para fornecer a energia necessária à contração, as células musculares armazenam quantidades limitadas de ATP, por essa razão, vias metabólicas alternativas podem ser utilizadas: 1) formação de ATP pela degradação da creatina fosfato, 2) formação de ATP por meio da degradação da glicose ou do glicogênio (denominada glicólise), 3) formação oxidativa de ATP e 4) formação de ATP mediante a lipólise. As duas primeiras vias não envolvem a utilização de O₂ e são denominadas vias anaeróbicas (sem O₂), enquanto as demais vias utilizam o oxigênio, denominadas de metabolismo aeróbico (POWERS; HAWLEY, 2000).

2.6.1.1. Produção anaeróbica de ATP

O método mais simples e, conseqüentemente, mais rápido de produção de ATP envolve a doação de um grupo fosfato e de sua ligação energética da creatina fosfato (CP) para adenosina-difosfato (ADP) formando o ATP. Este sistema adenosina-trifosfato-creatina-fosfato (ATP-CP) é um mecanismo estimulado pela hidrólise do ATP no início do exercício, principalmente de maior intensidade. A reserva de ATP muscular é extremamente pequena e se esgotaria nos primeiros três segundos de exercício. Neste caso o composto CP que é um reservatório de fosfatos de alta energia, transfere um fosfato para reconstituir o ATP, que foi hidrolisado em ADP + Pi, em ATP novamente. Essa via é a única que possui a capacidade de fornecer energia de forma imediata; porém, esgota-se rapidamente, havendo a necessidade do aumento gradual da participação das demais vias (FOX; MATHEWS, 1986; McARDLE, 1992; LEMON, 1995; TIRAPEGUI, 2002). O sistema ATP-CP é mostrado na Figura 3.

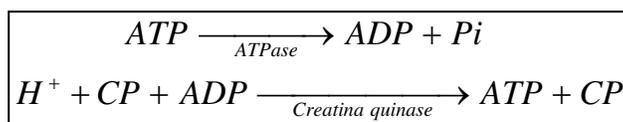


Figura 3. Hidrólise do ATP e ressíntese pela fosfocreatina

A reação é catalisada pela enzima creatina quinase. Tão rapidamente quanto a ATP é clivada em ADP + Pi no início do exercício, ela é ressintetizada pela ação da CP. Contudo as células armazenam somente pequenas quantidades da CP e, portanto a quantidade total de ATP que pode ser formado por essa reação é limitada. A combinação do ATP e da CP é denominada sistema ATP-CP, ou "sistema fosfagênio", e provê a energia para a contração muscular no início do exercício e em exercícios de curta duração e de alta intensidade (durando menos de cinco segundos). A recuperação da CP exige ATP e ocorre somente durante a recuperação do exercício (FOX; MATHEWS, 1986; McARDLE et al., 1998; LEMON, 1995; POWERS; HAWLEY, 2000; TIRAPEGUI, 2002).

Existe uma reação catalisada por uma enzima adicional para regenerar a ATP, e a enzima envolvida é chamada adenilato quinase. A reação de adenilato quinase é semelhante à reação de creatina quinase, que está próxima ao equilíbrio. Essa reação também serve para produzir o ativador (AMP) das enzimas alostéricas fosforilase (glicogenólise) e fosfofrutoquinase (glicólise), estimulando, dessa maneira, o catabolismo dos carboidratos.

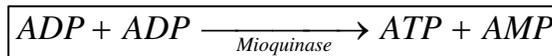


Figura 3.1. Adenilato quinase (mioquinase)

A importância do sistema do fosfagênio é que ele pode regenerar a ATP rapidamente. Durante o exercício onde a demanda da produção de ATP, pode ser fornecido tanto pela respiração mitocondrial quanto pela glicólise, e a reação da creatina quinase possibilita a produção de ATP adicional para que este se equipare às exigências da contração muscular (ZIMERER, 2007)

A segunda via metabólica capaz de produzir ATP rapidamente, sem envolvimento de O₂, é denominada glicólise. A glicólise envolve a degradação da glicose ou do glicogênio para formar duas moléculas de piruvato ou de lactato. Simplificando a glicólise é uma via

anaeróbica utilizada para transferir energia de ligações de glicose para unir o Pi ao ADP. Esse processo envolve uma série de reações acopladas catalisadas enzimaticamente. A glicólise ocorre no sarcoplasma da célula muscular e produz um ganho de duas moléculas de piruvato ou lactato por molécula de glicose (POWERS; HAWLEY, 2000).

A reação entre a molécula de glicose e o piruvato pode ser considerada como duas fases distintas: 1) fase de investimento de energia (5 reações) e 2) fase de geração de energia (6 reações). Nas cinco primeiras reações o ATP armazenado deve ser utilizado para formar fosfatos de açúcar. Embora o resultado final da glicólise seja a produção de energia (exergônica), a glicólise deve ser preparada pela adição da ATP em dois pontos no início da via (Figura 4.).

O objetivo do uso inicial do ATP é a adição de grupos fosfato (denominada fosforilação) à glicose e à frutose-6-fosfato. Observa-se que, se a glicólise começar com o glicogênio como substrato, é necessária somente a adição de um ATP (o glicogênio não necessita de fosforilação pelo ATP, já está fosforilado pelo fosfato inorgânico).

As últimas reações representam a “fase de geração de energia” da glicólise. Na Figura 4 pode-se observar que são produzidas duas moléculas de ATP em cada uma das duas reações separadas perto do final da via glicolítica. Portanto, o ganho da glicólise de duas ATP se a glicose for o substrato e de três ATPs se o substrato for o glicogênio (CERRTELLI et al., 1980; POWERS; HAWLEY, 2000).

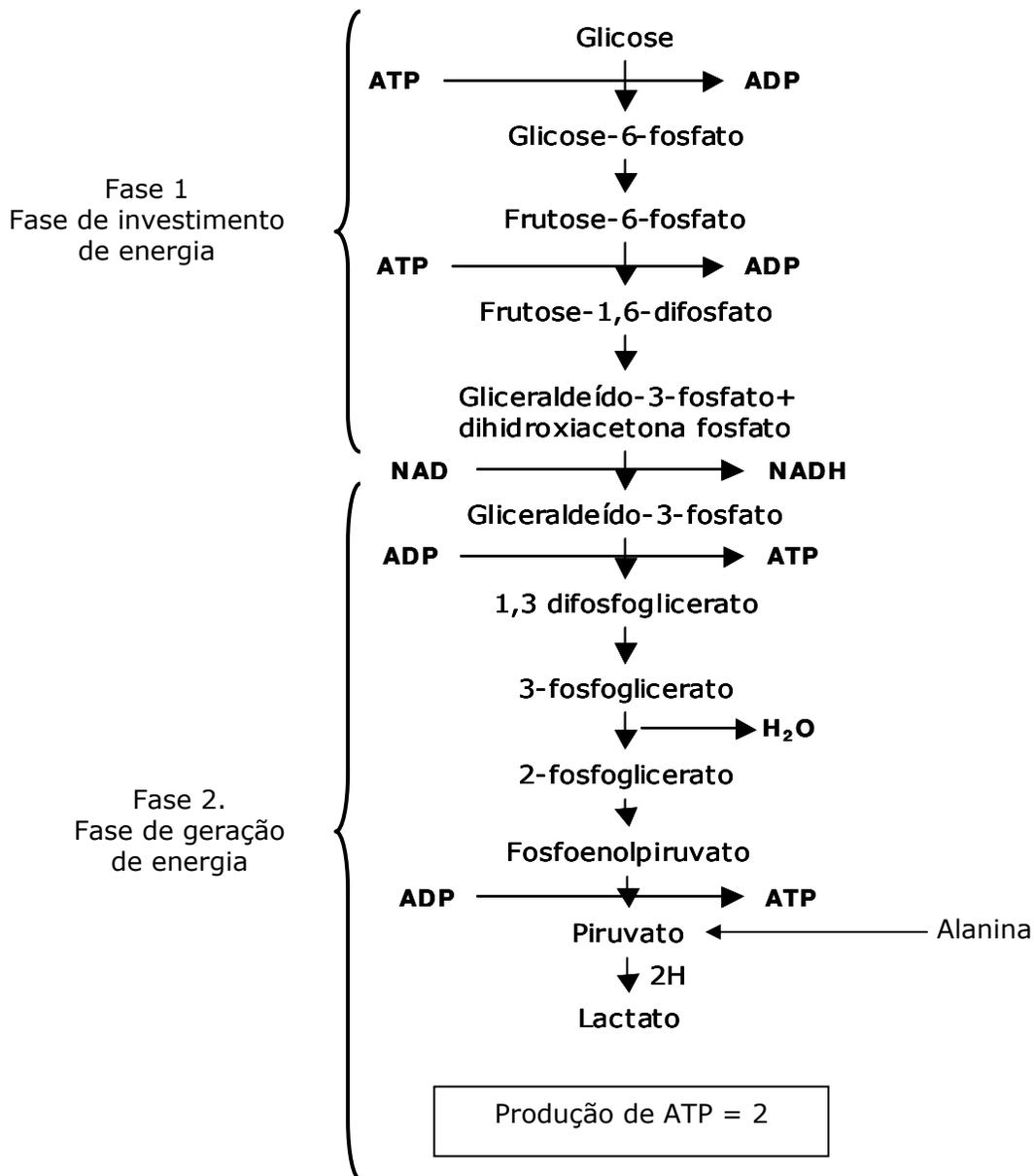


Figura 4. Resumo do metabolismo anaeróbico da glicose (POWERS; HAWLEY, 2000).

Os exercícios de curta duração e de alta intensidade utilizam predominantemente o sistema ATP-CP como fonte de energia; quando a duração se entende por mais tempo, a glicose começa a ser utilizada até a formação de lactato. Essas duas vias características dos exercícios de curta duração e alta intensidade fazem parte do metabolismo anaeróbico, no qual não há utilização do oxigênio consumido durante o exercício e a energia total produzida

é pequena, condizente com a demanda exigida por estes tipos de exercícios (LEMOM, 1995; TIRAPEGUI, 2002).

As vias anaeróbicas recrutam fibras musculares brancas (tipo II), predominantemente glicolíticas e com uma reserva de glicogênio e creatina fosfato maior. O tipo de treinamento determina as propriedades contráteis dos músculos, podendo conferir grande capacidade adaptativa à fibra muscular. No entanto, músculos de contração rápida, como o gastrocnêmio (porção branca) são capazes de produzir movimentos rápidos de grande potência, mas pouco repetitivos, utilizam carboidratos como principal fonte de energia. Por outro lado, músculos de contração lenta como o sóleo, são capazes de produzir movimentos lentos e repetitivos, e utilizam carboidratos e lipídeos como fonte de energia (GUYTON, 1988; SMOLKA, 1999).

2.6.1.2. Produção aeróbica de ATP

A produção aeróbica de ATP ocorre no interior das mitocôndrias e envolve a interação de duas vias metabólicas cooperativas: 1) o ciclo de Krebs e 2) a cadeia de transporte de elétrons. A função primária do Ciclo de Krebs é o término da oxidação (remoção de hidrogênio) dos carboidratos, das gorduras ou proteínas com a utilização de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) ou flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como transportadores de hidrogênio (energia). A importância de remoção é que os hidrogênios (em virtude dos elétrons que eles possuem) contêm a energia potencial das moléculas dos alimentos. Essa energia pode ser utilizada na cadeia de transporte de elétrons a fim de combinar o ADP + Pi para ressintetizar a ATP.

O oxigênio não participa das reações do ciclo de Krebs, mas é o aceptor final de hidrogênio no fim da cadeia de transporte de elétrons. É conveniente considerar a produção aeróbica de ATP como um processo de três estágios. O estágio 1 é a geração de uma molécula fundamental com dois carbonos, o acetil-CoA. O estágio 2 é a oxidação do acetil-

CoA no ciclo de Krebs. O estágio 3 é o processo de fosforilação oxidativa (ou formação de ATP) na cadeia de transporte de elétrons ou cadeia respiratória em presença de O_2 (Figura 5.) (CERRTELLI et al., 1980; POWERS; HAWLEY, 2000).

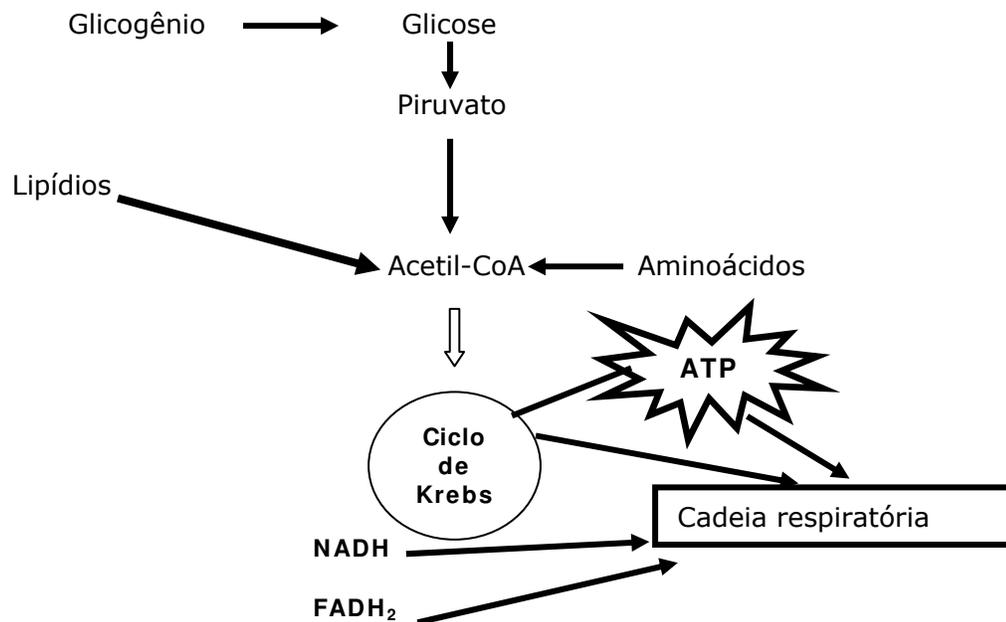


Figura 5. Glicólise aeróbia (TIRAPÉGUI, 2002).

Nos exercícios de longa duração e menor intensidade, a via preferencial é a aeróbia, que utiliza o oxigênio para oxidar os substratos energéticos (carboidratos + proteínas) na célula e produzir energia. A energia liberada por estas vias é muito maior que nas citadas anteriormente, porém mais demorada. Quanto maior a energia de um substrato, mais lenta será sua mobilização (TIRAPÉGUI, 2002).

As vias aeróbias, por sua vez recrutam fibras vermelhas (tipo I), predominantemente oxidativas, as quais possuem maior reserva de lipídios e glicogênio. Dessa forma, as fibras musculares utilizadas durante os exercícios vão sendo alternadas de acordo com o tipo de metabolismo predominante, dependendo da proporção de fibras de tipo I e II estabelecidas geneticamente e pelo treinamento em questão, os indivíduos terão desempenho maior para uma modalidade de esporte que outras (HAWLEY; BURKE, 1997; IVY; KUO, 1998).

Durante a primeira hora do exercício, existe um aumento na mobilização de ácidos graxos livres (AGL) do tecido adiposo e de glicose hepática. A oxidação de AGL é elevada, passando a responder pelo maior aporte energético nas atividades de longa duração, uma vez que a formação de ATP se torna mais eficiente (WAHREN, 1979 apud TASSI, 1996).

Nos últimos anos têm sido publicados muitos estudos abordando o consumo de proteínas e sua relação com o exercício físico. Estes trabalhos demonstraram que a participação dos aminoácidos no metabolismo energético é mais importante do que realmente se pensava. Parece clara a necessidade de um aporte protéico maior para os praticantes de atividade física de resistência ou força (ARAÚJO; SOARES, 1999). Mesmo não havendo definição dos requerimentos em proteína para esportistas, uma ampla porcentagem da população brasileira que realiza algum esporte ou faz fisiculturismo já consome dietas ricas em proteínas e outros suplementos protéicos (RAMOS, 2001; PIMENTA, 2002; ABECIA-SORIA, 2003).

Atuais pesquisas têm dado grande importância aos lipídeos e proteínas como fontes energéticas durante o exercício prolongado e nem tanto aos carboidratos que por muito tempo foram considerados como principal fonte energética para o exercício (TASSI et al., 1998; LIMA-SILVA, 2006).

➤ **2.6.2. Fontes de proteínas durante o exercício**

Entre os vários nutrientes existentes nos alimentos que ingerimos os carboidratos e as gorduras são as principais fontes de energia para a realização da atividade física. Contudo, a utilização de proteína como fonte energética também ocorre, especialmente durante a realização de exercício de longa duração (CERSOSIMO, 1987).

Assim, os aminoácidos servem como fonte auxiliar de combustível durante exercícios intensos e de longa duração e, após sua oxidação, são irreversivelmente perdidos. Caso não sejam repostos, via alimentação, haverá comprometimento, dentre outros do processo

normal de síntese protéica. Isso pode levar à perda da força muscular, diminuindo, então o desempenho físico (GUERRA et al., 2001).

A literatura sugere que as necessidades de proteína e/ou aminoácidos possam estar aumentadas em indivíduos sujeitos ao treinamento físico, que participam de atividades de alta intensidade e curta duração, ou de atividades de moderada alta intensidade e longa duração. Contudo, este ponto de vista ainda é discutível (LEMON, 1997). Assim sendo, é de grande interesse o estudo dos efeitos do treinamento físico e da intensidade do exercício sobre o metabolismo protéico muscular (CAMARGO et al., 2006).

Estudos realizados por Lancha Junior et al (1995) e Marquezi et al (2003) demonstraram que a suplementação de aspartato, asparagina e carnitina (45mg, 45mg e 90mg, respectivamente) promoveu maior tempo de tolerância ao esforço em ratos submetidos à natação.

O papel das proteínas como substrato durante o exercício é pequeno e depende principalmente da disponibilidade de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) e da alanina. O músculo esquelético pode metabolizar diretamente os BCAA para produzir ATP. Além disso, no fígado, a alanina pode ser convertida em glicose e retornada, através do sangue, ao músculo esquelético e ser estocada com o glicogênio a fim de ser utilizada como substrato energético (SCOTT; HOWLEY, 2000).

2.7. Glicogênio

É um polissacarídeo de reserva principalmente presente no fígado e no músculo esquelético. No fígado é armazenado para ser utilizado pelo outros tecidos e manter a concentração de glicose sanguínea especialmente nos estágios iniciais de um jejum. Já no músculo a função do glicogênio muscular é servir como reserva de combustível para a síntese de ATP durante a contração muscular. A glicose é a fonte de energia do cérebro e para células com poucas ou nenhuma mitocôndrias como os eritrócitos maduros. Também é

essencial como fonte de energia para o músculo em exercício, como substrato da glicose anaeróbica, a qual pode ser obtida de três fontes primárias: dieta, degradação do glicogênio e gliconeogênese (CHAMPE; HARVEY, 1996).

As causas mais comuns para a fadiga muscular são inúmeras, como uma dieta hipoglicídica (pobre em açúcares) faz com que o glicogênio muscular e hepático diminua rapidamente reduzindo o desempenho do exercício de curta duração, assim como de atividades prolongadas e submáximas. Tanto para atletas como para indivíduos que reduzem, demasiadamente, o percentual de lipídios (gorduras), como em dietas líquidas e de inanição (dieta sem ingestão de alimentos). Essas dietas tornam difícil, do ponto de vista do fornecimento de energia, participar na atividade ou no treinamento físico vigoroso fazendo com que o praticante tenha fadiga muscular mais cedo e constantemente (McArdle, et a. 1992).

➤ **2.7.1. Glicogênio hepático**

O fígado é um órgão fundamental na homeostase do organismo, com uma taxa metabólica é sensível a estímulos externos, podendo com isso responder aos agentes causadores de estresse com depleção dos níveis de glicogênio (GALLANI, 1995). Nos exercícios de intensidade baixa a moderada e de longa duração ocorre um aumento da depleção de glicogênio hepático (POWERS; HOWLEY, 2000, AFONSO et al., 2003). Depois de exercícios exaustivos, a queda nos níveis de glicogênio hepático e muscular indica a severidade do exercício (BERGSTROM et al., 1967; ROMIJN et al., 1993; LIMA-SILVA et al., 2007).

A síntese e degradação do glicogênio são processos que ocorrem continuamente; as diferenças entre as velocidades destes dois processos determinam os níveis de glicogênio depositados durante estados fisiológicos específicos (CHAMPE; HARVEY, 1996).

O adulto bem alimentado apresenta aproximadamente 100-400g de glicogênio (entre 1%-2% e 6%-8% do peso do músculo em repouso e do fígado, respectivamente). Não se sabe o que limita a produção de glicogênio a estes níveis. Os depósitos de glicogênio hepático aumentam durante o estado pós-prandial e são exauridos durante um jejum. O glicogênio muscular não é afetado por períodos curtos de jejum e é apenas moderadamente diminuído em jejum prolongado. O glicogênio muscular é sintetizado para repor os depósitos do músculo após terem sido exauridos, por exemplo, pelo exercício (CHAMPE; HARVEY, 1996).

➤ 2.7.2. Glicogênio Muscular

O glicogênio muscular consiste num importante estoque de substrato para o exercício prolongado aeróbico (ANDERSEN; SALTIN, 1985), sendo também utilizado na via glicolítica anaeróbica. A capacidade aeróbica está diretamente relacionada com a concentração de glicogênio muscular. Dessa forma, a redução das concentrações de glicogênio é progressiva, em função da duração da atividade física (GOREHAM et al., 1999; MANNINEN, 2009).

As reservas de glicogênio muscular diminuem progressivamente com exercícios prolongados, sendo que parte da energia despendida no esforço passa a ser fornecida pelos triglicérides musculares, glicose e por ácidos graxos livres (AGL) circulantes no plasma (ROMIJN et al., 1993; LIMA-SILVA, 2007). O tempo de sustentação de determinado exercício está relacionado com a quantidade de glicogênio muscular disponível para ressíntese da molécula de adenosina trifosfato (ATP) (BERGSTROM et al., 1967; BALDWIN et al, 2003).

O glicogênio muscular é o principal substrato energético para o exercício; assim, restaurar os estoques de glicogênio muscular após uma sessão de exercícios é um fator importante na determinação do tempo de recuperação, sendo que a restauração completa depende da extensão da depleção e do fornecimento de carboidratos (STANCANELLI, 2006).

Portanto, recomenda-se o consumo de carboidratos pelos atletas imediatamente após exercícios de curtos e intensos ou longos de moderada/baixa intensidade (JENTJENS et al., 2003).

A magnitude da depleção do estoque de glicogênio muscular parece ser diretamente proporcional à intensidade e duração de trabalho executado. Ou seja, a velocidade de utilização do glicogênio é maior quando aumenta a intensidade do exercício, sendo que a quantidade total de glicogênio utilizada está na dependência da duração total de trabalho executado durante as sessões de treinamento (STANCANELLI, 2006). Pesquisas têm sido conduzidas para determinar maneiras de aumentar a taxa da ressíntese de glicogênio muscular, já que a recuperação completa do mesmo pode demorar até 24-72 horas (VAN HALL et al., 1998, 2000).

Em exercícios físicos prolongados e de alta intensidade estão associados com baixos estoques e depleção de glicogênio, hipoglicemia e desidratação. As reservas de glicogênio muscular diminuem progressivamente e parte da energia despendida no esforço passa a ser fornecida pelos triglicerídeos musculares, por glicose e por ácidos graxos livres (AGL) circulantes no plasma (LIMA-SILVA, 2007). Nosso organismo estoca carboidratos sob a forma de glicogênio, tanto no fígado como nos músculos. Enquanto o glicogênio muscular é usado exclusivamente pelo músculo, o hepático é utilizado para a manutenção da glicemia e com o objetivo de suprir as necessidades energéticas do cérebro, do sistema nervoso e de outros tecidos. Portanto, a manutenção das reservas de glicogênio é fundamental para o rendimento esportivo (SOARES, 2001). A recuperação após o exercício é um desafio para o atleta, pois ele treina exaustivamente e tem um período que varia de 6 a 24 horas de recuperação entre as sessões de treinamento, e a recuperação envolve desde a restauração de glicogênio hepático e muscular até a reposição de líquidos e eletrólitos perdidos no suor (GUERRA, 2002). A reposição do glicogênio muscular encontra-se intimamente relacionada com a regulação dos transportadores da glicose a nível muscular (GLUT 4), bem como da

síntese do glicogênio, responsável pela adição de resíduos de UDP-glicose de forma consecutiva por forma a originar o polímero. A síntese do glicogênio processa-se em duas fases. A primeira, mais rápida e independente da insulina, é devida à maior permeabilidade da membrana, conferida pelo maior número de transportadores GLUT4. A segunda fase, já dependente da insulina, mas mais lenta, fica a dever-se à maior sensibilidade a esta, bem como a um aumento da expressão dos mesmos transportadores (HANSEN et al., 1998; IVY; KUO, 1998; VAN HALL et al., 2000; LIMA-SILVA, 2007).

2.8. Lactato

O lactato é um composto orgânico produzido naturalmente no corpo humano e também utilizado como fonte de energia na atividade física. O lactato é encontrado nos músculos, no sangue e em vários órgãos. A presença de lactato é necessária para que o via glicolítica anaeróbia funcione adequadamente. O lactato é formado pela hidrogenação do piruvato, quando este ainda não foi entregue, na forma oxidada, ao ciclo de Krebs. O lactato e o piruvato estabelecem o equilíbrio pela ação da lactato desidrogenase. Segundo a lei de ação de massas, o piruvato tende a acumular-se, quando há degradação intensa de glicose ou do glicogênio; quando a velocidade das reações de ciclo do ácido cítrico é mais lenta do que as da glicólise, quando a atividade da desidrogenase é alta, então, o lactato surge como um produto intermediário da glicólise em equilíbrio (LÓPEZ; FERNÁNDEZ, 1998; ARIAS et al., 2001).

O lactato é um dos metabólitos mais estudados do exercício, sendo considerado como: 1) doador imediato de energia para a contração muscular (HILL, 1913) apud GLADDEN (2000), 2) fator primário na inflamação do músculo, 3) causa principal do *débito de O₂* e 4) agente que ocasiona a fadiga muscular (GLADDEN, 2000).

O lactato foi por muito tempo considerado como um metabólico que pode movimentar-se rapidamente através das membranas musculares por simples difusão

(GLADDEN, 2000). Este conceito é questionado atualmente devido à presença dos transportadores do monocarboxilato (MCTs) eles encontram-se na membrana celular, sua função é a remoção simultaneamente o lactato e H^+ do meio intracelular para o sangue. Este tipo de transporte é chamado de *symport*. Existem, descritos na literatura, 14 isoformas de MCTs, das quais grande parte ainda não apresenta função determinada e específica, ao passo que outras já estão bem descritas no músculo esquelético, as isoformas MCT1 e MCT4 são dominantes (HASHIMOTO et al., 2005). A isoforma MCT1 é encontrada em maior proporção na membrana sarcolemal das fibras oxidativas, e MCT4 encontra-se predominantemente expressa na membrana sarcolemal das fibras glicolíticas (HASHIMOTO et al., 2005)

Existem várias teorias ao respeito, como a proposta por Lehninger (1970) citado por GLADDEN, 2000), que diz que "O lactato é o produto final na via glicolítica em condições anaeróbicas sendo difundido através das membranas das células plasmáticas para seus arredores, quando o músculo encontra-se em atividade vigorosa, sendo convertido em glicose no fígado durante a recuperação".

O lactato é formado pela ação da lactato desidrogenase no músculo esquelético ao ser exercitado, é o produto final da glicose anaeróbica em células eucarióticas. A formação de lactato é o principal destino do piruvato nas hemácias, cristalino e córneas oculares, medula renal, testículos e leucócitos, quando a produção de NADH (pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e pelas três desidrogenases ligadas ao NAD^+ do ciclo de Krebs) excede a capacidade oxidativa da cadeia respiratória. Isto resulta em relação elevada $NADH/NAD^+$, favorecendo a redução de piruvato para lactato (CHAMPE; HARVEY, 1996).

No músculo esquelético em anaerobiose, o lactato forma-se pela redução do piruvato. O piruvato tende a acumular-se, quando há degradação intensa de glicose ou do glicogênio. Assim, durante o exercício intenso o lactato se acumula no músculo causando uma queda no pH intracelular, potencialmente resultando em câibras. Grande parte deste lactato

posteriormente se difunde para a corrente sanguínea. Portanto, a concentração de lactato é modificada pela atividade física durante a realização de exercício (CHAMPE; HARVEY, 1996).

No trabalho de Robergs et al (2004) foi observado que a hipótese de que a produção do lactato causa acidose no meio não tem sustentação bioquímica. Os autores afirmam que a produção do lactato retarda, mas não causa a acidose. Esta pode ser causada por outras reações como a hidrólise de ATP proveniente de fontes não mitocondriais como a glicólise e o sistema fosfagênico. O ATP assim subministrado incrementa a concentração de prótons e causa a acidose durante o exercício físico intenso. A produção de lactato se incrementa nestas condições para prevenir a acumulação de piruvato e subministrar o NAD⁺ necessário para a segunda fase da glicólise. A produção incrementada de lactato coincide assim com a acidose celular e, portanto, continua sendo um bom indicador das condições celulares que induzem à acidose metabólica. Se não existisse produção de lactato durante a contração muscular, a acidose e a fadiga muscular ocorreriam mais rapidamente e o desempenho durante o exercício seria severamente comprometido.

Em condições de repouso, todo o lactato formado é oxidado por outros tecidos na mesma velocidade em que é produzido em ritmo estável (valor médio 0,9 mMol/L), mantido principalmente pelo ciclo de Cori (McARDLE, 1998).

Desde a década de 1920, acredita-se que o lactato seja produzido no músculo e em outras células como resultado da oxigenação insuficiente (BROOKS et al., 2000). Entretanto, sabe-se, atualmente, que o lactato é continuamente produzido e removido pelas células e, mesmo no músculo em repouso, há dez vezes mais lactato do que piruvato. Apesar de a glicólise poder contribuir para a formação de lactato, essa formação tem consequências mínimas, já que o lactato é removido, principalmente, pela oxidação (ARIAS et al., 2001).

A concentração de lactato sanguíneo é modificada pela atividade física. Depende, em primeira instância, da intensidade da carga de trabalho e, em segunda, da duração da mesma. Após 20 a 30 minutos da finalização da carga do trabalho, o lactato volta aos níveis

de repouso. A depuração de lactato é garantida, seja pela retransformação em glicose-glicogênio (ciclo de Cori) ou pela transformação em piruvato e sua oxidação muscular, sendo excretado pelo suor, fezes e urina (ARIAS et al., 2001).

Quanto mais vigorosa se torna a atividade física, maior será o fluxo de H^+ para o piruvato, aumentando a produção de lactato. Na recuperação, o lactato pode ser oxidado por mediação da lactato desidrogenase (LDH) sendo novamente transformado em piruvato que pode ser degradado na mitocôndria, onde o H^+ é novamente incorporado ao NAD^+ . Desta forma os elétrons do NADH são transportados pelo lactato para o interior da mitocôndria e diversos tecidos como coração, rins, fígado e músculo esquelético. (MCARDLE, 1998).

Hashimoto e Brooks (2008) descrevem que o transporte do lactato para o meio extracelular é uma forma de tamponar os prótons produzidos durante o exercício. O transporte do lactato é realizado por proteínas trans-membrana, chamadas de transportadores do monocarboxilato (MTCs). Esses transportadores realizam um co-transporte, do lactato e um H^+ , removendo, a cada mol de lactato uma quantidade igual de prótons. Com o co-transporte há diminuição da concentração de íons de H^+ intracelular, contribuindo assim com o tamponamento da acidose induzida pelo exercício (GLÁDIO, 2008)

O reconhecimento de que o lactato movimenta-se entre células produtoras e células consumidoras levou à formulação do conceito de "trânsito de lactato" (*lactate shuttle*). As fibras musculares glicolíticas (brancas, do tipo IIb), eram tidas como os locais primários de formação de lactato. Além disso, acreditava-se que as células altamente oxidativas, (vermelhas, de baixa oxidação), além das células musculares cardíacas eram apenas locais de remoção de lactato. Porém descobertas recentes indicam que as células musculares brancas como as vermelhas produzem o lactato. E que as mitocôndrias recebem e oxidam o lactato. De acordo com o conceito de "*lactate shuttle*", a glicólise resulta na formação do lactato devido à abundância da enzima glicolítica terminal lactato desidrogenase (LDH) que possui uma constante equilíbrio (K_{eq}) de $3,6 \times 10^4 m^{-1}$. Assim, a glicólise no citosol resulta

em produção de lactato, sendo que a maior parte é consumida pelas mitocôndrias, tanto das próprias células como das células musculares vizinhas. O transporte célula-célula de lactato funciona porque algumas células, tais como as que são encontradas nos músculos esqueléticos vermelhos e músculos cardíacos e do fígado, possuem alta densidade de mitocôndrias (BONEN et al., 2000; BROOKS et al., 2000; FERNANDES; BEZERRA, 2003).

O lactato é o produto final da glicólise, para o fornecimento de energia sem a presença de oxigênio (metabolismo anaeróbico). Em atividade física de alta intensidade, o suprimento de oxigênio nem sempre é suficiente. O organismo busca esta energia em fontes alternativas, produzindo o lactato (CHAMPE; HARVEY, 1996).

➤ **2.8.1. Metabolismo do Lactato no exercício**

Durante muitos anos o lactato foi considerado um produto inútil da glicólise (BONNE et al, 1997). No entanto, evidências recentes revelam que ele pode ter um papel benéfico durante o exercício, servindo tanto como substrato para o fígado sintetizar glicose quanto como fonte direta de substrato energético para os músculos esqueléticos e o coração e até mesmo reduzindo a acidose intramuscular durante a atividade física (ROBERGS, 2001).

Estudos metabólicos recentes que utilizaram ^{31}P -NMR (ressonância magnética nuclear de fósforo³¹), sugerem que o lactato é realmente um intermediário e não um metabólito final, com o único destino de ser reconvertido a piruvato. Estes estudos mostram ainda que, em tecidos musculares completamente oxigenados, aproximadamente 50% da glicose metabolizada é convertida a lactato. Isto pode representar um meio de armazenamento e/ou geração de energia em diferentes tecidos (GLADDEN, 2000).

Durante o exercício parte do lactato produzido pelo músculo esquelético é transportado ao fígado através do sangue. No fígado, o lactato se oxida a piruvato pela baixa razão NADH/NAD⁺ no citosol dos hepatócitos, então o piruvato é convertido à glicose pela gliconeogênese. Essa “nova” glicose ajuda na manutenção da glicemia e pode ser

utilizada pelo tecido muscular esquelético como fonte de energia durante o exercício. Este processo de lactato à glicose entre os músculos e o fígado é denominado Ciclo de Cori (Figura 6) (SCOTT; HOWELEY, 2000).

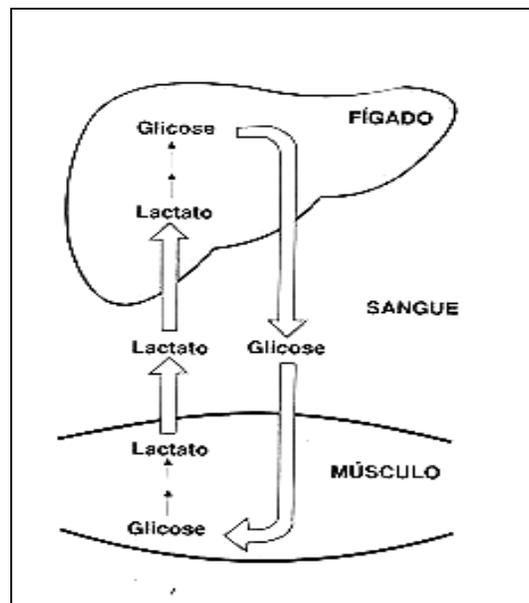


Figura 6. O ciclo de Cori (CHAMPE E HARVEY, 1996)

Neste ciclo a glicose originária do sangue é convertida pelo músculo em exercício em lactato, o qual se difunde no sangue. Este lactato é captado pelo fígado, e convertido em glicose, a qual é liberada novamente na circulação (CHAMPE; HARVEY, 1996).

A direção da reação da lactato desidrogenase depende das concentrações intracelulares relativas de piruvato, lactato e da razão NADH/NAD^+ na célula (no fígado e coração, a relação NADH/NAD^+ é menor que no músculo em exercício). No fígado e o coração oxidam lactato (obtido do sangue) em piruvato. No fígado, o piruvato é convertido em glicose pela gliconeogênese ou oxidado no ciclo de Krebs. O músculo cardíaco oxida exclusivamente o lactato até CO_2 e H_2O (CHAMPE; HARVEY, 1996).

O ciclo de Cori é complementado pelo ciclo alanina-glicose, proporciona não apenas um meio para a renovação do lactato, mas também para aumentar a glicose sanguínea e

ajudar na manutenção do pH intramuscular e do glicogênio muscular durante o exercício (HOLLMANN; HETTINGER, 2005).

➤ **2.8.2. Consumo de lactato**

O oxigênio adicional consumido durante o período de recuperação é chamado débito de O₂ e corresponde dentre outros, à oxidação posterior, no fígado, coração e músculos esqueléticos, do excesso de lactato formado durante a atividade muscular intensa. O excesso, inicialmente acumulado no sangue durante a atividade, e que não for processado pelo coração, será convertido a glicogênio no fígado. O ATP requerido é derivado dessa porção de lactato oxidado através do ciclo de Krebs no fígado (HILL et al., 1924 citado por GLADDEN; 2000).

Tassi et al (1998) observaram que em ratos submetidos ao exercício exaustivo e alimentados com proteínas do soro de leite tiveram concentrações menores de lactato e tempos maiores para atingirem à exaustão que os animais sedentários. Os autores concluíram que a produção de lactato pelo músculo é menor durante a atividade de contração.

Segundo Pilegaard et al. (1999a), um treinamento intenso pode aumentar o transporte de lactato e H⁺ em humanos, sendo considerado um sistema especializado para uma rápida remoção desses metabólitos durante o processo contrátil. Os autores examinaram o efeito de oito semanas de treinamento de alta intensidade nos MCTs através da extensão de joelho unilateral, realizada no pico de força isométrica. As concentrações de MCT1 e MCT4 mostraram-se 76% e 32% mais elevadas na perna treinada e na não treinada, respectivamente, ao passo que a taxa de transporte do lactato e H⁺ foi 12% maior na perna treinada. Estas modificações mostraram que o treinamento de alta intensidade pode aumentar a capacidade de transporte do lactato e H⁺ na musculatura esquelética humana e a eficiência do músculo em liberar lactato e H⁺ durante o processo de contração.

➤ 2.8.3. Lactato auxiliando na redução da acidose intramuscular

O lactato tradicionalmente era relatado como principal causa da acidose muscular, acreditava-se que as alterações em sua concentração eram inversamente proporcionais as alterações do pH intramuscular (Figura 7).

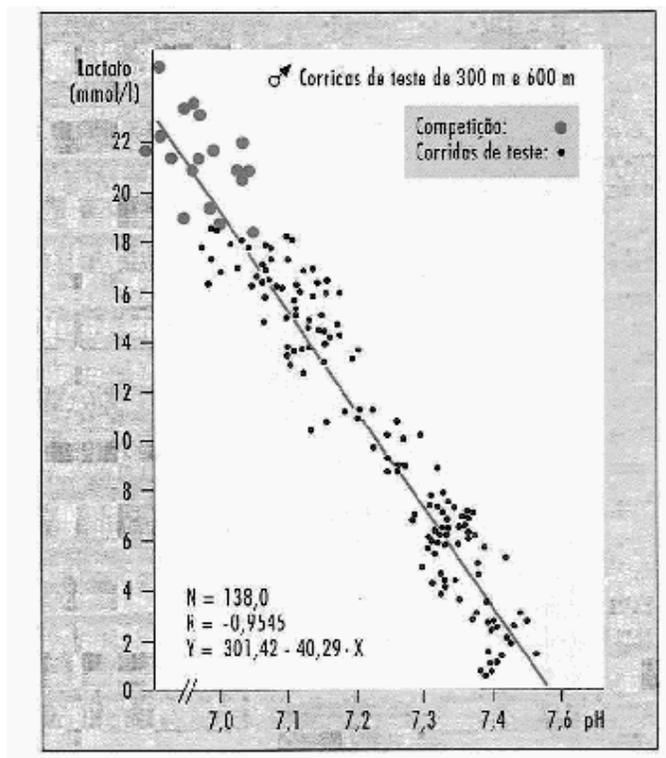


Figura 7. Queda de pH tradicionalmente associada ao acúmulo de lactato intramuscular

(HOLLMANN; HETTINGER, 2005)

A partir das publicações de Robergs (2001) iniciou-se discussão sobre a hipótese postulada de que a principal via de produção de H^+ na musculatura é a hidrólise do próprio ATP, e que a produção de lactato pela via glicolítica, através da ação da enzima lactato desidrogenase, na realidade contribuiria para a não acidificação intramuscular, pois retiraria prótons do meio. O transporte do lactato sintetizado nos músculos até a corrente sanguínea é feita através de transportadores de monocarboxilatos, em co-transporte com H^+ (GLADDEN, 2004). Assim, o aumento de lactato plasmático contribui para a manutenção do pH intramuscular.

Tendo em vista todos os tópicos discutidos até então sabe-se que o exercício físico induz uma série de adaptações metabólicas, as quais variam de acordo com a duração e intensidade do exercício (PIMENTA et al., 2003). Essas mudanças podem resultar em respostas anabólicas ou catabólicas, dependendo de inúmeros fatores. Dentre os fatores mais importantes destacandou-se a nutrição, especialmente o tipo e a quantidade da dieta consumida, e o exercício físico, especialmente quanto à intensidade, duração e frequência (LEMON, 1997). Pode-se dizer que as proteínas do soro de leite vêm sendo utilizadas em grande escala na produção de alimentos para esportistas, principalmente devido a sua rápida absorção. O efeito do exercício físico nos requerimentos protéicos tem sido um tópico controverso durante muitos anos (LEMON; PROCTOR, 1991). Em vista disso decidiu-se avaliar as alterações metabólicas ocorridas em ratos submetidos ao treinamento físico e alimentados com as proteínas do soro de leite.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar as alterações metabólicas induzidas pelo consumo de proteínas do soro de leite em ratos submetidos ao exercício físico em esteira.

3.2. Específicos

- Caracterização química das dietas
 - Caseína [CAS (padrão)],
 - Isolado de soro de leite (ISL)
 - Hidrolisado de soro de leite (HSL)
- Analisar as concentrações de:
 - Lactato sanguíneo,
 - Glicogênio hepático
 - Glicogênio muscular (gastrocnêmio e sóleo),

Induzidas pelo consumo das dietas caseína, isolado e hidrolisado de soro de leite, ministradas durante 35 dias em ratos treinados ou sedentários e levados ou não à exaustão.

- Determinar as atividades enzimática de no soro sanguíneo dos animais
 - Alanina aminotransferase (ALT/TGP),
 - Aspartato aminotransferase (AST/TGO),
 - Creatina quinase (CK) e
 - Lactato desidrogenase (LDH)

Induzidas pelo consumo das dietas caseína, isolado e hidrolisado de soro de leite ministradas durante 35 dias em ratos treinados ou sedentários e levados ou não à exaustão.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Dietas experimentais.
2. Composição das dietas.
3. Composição centesimal das dietas experimentais e da ração comercial.
 - Determinação de proteína da dieta pelo método de Kjeldahl.
 - Determinação de lipídeos da dieta pelo método de Bligh & Dyer.
 - Determinação de gordura por Mojonnier método AOAC (para o leite e derivados).
 - Determinação de umidade da dieta.
 - Determinação de cinzas da dieta.
4. Análise das fontes protéicas
 - Perfil de aminoácidos das fontes protéicas utilizadas
 - Eletroforeses em gel
 - Grau de hidrólise
5. Ensaio biológico.
6. Balanço de nitrogênio.
7. Parâmetros biológicos
 - Consumo da dieta
 - Crescimento dos animais
 - Ganho de peso
 - Indicador Tipo "PER"
8. Protocolo de treinamento.
 - Protocolo da exaustão
9. Métodos e parâmetros bioquímicos.
 - Determinação da concentração de lactato sanguíneo.
 - Coleta de sangue e tecidos.

- Determinação de glicogênio hepático e muscular (gastrocnêmio e sóleo).
- Determinação de enzimas:
 - Alanina aminotransferase (ALT/TGP),
 - Aspartato aminotransferase (AST/TGO),
 - Lactato desidrogenase (LDH) e
 - Creatina quinase (CK) no soro sanguíneo.

10. Análise estatística.

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP com o protocolo para uso de animais Nº 840-1 em junho 2005 (ANEXO 1)

4.1. Dietas experimentais

As fontes protéicas utilizadas para a elaboração das dietas foram: isolado de soro de leite ALACEN™895 (ISL), seu hidrolisado enzimático ALATAL™817 (HSL), ambas da New Zealand Milk Protein (NZMP™) (Wellington New Zealand) e caseína (CAS) fornecida por M. Cassab Comércio e Indústria Ltda (Alemanha), como controle.

ALACEN™895. Proteína isolada de soro de leite (ISL) produzida por troca iônica e ultrafiltração, e, devido a esses processos, possui baixos teores de lactose e gordura. Apresenta cor amarelo claro, um sabor suave, boas propriedades nutricionais, excelente capacidade gelificante e de aeração além de ser solúvel em diversas faixas de pH.

ALATAL™817 Proteína hidrolisada (HSL) de alta qualidade produzida através de um tratamento enzimático controlado do concentrado protéico de soro de leite resultando em aminoácidos, peptídeos e polipeptídeos. Uma vez que a hidrólise enzimática é um processo brando, os aminoácidos essenciais permanecem intactos e as proteínas mantêm seus valores nutricionais. Este produto apresenta excelentes características nutricionais

(PER=2.8), ótimas propriedades emulsificantes, boa solubilidade e suporta altas temperaturas. Sua cor é amarela clara e seu sabor é suave.

Estas proteínas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Fontes Protéicas, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, coordenado pelo Professor Dr. Jaime Amaya-Farfan.

CASEÍNA (CAS) é a principal proteína do leite bovino, sendo responsável por 80% do total de proteínas encontradas no leite. Confere 95% de digestibilidade e tem uma excelente composição de aminoácidos. A caseína é utilizada como proteína padrão, classificada como uma fosfoproteína que vem sendo usada desde os primórdios da suplementação para atletas e além de ter alta qualidade de aminoácidos possuindo propriedades funcionais.

A caseína foi fornecida pelo Laboratório de Ensaio Biológicos (LEB) do Departamento de Alimentos e Nutrição, da mesma faculdade acima mencionada.

Antes da formulação das dietas, foram determinados os teores de proteína bruta de cada fonte protéica, pelo método de Kjeldhal (HORWITZ, 1975) (ANEXO 2), o perfil de aminoácidos das três fontes protéicas (WHITE et al., 1986; HAGEN et al, 1989) (ANEXO 3), foi feita a análise por eletroforeses em gel de poliacrilamida-SDS-Tricina para separação de proteínas de baixo peso molecular das proteínas do soro de leite (ANEXO 4), e também foi determinado o grau de hidrólise pelo método do TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico), que determina a concentração de grupos amino primários (ADLER-NISSEN, 1979) (ANEXO 5)

As dietas experimentais foram elaboradas de acordo com a formulação preconizada pelo American Institute of Nutrition AIN-93G (REEVES et al., 1993), elaboradas de forma a serem isoprotéicas, isoenergéticas e isolipídicas com modificação no conteúdo de proteína bruta para 12% (PELLET; YOUNG, 1980).

4.2. Composição das dietas

As composições das dietas experimentais são apresentadas nas Tabelas 2 a 4.

Tabela 2.- Composição (g/Kg de dieta) das dietas utilizadas no ensaio biológico (35 dias), segundo AIN 93G.

Ingredientes	Dieta com isolado (g)	Dieta com hidrolisado (g)	Dieta com caseína (g) (padrão)
Amido de milho	466,3	457,7	455,3
Amido dextrinizado	132,4	132,4	132,0
Hidrolisado protéico	-	141,6	-
Isolado protéico	133,0	-	-
Caseína	-	-	141,2
Sacarose	100,3	100,3	100,0
Fibra	50,1	50,1	50,0
Óleo vegetal	70,2	70,2	70,0
Mistura mineral	35,1	35,1	35,0
Mistura vitamínica	10,0	10,0	10,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Ter-butilhidroquiona	0,014	0,014	0,014
L-cistina	-	-	3,00

A ausência da L-cistina nas dietas com isolado e hidrolisado de soro de leite é devido a que em estas fontes protéicas a L- cistina já está presente nas quantidades recomendadas pela FAO, aferindo da caseína.

Tabela 3.- Composição da mistura mineral (g/Kg mistura) utilizada para a realização do ensaio biológico (35 dias), segundo a AIN-93G.

Ingredientes	Quantidade (g)
Carbonato de cálcio, anidro 40.04%	357,00
Fosfato de potássio, monobásico, 22.76% P; 28.73% K	196,00
Sacarose em pó	221,03
Cloreto de sódio, 39.34% Na; 60.66% Cl	74,00
Sulfato de potássio, 44.87% P; 18.39% S	46,00
Citrato de potássio, tri-potássio, monoidratado, 36.16% K	70,78
Óxido de magnésio, 60.32% Mg	24,00
Citrato férrico, 16.5% Fé	6,06
Carbonato de zinco, 52.14% Zn	1,65
Metasilicato de sódio, nonaidratado, 9.88% Si	1,45
Carbonato de manganésio, 47.79% Mn	0,63
Carbonato cúprico, 57.47% Cu	0,30
Sulfato de potássio e crômio dodecaidratado, 10.42% Cr	0,275
Ácido bórico, 17.5% B	0,0815
Sodium fluoride, 45.24% F	0,0635
Carbonato de níquel, 45% Ni	0,0318
Cloreto de lítio, 16.38% Li	0,0174
Selenito de sódio, anidro, 30.03% Se	0,01025
Iodeto de potássio, 59.3% I	0,01
Paramolibdato de amônia, tetraidratado, 54.34% Mo	0,00795
Vanadato de amônia, 43.55%	0,0066

Tabela 4.- Composição da mistura vitamínica (g/Kg mistura) utilizada para a realização do ensaio biológico (35 dias), segundo a AIN-93G.

Vitaminas	Quantidade (g).
Ácido Nicotínico	3,00
Pantotenato de Cálcio	1,60
D-biotina (2% em CaCo ₃)	0,02
Riboflavina (a 80%)	0,60
Piridoxina-HCL	0,70
Tiamina-(1 Nitrato)	0,64
Ácido Fólico	0,20
Vitamina E (α -tocoferol) (500 UI/g)	15,00
Vitamina A (all-trans-retinil palmitato) (500.000 UI/g)	0,80
Vitamina B-12 (cianocobalamina) (a 1% em maltodextrina)	2,50
Vitamina D3 (colecalfiferol) (500.000 UI/g)	0,25
Vitamina K (filoquinona)	0,08
Açúcar refinado (ou dextrina)	974,66

Os animais inicialmente foram alimentados com dieta comercial (Labina) até atingirem aproximadamente 100g de peso. Após esse período foram oferecidas as dietas experimentais.

4.3. Composição centesimal das dietas experimentais e da ração comercial

Análise centesimal é um termo utilizado para determinar um conjunto de ensaios realizados em uma amostra geralmente alimentícia. Esses ensaios correspondem à determinação das porcentagens de Proteínas: Kjeldahl (HORWITZ, 1975) Lipídeos totais: Bligh Dyer (BLIGH DYER, 1959) e Monjonier (derivados lácteos) (AOAC, 1995); Umidade, cinzas (LEES, 1979; AOAC, 1990) e carboidratos por diferença.

➤ **4.3.1. Determinação de proteína da dieta pelo método de Kjeldahl**

O método de Kjeldahl determina o nitrogênio orgânico total, isto é, o nitrogênio protéico e não protéico orgânico. A razão entre o nitrogênio medido e a proteína estimada depende, entre outros fatores, da amostra avaliada. Para converter o nitrogênio medido em proteína deve-se multiplicar o valor encontrado por um fator específico para cada tipo de proteína, que é dependente da quantidade média de nitrogênio.

Quando este fator não é conhecido utiliza-se 6,25 como fator de conversão de nitrogênio total, uma vez que a maioria das proteínas possuem em média 16% de nitrogênio ($100/16=6,25$). Para determinação da proteína da dieta empregou-se o fator 6,25 enquanto que para os produtos lácteos foi utilizado o fator específico para este grupo de alimento, 6,38 (ANEXO 1).

➤ **4.3.2. Determinação de lipídeos da dieta pelo método de Bligh & Dyer**

Este é um método de extração de gordura a frio que utiliza uma mistura de três solventes: clorofórmio, metanol e água. Inicialmente, a amostra é misturada com metanol e clorofórmio, numa proporção que forma uma só fase com a amostra. Em seguida, adiciona-se mais clorofórmio e água de maneira a formar duas fases distintas: uma de clorofórmio (que irá solubilizar os lipídeos), contendo os lipídeos, e outra de metanol mais água, contendo as substâncias não-lipídicas (que irá romper as associações lipídeos-proteínas liberando-os, em proporção tal que um sistema miscível (monofásico) é formado com água). A fase de clorofórmio com a gordura é isolada e, após a evaporação do clorofórmio, obte-se a quantidade de gordura por pesagem (ANEXO 6).

➤ **4.3.3. Determinação de gordura por Mojonnier (método para o leite e derivados)**

Neste processo a amostra é tratada com hidróxido de amônia e álcool para hidrolisar a ligação proteína-gordura e, a gordura separada é então extraída com éter de petróleo e éter etílico. O álcool precipita a proteína, que é dissolvida na amônia, e a gordura separada pode se extraída com éter. A extração com éter de petróleo é eficiente em amostras com muito açúcar como, por exemplo, leite condensado. Normalmente, o método é bastante empregado para laticínios em geral (ANEXO 7).

➤ **4.3.4. Determinação de umidade**

A determinação de umidade é uma das medidas mais importantes utilizada na análise de alimentos. A umidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição e pode afetar a estocagem, a embalagem e o processamento dos alimentos.

A umidade é obtida por gravimetria, levando-se em consideração a porcentagem de sólidos totais, segundo a fórmula (AOAC, 1995):

$$\% \text{ Umidade} = 100 - \% \text{ sólidos totais}$$

A porcentagem de sólidos totais, por sua vez, é determinada depois que a amostra é seca em estufa (105°C por 6 horas) e pesada após resfriar em dessecador. O cálculo para a obtenção da porcentagem de sólidos totais é efetuado inserindo-se os valores obtidos na equação de porcentagem de cinzas (ANEXO 8).

➤ 4.3.5. Determinação de cinza

A cinza de um alimento é o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, que é transformada em CO₂, H₂O e NO₂. As cinzas são constituídas principalmente de grandes quantidades de K, Na, Ca e Mg, pequenas quantidades de Al, Fe, Cu, Mn e Zn; traços de Ar, I, F e outros elementos.

As cinzas obtidas não têm necessariamente a mesma composição que a matéria mineral presente originalmente no alimento, pois pode haver perda por volatilização ou alguma interação entre os constituintes da amostra. Os elementos minerais se apresentam sob a forma de óxidos, sulfatos, silicatos e cloretos, dependendo das condições de incineração e da composição do alimento (ANEXO 9).

A determinação de cinza fornece uma indicação do teor de elementos minerais contidos na amostra, para isso é utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{\text{Massa}_{\text{amostra+cadinho final}} (\text{g}) - \text{massa}_{\text{cadinho}} (\text{g}) * 100}{\text{Massa}_{\text{amostra inicial}} (\text{g})}$$

4.4. Análise das fontes protéicas

➤ 4.4.1. O perfil de aminoácidos das fontes protéicas (CAS, ISL e HSL)

As proteínas constituintes dos alimentos naturais e rações animais foram hidrolisadas com ácido clorídrico 6 N (Merck, [37%], Darmstadt, Alemanha), durante 24 horas. Os aminoácidos liberados na hidrólise ácida foram reagidos com fenilisotilcianato (PITC) (Pierce Nº 26922 Rockford, IL-USA), separados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa e detectados por radiações ultravioletas (UV) a 254 nm. A quantificação foi feita por calibração interna multinível, com auxílio do ácido α -aminobutírico (AAAB) (Aldrich, [99%], Milwaukee-USA) como padrão interno (WHITE et al., 1986; HAGEN et al., 1989) (ANEXO 3).

➤ **4.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A eletroforese SDS-PAGE em sistema descontínuo utilizando tricina como íon carregador, permite a resolução de pequenas proteínas a concentrações de acrilamida menores do que em sistema SDS-PAGE com glicina.

Neste sistema, além, da tricina substituir a glicina no tampão de corrida, são empregados três géis (gel de separação, gel espaçador e gel de empilhamento). A resolução superior das proteínas, essencialmente na faixa de 5 a 20 kDa pode ser omitido do procedimento se a resolução de pequenos peptídeos, abaixo de 5 kDa, não for de interesse (ANEXO 4)

➤ **4.4.3. Análise do grau de hidrólise (GH) da proteína parcialmente hidrolisada do soro de leite (HSL) utilizada**

Para a determinação do grau de hidrólise foi utilizado o método TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico), o qual determina a concentração de grupos aminos primários. O método consiste num ensaio espectrofotométrico que forma um cromóforo pela reação do TNBS com as aminos primarias (ADLER-NISEEN, 1979) (ANEXO 5).

4.5. Ensaio biológico

Foram utilizados 96 ratos machos da linhagem Wistar SPF, recém-desmamados (21 dias, 55g ±5g) procedentes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP. De acordo com os procedimentos descritos no "Guiding Principles for the Use and Care of Animals", os ratos foram mantidos em temperaturas de $22 \pm 2^{\circ}$ C e umidade de 50-60%, com o ciclo de luz invertido de 12 horas (início do ciclo escuro 06:00 e do claro 18:00 horas), durante todo o experimento (42 dias).

As duas primeiras semanas do experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais para seu crescimento. Na primeira semana os ratos foram alimentados com dieta comercial (LABINA/PURINA) para roedores de laboratório e “hamsters” até atingir um peso aproximado de 100g. A partir da segunda semana, os animais foram divididos em três grupos (32 ratos cada). Cada grupo foi alimentado com um tipo de dieta (CAS, ISL ou HSL) e foram submetidos a 35 dias de ensaio biológico. Os sete primeiros dias foram de adaptação às dietas experimentais, durante este período os animais permaneceram no Laboratório de Ensaio Biológicos (LEB) do Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN). Após este tempo os ratos foram transferidos para o Laboratório de Bioquímica do Exercício (LABEX), Instituto de Biologia-UNICAMP, onde os animais de cada dieta experimental foram divididos em 2 grupos treinados e sedentários (16 animais cada) e estes, por sua vez, foram subdivididos em 2 grupos [(treinados (T), treinados exaustos (TEX) ou sedentários (S) e sedentários exaustos (SEX)], respectivamente com 8 animais cada. Foram acondicionados cinco ratos por gaiola e submetidos exercício físico numa esteira rolante, recebendo água e comida a vontade (Figura 10).

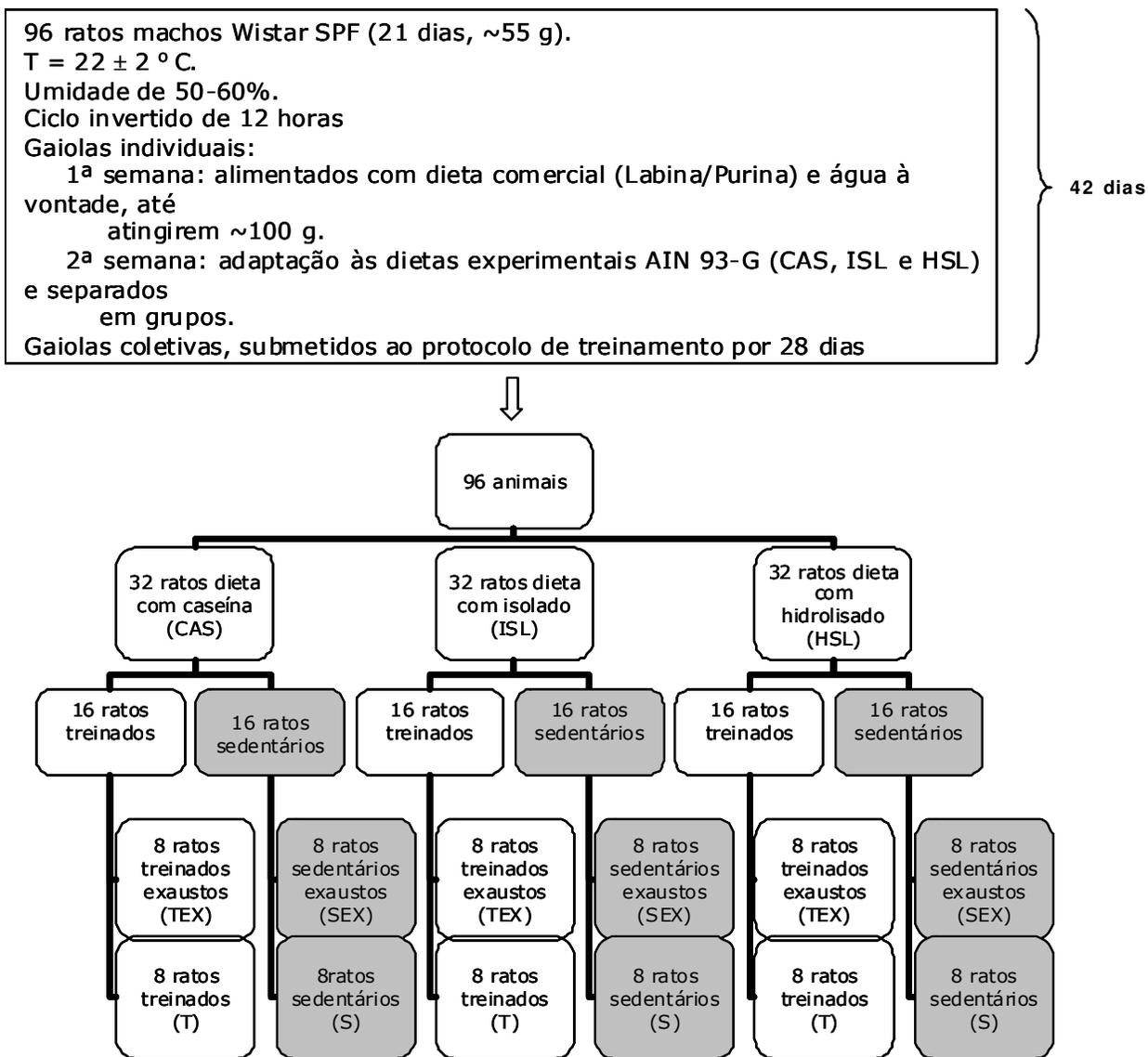


Figura 8. Esquema da divisão dos animais em 12 grupos para o ensaio biológico

➤ 4.5.1. Balanço de nitrogênio

O balanço de nitrogênio foi determinado para avaliar a qualidade das proteínas consumidas. Para esta determinação, os animais foram acondicionados no quinto dia depois de iniciada a dieta experimental (CAS, ISL ou HSL) em gaiolas metabólicas (Figura 9) que permitem a coleta de fezes e urina, separadamente, isentas de partículas de alimentos.



Figura 9. Gaiola metabólica.

A coleta de fezes e urina foi feita durante 3 dias para quantificação do nitrogênio excretado. A quantidade de nitrogênio ingerido foi determinada pelo consumo alimentar. Assim, o balanço nitrogenado (BN) foi calculado pela diferença entre o nitrogênio ingerido (NI) e a soma do nitrogênio excretado nas fezes (NF) e urina (NU):

$$BN = NI - (NF + NU)$$

As amostras foram analisadas pelo método semi-micro Kjeldahl (HORWITZ, 1975), para determinação do conteúdo protéico. Foi utilizado o fator de conversão 6,38 para a proteína da dieta (soro de leite e caseína) FAO/WHO, 1970.

4.6. Parâmetros biológicos

➤ 4.6.1. Consumo da dieta e ganho de peso dos animais

Os animais recém-chegados foram alimentados com dieta comercial (Labina/Purina) a vontade durante uma semana; logo após os ratos passaram a receber as dietas experimentais (CAS, ISL ou HSL), até o final do experimento (6 Semanas). Sendo os primeiros sete dias de adaptação às dietas experimentais. Durante este período os animais ficaram em gaiolas individuais no LEB e o consumo da dieta foi calculado individualmente,

após esse período os ratos foram transferidos para o LABEX (fase de treinamento) onde ficaram em gaiolas coletivas (n=5); foram colocados dois comedouros por gaiola e o cálculo do consumo da dieta foi feito através da média.

Durante todo o ensaio biológico (35 dias) as dietas e os animais foram pesados três vezes por semana (segunda, quarta e sexta), para um acompanhamento do consumo de dieta e o ganho de peso dos animais. As dietas foram colocadas, em comedouros de aço inox, os quais foram pesados, tarados e marcados. Durante a fase de adaptação (permanência no LEB), as pesagens das dietas e dos animais foram feitas, em balança de precisão (marca Gehaka modelo BG 1000, São Paulo-Brasil), e durante a fase de treinamento (LABEX) estas pesagens foram em balança de precisão (marca Núcleo modelo PR 5000 Nw, São Paulo-Brasil). O monitoramento do consumo das dietas e o ganho de peso dos animais foram feito até o dia que os animais foram mortos.

➤ **4.6.2. Protocolo de treinamento**

No mesmo dia que os animais foram transferidos para o LABEX, foram submetidos a um teste de aptidão física durante 5 min. com velocidade de 10 m/min. em esteira rolante (Figura 10), para serem separados os ratos de corrida voluntária dos que se recusavam a correr, sendo estes últimos descartados do experimento.

Após o teste de aptidão, os ratos que corriam voluntariamente foram separados em seus respectivos grupos [treinados (T), treinados exaustos (TEX) sedentários (S) e sedentários exaustos (SEX) para cada tipo de dieta experimental].



Figura 10. Esteira rolante para o treinamento físico dos animais

Os grupos T e TEX foram submetidos ao treinamento físico durante 4 semanas, (6 vezes/semana (segunda a sábado) no período da manhã), seguindo o protocolo de treinamento de ZOPPI (1999). Os 7 primeiros dias foram de adaptação ao exercício físico, e as três semanas seguintes de treinamento propriamente dito; em todos os casos o tempo e a velocidade foram aumentando paulatinamente (Tabela 5). Os ratos designados como sedentários (S e SEX) foram submetidos à atividade física, duas vezes/semana (segunda e quinta), correndo por 5 min. com velocidade de 10m/min.

Ao dia seguinte da última seção de treino os animais dos grupos TEX e SEX foram submetidos à exaustão e mortos 24 horas após serem exauridos.

Tabela 5. Protocolo de treinamento (6 vezes/semana) durante 4 semanas.

	Número de dias	Tempo inicial (min.)	Velocidade inicial (m/min.)	Tempo final (min.)	Velocidade final (m/min.)	Tempo total (min.)
Fase de adaptação	2	10	5	10	10	20
	4	10	5	30	10	40
Fase de treinamento	2	30	10	10	15	40
	4	10	10	30	15	40
	2	40	15	5	20	45
	4	40	20	10	25	50
	2	50	25	5	25	55
	4	60	25	60	25	60

4.6.3.1. Exaustão

Após as quatro semanas de treinamento físico, os animais dos grupos TEX e SEX de cada tipo de dieta (CAS, ISL e HSL) foram submetidos ao exercício físico até que ficassem exaustos, para o teste de exaustão os animais correram inicialmente a 25m/min, após 5min. A velocidade foi aumentada gradualmente até atingirem 32,5m/min (Tabela 6). Uma vez nessa velocidade os animais ficaram correndo até atingirem a exaustão.

Tabla 6.- Protocolo da exaustão

Velocidade inicial	Após 5 min.	Após 5min.	Após 5min.
25m/min.	27,5m/min.	30m/min	32,5m/min

O tempo necessário para que cada rato atingisse a exaustão foi devidamente registrado, considerando a exaustão como o momento no qual o animal não conseguia sair do choque constante. Nesse instante foi medida a concentração de lactato sanguíneo em amostras de sangue caudal.

Os animais foram mortos (24 horas após a exaustão) por decapitação (Figura 11), nessa mesma hora foi coletado o sangue e os diferentes órgãos (fígado e os músculos gastrocnêmio e sóleo), os quais foram congelados em nitrogênio líquido para as determinações analíticas posteriores.

4.7. Métodos e parâmetros bioquímicos

➤ 4.7.1. Determinação da concentração de lactato sanguíneo

Para a determinação deste parâmetro foram utilizados:

- Lactímetro Accusport (Böehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Alemanha) (FELL et al., 1998).
- Fita para medição de lactato BM-Lactate (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). e
- Tubos capilares.

O sangue dos animais foi coletado da cauda em tubo capilar e depositado na fita, a qual foi introduzida no lactímetro, para realizar a leitura da concentração de lactato (mmol/L). Esta medição foi realizada nos grupos TEX e SEX logo em seguida que os animais atingiram a exaustão. Estes animais foram mortos 24 horas após do teste de exaustão. No caso dos grupos T e S, esta medição foi realizada no mesmo dia da morte (24 horas após a última sessão de treino). A determinação da concentração de lactato foi feita seguindo a metodologia proposta por (FELL et al., 1998).

➤ 4.7.2. Coleta de sangue e tecidos

Os animais foram mortos por decapitação (24 horas após a última sessão de atividade física), e o sangue foi coletado em tubos sem heparina (Figuras 11 e 12, respectivamente) sendo posteriormente centrifugado a 765G (3000rpm) por 20 min a

temperatura ambiente (Centrifuga Luguimac LC-55R Argentina). O soro separado foi armazenado em tubo Eppendorf sob refrigeração (4°C) para a realização das diferentes análises enzimáticas.



Figura 11. Decapitação



Figura 12. Coleta do sangue

Imediatamente depois de coletar o sangue, se procedeu à extração do fígado e os músculos gastrocnêmio e sóleo (porção vermelha e branca). Logo após os órgãos foram envolvidos em papel alumínio e colocados e armazenados em de nitrogênio para posteriores determinações. (Figuras 13 e 14, respectivamente).



Figura 13. Coleta do músculo sóleo



Figura 14. Coleta do fígado

➤ 4.7.3. Determinação do glicogênio hepático e muscular

Para a determinação deste parâmetro como primeiro passo foi feito a curva padrão de glicogênio (mg/mL), com soluções de concentração de glicogênio entre 1-10 mg/mL, estas soluções padrões foram submetidas aos passos 7 a 11 da técnica (ANEXO 10).

A equação da reta $y = ax + b$ foi obtida em função da concentração de glicogênio (x) mg/mL versus a leitura média da absorvância (y), as leituras foram feitas a 490nm em espectrofotômetro Beckman DU70 (Figura 15).

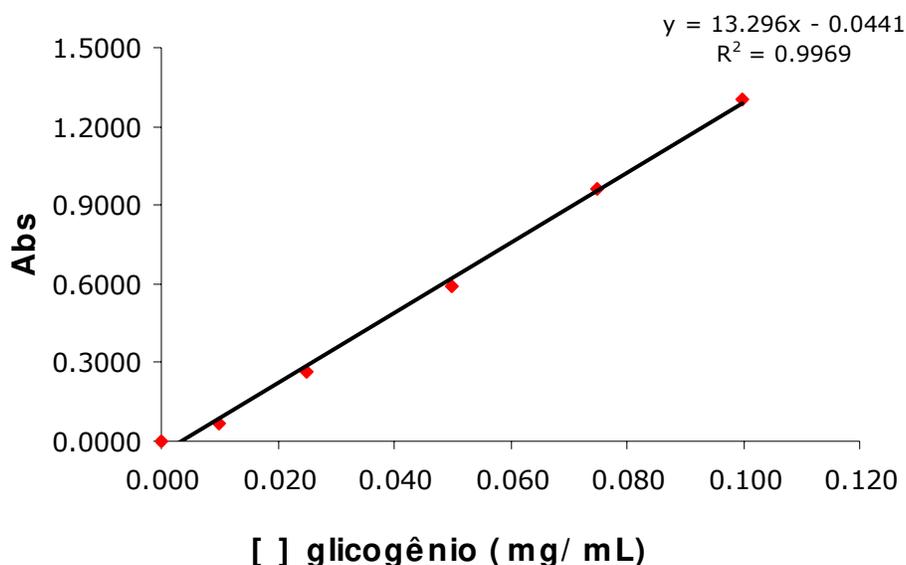


Figura 15. Curva padrão de glicogênio, obtida através do método de Lo et al. (1970)

Para obter a concentração de glicogênio nos tecidos, foi utilizada a equação seguinte onde $a=13,299$ e $b=0,0441$ provenientes da equação da reta (Figura 15).

$$[\text{Glicogênio}] (\text{g glicogênio} / 100\text{g tecido}) = \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - b) * 0,3}{a * \text{Peso amostra (g)}}$$

Para a determinação do *glicogênio hepático* foi padronizado o corte do lóbulo (lóbulo inferior) em todas as amostras e a mesma quantidade para minimizar os erros, a quantidade da amostra foi de 15-17mg aproximadamente, as amostras foram pesadas numa balança de

torção de precisão "Roller-Smith" e transferidas com pinça tipo fórceps para um tubo com 0,5 mL de KOH a 30%, saturado com Na₂SO₄. Os tecidos foram imersos na solução e mantidos em banho de gelo até que todos os tubos fossem preenchidos.

Na determinação do *glicogênio muscular* se procedeu da mesma forma que para o glicogênio hepático, sendo a única diferença a quantidade de amostra. Para o músculo gastrocnêmio foram pesadas amostras aproximadamente 33-35mg e para o músculo sóleo aproximadamente 18-20mg.

A determinação do conteúdo de glicogênio hepático e muscular foi feita segundo o método de Lo et al. (1970) (ANEXO 10).

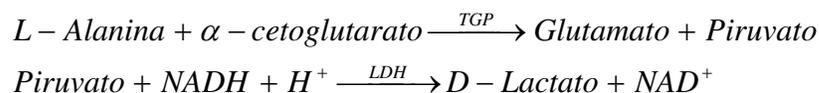
4.8. Determinação enzimática no soro sanguíneo.

O soro sanguíneo foi separado do sangue dos animais e foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas Alanina aminotransferase (ALT/TGP), Aspartato aminotransferase (AST/TGO), Creatina quinase (CK) e Lactato desidrogenase (LDH), através de kits comerciais, descritos a seguir.

➤ 4.8.1. Alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) EC 2.6.1.2

A TGP catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o α -cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A consequente diminuição da absorvância em 340nm pelo consumo do NADH, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

Princípio:

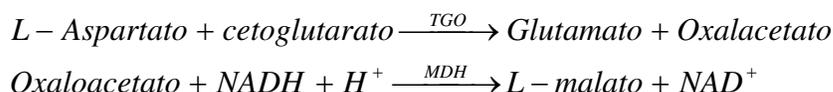


A atividade da enzima TGP foi analisada espectrofotometricamente a 340nm por método cinético – “UV liquid stable” determinado no soro sanguíneo, kit “LABORLAB” (SHAW et al., 1983) (ANEXO 11).

➤ **4.8.2. Aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO) EC 2.6.1.78**

A TGO catalisa a transferência de grupos amina do ácido aspártico para o α -cetogluturato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A consequente diminuição da absorbância em 340nm pelo consumo do NADH é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

Princípio:



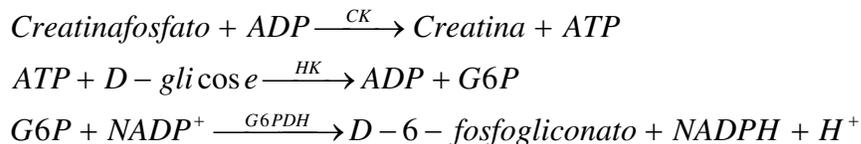
A atividade da enzima AST foi analisada espectrofotometricamente a 340nm por método cinético – “UV liquid stable” determinado no soro sanguíneo, kit “LABORLAB” (SHAW et al., 1983) (ANEXO 12).

➤ **4.8.3. Creatina Quinase (CK) EC 2.7.3.2**

A CK é ativada por N-acetilcisteína (NAC), catalisando a desfosforilação da creatinafosfato. Numa reação acoplada, catalisada pela hexoquinase (HK), a glicose é fosforilada pelo ATP formado na primeira reação, dando origem a D-glicose-6-fosfato (G6P).

Finalmente, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) catalisa a oxidação de G6P pelo $NADP^+$, dando origem a D-6-fosfogliconato e NADPH. A taxa de formação de NADPH, determinada pelo o aumento da absorbância a 340nm, é diretamente proporcional à atividade catalítica da CK.

Princípio:

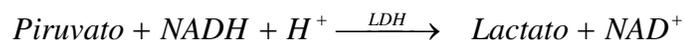


A atividade da enzima CK foi analisada espectrofotometricamente a 340nm por método cinético – “*UV liquid stable*” determinado no soro sanguíneo, kit “LABORLAB” (SHAW et al., 1983) (ANEXO 13).

➤ 4.8.4. Lactato desidrogenase (LDH) EC 1.1.1.27

A LDH catalisa a conversão do piruvato a lactato, enquanto o NADH é oxidado para NAD^+ . A atividade catalítica é determinada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH. Determina-se o decréscimo da absorbância em 340nm, que é proporcional à atividade de LDH na amostra analisada.

Princípio:



A atividade da enzima LDH foi analisada espectrofotometricamente a 340nm por método cinético – “*UV liquid stable*” determinado no soro sanguíneo, kit “LABORLAB” (SHAW et al., 1983) (ANEXO 14).

A leitura das absorbâncias de todas as amostras de soro, para cada enzima, foi realizada em espectrofotômetro (Beckman DU[®]-70, Fullerton, CA-USA) com temperatura regulável no Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). As leituras da LDH (estável por 12 horas), TGO e TGP (estáveis por três dias) foram feitas no mesmo dia da morte dos animais, enquanto que da CK (estável por uma semana) foi feita no segundo dia após a morte.

4.9. Análise estatística

Os resultados apresentados foram analisados pelo programa computacional STATISTICA[®] 5.0 para ambiente Windows[®], através da análise de variância ANOVA/MANOVA, utilizando o teste de comparações múltiplas de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957).

As letras maiúsculas (**A**, por exemplo) expressadas nas diferentes figuras representam a diferença estatística ou não entre as três fontes protéicas utilizadas, caseína (CAS), isolado de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL), para o mesmo grupo de treinamento.

As letras minúsculas (**a**, por exemplo) indicam ou não a diferença estatística da mesma dieta (CAS ou ISL ou HSL) nos diferentes grupos de atividade física [treinados exaustos (TEX), sedentários exaustos (SEX), treinado (T), sedentário (S)].

Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as diferentes dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou quando se compare a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados. As barras presentes nas

Figuras representam o erro padrão de média [EPM=desvio padrão (Dp) da amostra/raiz quadrada do número (n) de amostras (Dp/\sqrt{n})].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Dietas experimentais

As fontes protéicas utilizadas na preparação das dietas experimentais neste trabalho foram caseína (CAS) como proteína padrão, isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL) como únicas fontes de proteína, as dietas foram formuladas de acordo com o *American Institute of Nutrition* AIN-93 (REEVES et al, 1993), com modificação no conteúdo de proteína bruta para 12% (PELLET, 1980).

Determinou-se o teor de proteína bruta das três fontes protéicas em base seca pelo método semi-micro Kjeldahl (HORWITZ, 1975). Nesta determinação, foi observado que as fontes protéicas utilizadas apresentaram concentrações elevadas de proteína (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração protéica das diferentes fontes usadas em base seca

Fonte protéica	%
Caseína	85,00
Isolado de soro de leite	90,24
Hidrolisado de soro de leite	85,25

5.2. Composição centesimal das dietas experimentais e da ração comercial

A composição centesimal da ração comercial e das dietas experimentais CAS, ISL e HSL está apresentada na Tabela 8. Todas as determinações da composição centesimal foram feitas por triplicata

Tabela 8. Composição centesimal (%) das dietas consumidas pelos animais durante o ensaio biológico

Dietas	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)	Carboidratos (%)
Ração comercial	24,8	4,0*	8,1	11,0	52,1
Hidrolisado	12,9	8,8**	2,9	7,6	67,8
Isolado	12,5	8,5**	2,6	7,7	68,7
Caseína	12,6	8,0**	2,6	9,0	67,8

* Determinado por Bligh Dyer (BLIGH DYER, 1959)

** Determinado por Monjounier (AOAC, 1995)

Pode-se observar que as três dietas foram formuladas para serem isotróficas (12,7%), isoenergéticas (68,1%) e isolipídicas (8,4%).

5.3. Análise das fontes protéicas

➤ 5.3.1. Perfil de aminoácidos (aa) das fontes protéicas utilizadas [Caseína (CAS/ padrão), isolado (ISL) e hidrolisado (HSL) de soro de leite]

Na Figura 16 está apresentada a composição dos aminoácidos (perfil de aa) das três fontes protéicas (CAS, ISL HSL) utilizadas em comparação ao perfil de aminoácidos essenciais preconizados e recomendados pela (FAO, 1985).

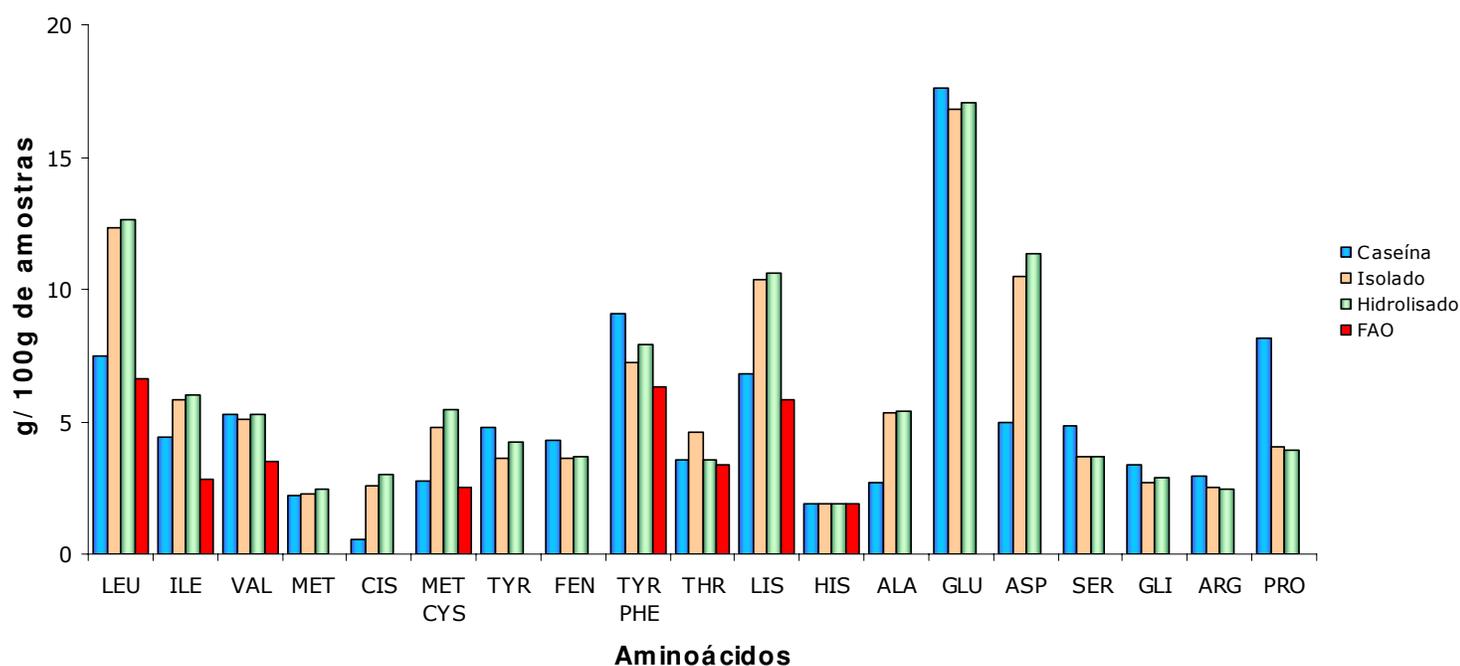


Figura 16. Perfil de aminoácidos das três fontes protéicas utilizadas caseína (CAS) e proteínas do soro de leite isolado (ISL) e hidrolisado (HSL) e comparadas com o perfil de aminoácidos essenciais FAO (Food and Agriculture Organization FAO, 1985)

Comparando o perfil de aminoácidos (aa) essenciais das fontes protéicas (CAS/padrão, ISL e HSL) utilizadas ao perfil de aa essenciais preconizados e recomendados pela FAO, observou-se que as três fontes proporcionam todos os aa essenciais em quantidades superiores ou iguais (no caso da Histidina) recomendadas pela FAO.

A caseína é utilizada como proteína padrão por ser uma proteína de excelente qualidade, valor nutricional, elevado teor de aminoácidos essenciais, da sua digestibilidade e

disponibilidades de seus aa. A caseína é usada por muitos pesquisadores como proteína de referência para avaliar a qualidade protéica dos alimentos (FAO, 1985). Também é usada como proteína padrão na preparação de dietas para roedores pelo *American Institute of Nutrition* AIN-93 (REEVES et al., 1993), As caseínas (80%) são umas das principais proteínas do leite, o outro grupo de proteínas que se encontra no leite são as proteínas do soro de leite (20%) também com excelente valor biológico, alto teor de aminoácidos essenciais, escore químico superior às de outras proteínas de origem animal, possuem elevadas concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada principalmente a leucina entre outros (Figura 16), além de suas propriedades funcionais (SGARBIERI, 2004; HARAGUCHI et al., 2006).

➤ **5.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-Tricina**

A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-Tricina para separação de proteínas de baixo peso molecular é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, pois as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa. Em alguns casos, a relação carga/massa e o formato das moléculas também influem, pois algumas terão maior facilidade para migrar pelo gel (Figura 17).

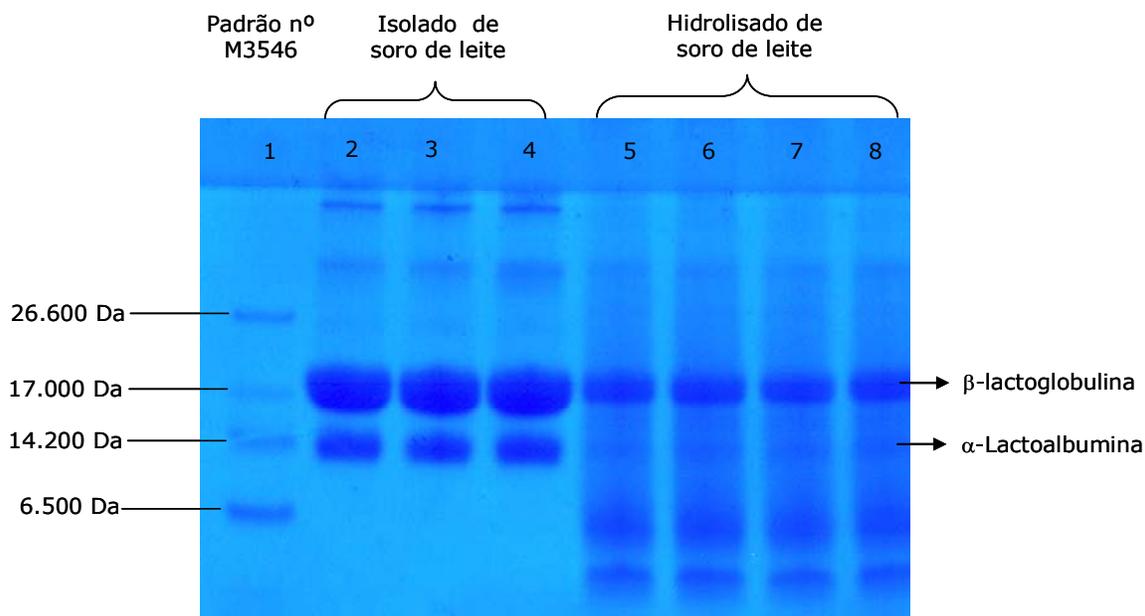


Figura 17. Eletroforeses em gel de poliacrilamida-SDS-Tricina das proteínas do soro de leite isolado (ISL) e hidrolisado (HSL) (SCHAGGER; JAGOW, 1987; CLAEYS et al., 2004)

As colunas 2, 3 e 4 correspondem à proteína isolada do soro de leite, onde se observa claramente a presença das frações β -lactoglobulina e α -lactoalbumina na sua forma íntegra de acordo com o padrão nº M3546 (coluna 1). As colunas 5, 6, 7 e 8 correspondem à proteína hidrolisada. Nessas colunas observa-se que a fração β -lactoglobulina está parcialmente hidrolisada em comparação com a proteína íntegra. Esta fração devido a seu peso molecular (18.000 Da) é resistente à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago sendo portanto absorvida no intestino delgado. Este peptídeo apresenta o maior teor de BCAA, com um valor de quase 25% (De WIT, 1998).

A fração da α -lactoalbumina com peso molecular 14.200 Da, foi quase completamente hidrolisada em relação à proteína íntegra. Este peptídeo é de rápida digestão (De WIT, 1998). Também foi observada a presença de peptídeos com peso molecular de 6.500 Da ou inferiores (Figura 17).

➤ **5.3.3. Análise do grau de hidrólise da proteína parcialmente hidrolisada utilizada na dieta experimental**

Foi determinado o grau de hidrólise para a proteína hidrolisada utilizando o método do TNBS (ADLER-NISSEN, 1979). O grau de hidrólise encontrado foi de 10% o qual é considerado grau médio.

Pesquisas vêm utilizando as proteínas do soro de leite com diferentes graus de hidrólise em ratos submetidos à atividade física com o objetivo de encontrar qual é o grau de hidrólise que proporciona o melhor desempenho físico.

Tassi et al. (1998) investigaram o efeito da alimentação com α -lactoalbumina bovina intacta ou parcialmente hidrolisada (grau de hidrólise 15%) como única fonte de proteína em ratos submetidos à atividade física (natação) e levados a exaustão, os autores concluíram que a forma hidrolisada preservou a concentração de glicogênio muscular, glicose e albumina sérica em comparação à proteína padrão (CAS). Os animais foram mortos logo após terem chegado à exaustão.

Pimenta et al. (2006) observaram também que ratos treinados em esteira e alimentados com hidrolisado de soro de leite com grau de hidrólise 7,8% tiveram menores concentrações de lactato logo após da exaustão, maiores concentrações de glicogênio hepático, albumina sérica quando comparado com a proteína intacta. Os animais foram mortos 48 horas após a exaustão.

No presente estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar submetidos à atividade física e alimentados com dietas experimentais: caseína (padrão), isolado de soro de leite e seu hidrolisado (10% de grau de hidrólise). Observou-se que, tanto a proteína hidrolisada como a isolada de soro de leite proporcionaram maior resistência à exaustão tanto nos animais treinados como os sedentários que os que receberam caseína (Figura 23). Neste trabalho os animais foram mortos 24 horas após a exaustão.

5.4. Balanço de Nitrogênio (BN)

O resultado do balanço de nitrogênio foi positivo para as três dietas experimentais (CAS, ISL e HSL), não existindo diferença significativa entre elas ($0,87 \pm 0,02$ para CAS, $0,81 \pm 0,02$ para ISL e $0,83 \pm 0,02$ para HSL) e indicando que a ingestão de nitrogênio foi superior à excreção em todos os casos. Isto sugere que as proteínas utilizadas e consumidas pelos animais foram de boa qualidade e conseqüentemente, os animais apresentaram um crescimento com tendência linear durante todo o ensaio biológico.

O BN positivo caracteriza indivíduos em crescimento, ou seja, em anabolismo, demonstrando que há retenção de nitrogênio para formação de novos tecidos pelo organismo. O BN, além de caracterizar o estado de saúde, pode fornecer também dados sobre o valor nutritivo das proteínas tanto em indivíduos adultos como em crescimento. A ingestão de uma dieta desbalanceada contendo proteínas que não possuam todos os aminoácidos essenciais pode levar a um BN negativo (SGARBIERI, 1996).

5.5. Parâmetros biológicos

➤ 5.5.1. Consumo alimentar

A quantidade de dieta consumida pelos animais foi monitorada durante todo o ensaio biológico (42 dias), mas foram desconsiderados os sete primeiros dias onde os animais foram alimentados com ração comercial (Labina/Purina). Após este período, o consumo médio das dietas experimentais (CAS, ISL e HSL) foi registrado através da quantidade de dieta consumida (peso) pelos animais e foi calculado o consumo diário médio por dieta e tipo de treinamento (Figura 18).

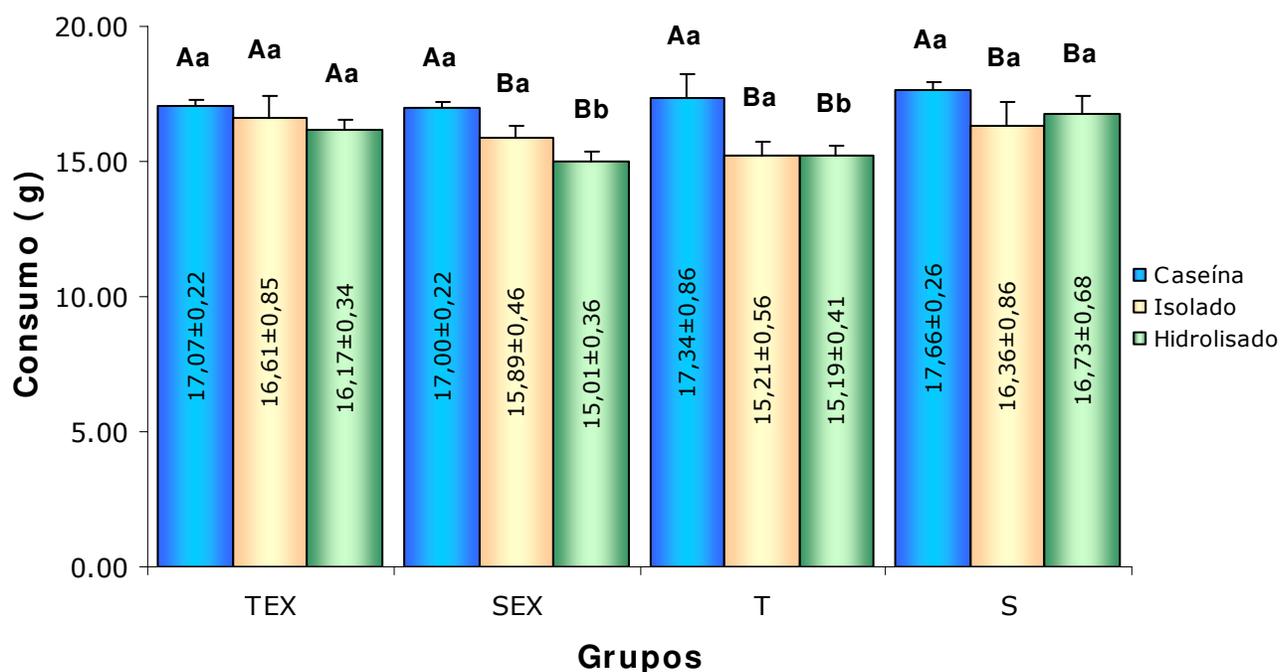


Figura 18. Consumo diário médio (g) de dieta \pm erro padrão da média (EPM) durante 35 dias. Letras maiúsculas representam a diferença estatística ou não entre as três dietas estudadas [caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL)] no mesmo grupo de treinamento. Letras minúsculas indicam ou não a diferença estatística da mesma dieta (CAS ou ISL ou HSL) nos diferentes grupos de atividade física [treinados exaustos (TEX), sedentários exaustos (SEX), treinado (T), sedentário (S)]. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957)

Comparando o consumo da dieta padrão (CAS) com o consumo das outras duas dietas (ISL e HSL) em cada grupo de treinamento (TEX, SEX, T e S), observou-se que o consumo diário da dieta CAS em todos os grupos apresentou valores maiores em comparação com as outras duas fontes protéicas, existindo diferença significativa em todos os grupos, exceto no grupo TEX (Figura 18).

Quanto ao consumo da dieta CAS nos distintos grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Isto indica que a atividade física realizada pelos animais, com ou sem exaustão, não influenciou o consumo da dieta.

Quando se considero o consumo diário dos animais que receberam a dieta ISL, não houve diferença estatística em relação os ratos que consumiram a dieta com HSL dentro do mesmo grupo de treinamento (TEX, SEX, T e S). Também não foi observada diferença significativa no consumo da dieta ISL nos distintos grupos de atividade física.

Em relação ao consumo diário da dieta HSL nos diferentes grupos de treinamento verificou-se que os ratos dos grupos TEX e S tiveram valores significativamente maiores quando comparados com os animais dos grupos SEX e T. Entre os grupos TEX e S não houve diferenças significativas assim como entre os outros dois grupos.

➤ **5.5.2. Crescimento dos animais**

O crescimento dos animais durante o ensaio biológico foi fundamentado no ganho de peso (g) médio por semana, desde o dia da chegada (peso inicial) até o final do experimento (6 semanas). O crescimento dos animais teve um comportamento lineal, independentemente da fonte protéica ministrada ou da atividade física realizada. Os dados do crescimento (g) médio semanal dos animais estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Pesos (g) médios semanais dos animais durante o ensaio biológico (42 dias). Letras maiúsculas comparam as diferentes fontes protéicas (CAS, ISL, e HSL) entre si nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S)

Dietas	Grupos	Peso Inicial	Semanas					
			1º	2º	3º	4º	5º	6º
CAS	TEX	55,6	87,3	121,1	159,5	195,1 A	235,4 A	273,9 A
ISL	TEX	56,7	87,4	119,3	151,2	179,0 B	207,3 C	237,6 C
HSL	TEX	55,5	83,0	120,9	154,0	185,0 AB	220,5 B	257,5 B
CAS	SEX	61,1	98,8	136,2	173,1 A	208,2 A	253,0 A	290,8 A
ISL	SEX	62,6	96,5	126,8	158,7 B	182,0 B	227,1 B	262,6 B
HSL	SEX	60,8	96,5	132,9	164,2 AB	194,8 AB	236,1 AB	280,2 AB
CAS	T	55,2	86,5	127,4	166,7 A	199,0 A	236,3 A	266,1 A
ISL	T	53,5	88,3	121,1	150,0 B	174,9 B	200,9 C	233,8 B
HSL	T	52,3	87,3	123,6	156,5 B	187,3 A	218,6 B	244,9 B
CAS	S	57,3	90,9	128,2	166,4 A	200,8 A	241,6 A	276,9 A
ISL	S	57,6	90,7	122,4	153,4 B	178,4 C	211,8 C	244,6 C
HSL	S	56,2	88,9	125,8	158,0 B	189,0 B	225,0 B	260,9 B

O crescimento dos animais na fase de adaptação (duas primeiras semanas) não apresentou diferenças significativas independentemente das fontes protéicas subministradas (CAS, ISL e HSL). Na fase de treinamento (a partir da terceira semana até o final do experimento) foram observadas diferenças significativas no crescimento dos animais em função da dieta nos grupos de treinamento (Tabela 9).

O crescimento dos animais alimentados com a dieta padrão (CAS) apresentou ganhos de peso maiores e diferentes estatisticamente em relação às outras duas dietas (ISL e HSL). No caso da dieta ISL esta diferença foi observada em todos os grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S), a partir da 3ª semana até o final do experimento. Em relação à dieta HSL a diferença estatística foi observada nos grupos TEX, T e S na 5ª e 6ª semana (Tabela 9).

Comparando o crescimento dos ratos alimentados com ISL em relação aos que receberam a dieta HSL observou-se os animais que consumiram a dieta ISL apresentaram crescimentos significativamente menores em relação aos que ingeriram dieta HSL nos

grupos TEX, T e S (5^o semana) e nos grupos TEX, S na 6^o semana do ensaio biológico. Este dado é interessante devido a que não houve diferenças estatísticas no consumo da dieta entre estas duas fontes protéicas como foi descrito anteriormente na Figura 18.

➤ 5.5.3. Ganho médio de peso dos animais

Esta medição foi obtida pesando aos animais na chegada ao LEB, após 7 dias da chegada e, a partir da terceira semana, os ratos foram pesados três vezes por semana durante todo o ensaio biológico (35 dias).

Na Figura 19 estão apresentados os dados de ganho médio de peso dos animais por dieta experimental e por grupo de treinamento.

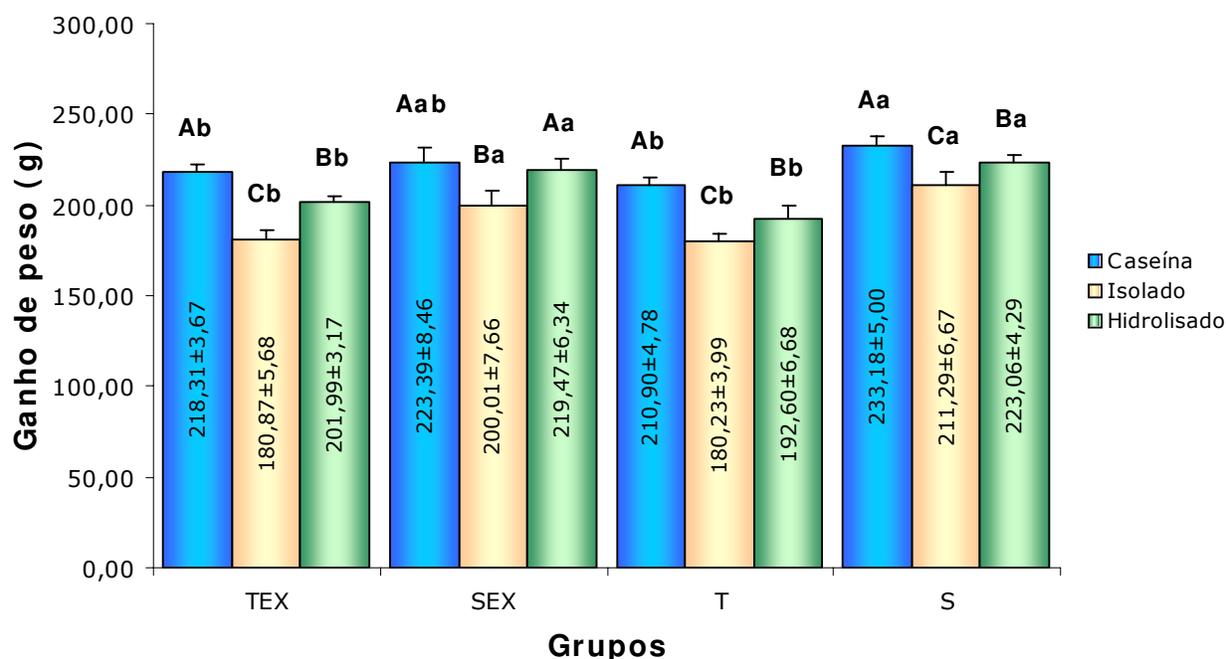


Figura 19. Ganho médio de peso dos animais (g) ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias. Letras maiúsculas representam a diferença estatística ou não entre as três dietas estudadas [caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL)] no mesmo grupo de treinamento. Letras minúsculas indicam ou não a diferença estatística da mesma dieta (CAS ou ISL ou HSL) nos diferentes grupos de atividade física [treinados exaustos (TEX), sedentários exaustos (SEX), treinado (T), sedentário (S)]. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957)

Comparando o ganho médio de peso dos animais que receberam a dieta padrão (CAS) em relação ao ganho de peso nas outras duas dietas (ISL e HSL) em cada grupo de treinamento (TEX, SEX, T e S), observou-se que os animais alimentados com a dieta padrão (CAS) tiveram um ganho de peso estatisticamente maior que os alimentados com as dietas com ISL e HSL em todos os grupos de treinamento exceto no grupo SEX, onde não houve diferenças com os animais alimentados com a dieta HSL.

Em relação ao ganho de peso dos animais alimentados com CAS nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S), verificou-se que o grupo S foi estatisticamente maior que os grupos TEX e T. Estes dois grupos realizaram atividade física contínua, o que indica que indivíduos que não praticam nenhuma atividade física, podem ganhar mais peso e conseqüentemente ter problemas à saúde (MATSUDO et al., 2002; CAMÕES; LOPES, 2008).

Os animais alimentados com CAS apresentaram também os maiores valores de ganho de peso entre as três dietas. Isto foi observado a partir da terceira semana do experimento, como foi mostrado na Tabela 9.

Comparando o ganho de peso dos animais que foram alimentados com a dieta com ISL respeito às outras duas dietas (CAS e HSL) em cada grupo de treinamento (TEX, SEX, T e S), observaram-se diferenças significativas em todos os grupos de treinamento. Independentemente destas diferenças estatísticas, verificou-se que em todos os grupos o ganho de peso dos animais que receberam a dieta ISL foi o menor entre as três dietas estudadas.

Em relação ao ganho de peso dos animais que consumiram a dieta com ISL nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), observou-se que os grupos SEX e S apresentaram valores significativamente maiores em relação aos grupos TEX e T. Isto corrobora o fato de que os indivíduos que realizam alguma atividade física contínua apresentam um menor ganho de peso (MATSUDO et al., 2002; CAMÕES; LOPES, 2008).

Com respeito ao ganho de peso dos ratos que consumiram HSL nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S), observou-se o mesmo comportamento que foi descrito no caso da dieta ISL.

A média dos ganhos de peso dos 4 grupos de treinamento dos ratos alimentados com CAS foi 221.4 g, seguida pela média dos animais que consumiram HSL (209,3 g) e por último a média dos que receberam ISL (193,1 g). Este dado é interessante visto que os consumos médios de dieta (Figura 18) dos animais que consumiram ISL e HSL não apresentaram diferenças significativas entre si. Porém, o ganho de peso foi significativamente menor para os animais que ingeriram ISL em todos os grupos de treinamento (Figura 19). Isto poderia ser devido ao diferente metabolismo das fontes protéicas estudadas o que levaria a graus diferentes de aproveitamento pelos animais. É sabido que a composição de aminoácidos (aa) das proteínas do soro de leite difere da caseína em aspectos que afetam processos metabólicos e fisiológicos. As proteínas do soro de leite são conhecidas pelo alto teor de aa essenciais, principalmente os de cadeia ramificada (BCAA). Apresentam em média 25% mais BCAA que a caseína comercial, além de apresentar teores mais elevados dos aa treonina, aa sulfurados (metionina+cisteína), lisina e triptofano, apresentando, no entanto teores mais baixos de aa de cadeia aromáticas (fenilalanina+tirosina) (BORGES et al., 2001). A oxidação dos aa de conhecido potencial gliconeogênico, assim como os de cadeia ramificada, pode afetar o processo de regulação da homeostase glicêmica (LAYMAN, 2003).

Além das diferenças na composição de aminoácidos e velocidade de absorção dessas proteínas, as proteínas do soro de leite são fontes de peptídeos com propriedades bioativas o que as diferem das caseínas. A presença dos principais peptídeos, assim como das subfrações, confere às proteínas do soro diferentes propriedades fisiológicas-funcionais (SGARBIERI, 2004; HA; ZEMEL, 2002).

➤ **5.5.4. Indicador tipo “PER” (Razão de Eficiência Protéica= proteína ingerida/ ganho de peso)**

Respeito à razão de eficiência protéica (PER), foi realizado um “tipo PER” devido ao fato dos animais ficarem em gaiolas conjuntas. Este cálculo foi somente para comparar a eficiência das proteínas utilizadas no experimento.

A Razão proteína ingerida/ganho de peso (PER) é usada para avaliar a qualidade nutritiva das proteínas e reflete às necessidades de aminoácidos de ratos jovens em crescimento. Este método utiliza o consumo de dieta e o ganho de peso individual. O Quociente de Eficiência Protéica avaliado neste trabalho é chamado tipo PER, não pode ser considerado realmente como um PER tradicional já que foram utilizadas as médias do consumo das dietas, uma vez que os animais foram mantidos em gaiolas coletivas. Numa avaliação tradicional do PER os animais devem estar em gaiolas individuais durante 28 dias.

Alguns fatores podem influenciar os valores do PER. Dentre eles pode-se citar a concentração lipídica, concentração protéica da dieta, idade, linhagem e manuseio dos animais. Os valores de PER diminuem à medida que se aumenta a concentração de proteína da dieta muito acima de 15%. Segundo Sgarbieri (1996), a concentração ideal de proteína para análise do índice de PER está no intervalo de 10% a 12% para a proteína de alto valor nutritivo.

Na Figura 20 está apresentado o quociente ou razão de eficiência protéica (PER) dos animais por dieta experimental e por grupo de treinamento.

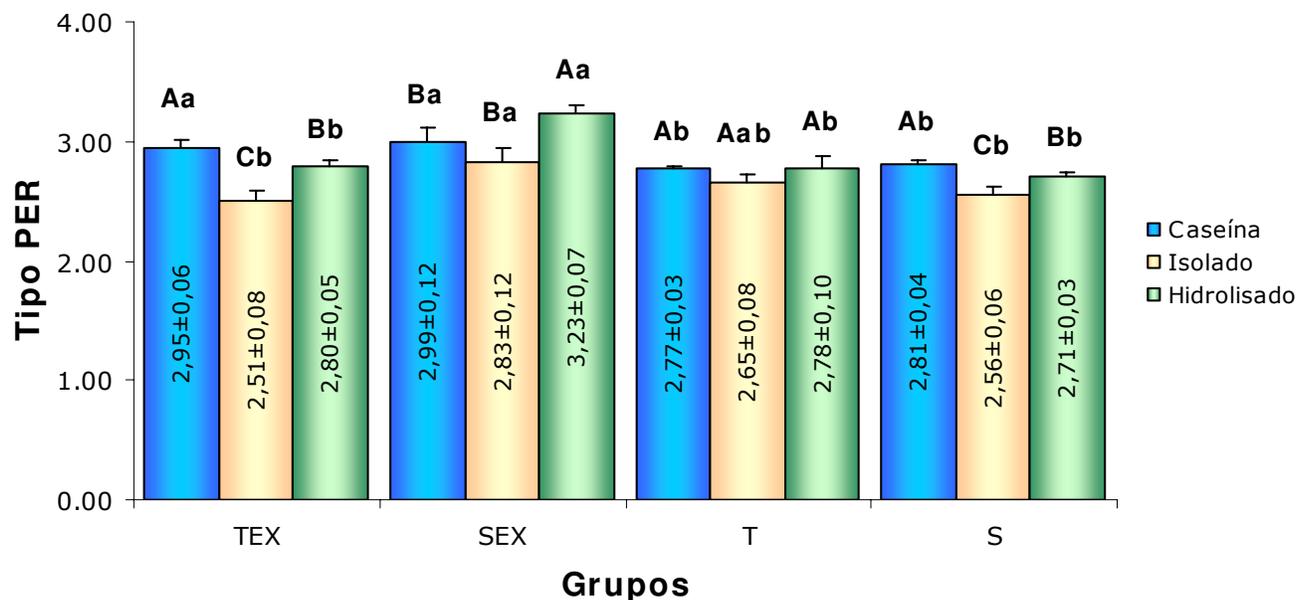


Figura 20. Razão de Eficiência Protéica (Tipo PER) \pm erro padrão da média (EPM) durante 35 dias. Letras maiúsculas representam a diferença estatística ou não entre as três dietas estudadas [caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL)] no mesmo grupo de treinamento. Letras minúsculas indicam ou não a diferença estatística da mesma dieta (CAS ou ISL ou HSL) nos diferentes grupos de atividade física [treinados exaustos (TEX), sedentários exaustos (SEX), treinado (T), sedentário (S)]. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957)

Quando comparados o quociente de eficiência protéica (tipo PER) dos ratos alimentados com a dieta padrão (CAS) em relação com as outras duas fontes protéicas (ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento foram observados valores do "tipo PER" estatisticamente maiores nos animais alimentados com a dieta CAS nos grupos TEX e S. Porém, no grupo SEX, só houve diferenças estatísticas em relação aos animais alimentados com HSL, e no caso do grupo T não houve diferenças significativas entre as três dietas.

Em relação ao quociente de eficiência protéica (tipo PER) dos ratos alimentados com a dieta com CAS nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), foram

observados valores estatisticamente maiores nos grupos que foram levados à exaustão (TEX e SEX) em comparação aos que não passaram por ela (T e S).

Comparando o “tipo PER” da dieta ISL com a dieta HSL em cada grupo de treinamento (TEX, SEX, T e S), foi observado que só no grupo T não houve diferenças significativas.

Respeito ao “tipo PER” dos ratos que consumiram a dieta ISL nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S) observou-se diferença significativa entre os grupos TEX e SEX e também entre os grupos SEX e S.

No coeficiente de razão protéica (tipo PER) dos animais que receberam a dieta com HSL nos diferentes grupos de treinamento, verificou-se que o grupo SEX foi diferente estatisticamente dos outros grupos (TEX, T e S) sendo que estes não apresentaram diferenças entre si.

Proteínas com valor de PER acima de 2,0 são consideradas de alto valor nutritivo (FRIEDMAN, 1996). Seguindo este critério, as fontes protéicas utilizadas neste trabalho (caseína e proteínas do soro de leite), podem ser classificadas como proteínas de excelente qualidade nutricional (Figura 20).

5.7. Tempo médio de exaustão dos grupos TEX e SEX

Após 4 semanas de treinamento, os ratos designados como grupo TEX e SEX foram submetidos ao teste de exaustão (o qual foi aplicado no dia seguinte de ter completado as 4 semanas de treinamento físico), correndo inicialmente a 25m/min até chegar a 32,5m/min (Tabela 6). Nessa velocidade os animais se mantiveram correndo até ficar exaustos, considerando a exaustão, o momento em que o animal não conseguia sair do choque elétrico constante. Os tempos até atingir a exaustão foram devidamente registrados e comparados entre as diferentes fontes protéicas (CAS, ISL e HSL) em cada grupo de treinamento por separado. Os tempos de exaustão dos grupos TEX e SEX são apresentados

nas Figuras 21 e 22, respectivamente. Na Figura 23 os tempos de exaustão de ambos os grupos foram comparados para observar o efeito do treinamento.

➤ 5.7.1. Grupo TEX

Na Figura 21 estão apresentados os tempos médios de exaustão (min.) do grupo TEX por dieta experimental e por grupo de treinamento.

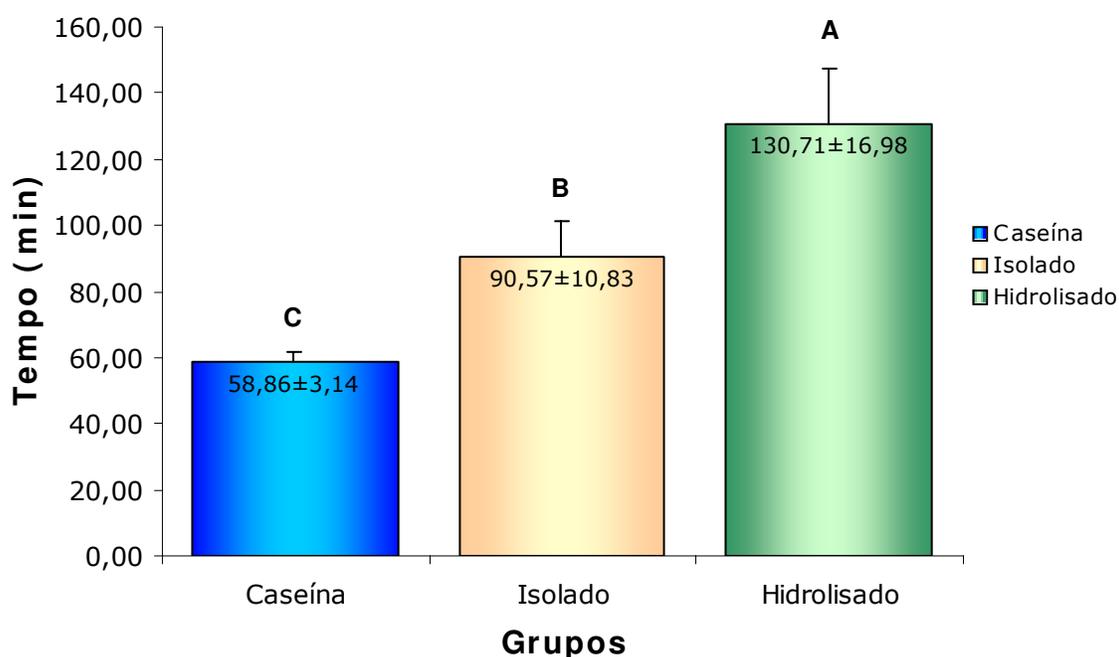


Figura 21. Tempo médio de exaustão (min.) dos animais do grupo treinado exausto (TEX) \pm erro padrão da média (EPM) nas três dietas utilizadas, caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL), durante 35 dias. Grupos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957)

Na Figura 21 pode-se observar que os tempos da exaustão foram diferentes estatisticamente para as três dietas (CAS, ISL e HSL), sendo que os animais alimentados com HSL apresentaram a maior média (130,71 \pm 16,98 min), seguidos dos animais que consumiram ISL (90,57 \pm 10,83min) e por último, os ratos que receberam caseína (58,86 \pm 3,14min).

Os animais que receberam a dieta com HSL correram para atingir a exaustão 55% (72min) e 31% (40min) a mais dos que receberam as dietas com CAS e ISL, respectivamente, mostrando assim que as proteínas do soro de leite e, particularmente os hidrolisados com grau de hidrólise médio (10%), proporcionaram melhor desempenho físico em comparação com a proteína padrão caseína (Figura 21). Resultados similares foram encontrados num estudo realizado por PIMENTA et al (2006) utilizando isolado de soro de leite e hidrolisado de soro de leite com grau de hidrólise 7,8%. Os autores observaram que os animais que consumiram a proteína hidrolisada correram 60% (96min) a mais do que os que receberam a dieta com isolado.

O fato de que as proteínas do soro de leite proporcionem um melhor desempenho físico em comparação com a proteína padrão caseína pode estar relacionado ao fato de que estas proteínas contêm porcentagens elevadas dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) principalmente em leucina, podendo favorecer o anabolismo muscular. HA; Zamel. (2003), destacaram que o perfil de aa das proteínas do soro é muito similar ao das proteínas do músculo esquelético, fornecendo quase todos os aminoácidos em proporção similar às do mesmo.

As proteínas do soro também se caracterizam por serem proteínas de rápida digestão e absorção (BORIE et al., 1997), enquanto que as caseínas contêm uma grande quantidade de α -caseína, fração que não é facilmente digerida. Essa rápida absorção faz com que as concentrações plasmáticas de muitos aminoácidos, inclusive a leucina, atinjam altos valores logo após a sua ingestão (DANGIN et al., 2001). Se essa ingestão fosse realizada após uma sessão de exercícios, as proteínas do soro seriam mais eficientes no desencadeamento do processo de síntese protéica. Além de aumentar as concentrações plasmáticas de aminoácidos, aumenta, significativamente, a concentração de insulina plasmática, o que favorece a captação de aminoácidos para o interior da célula muscular, otimizando a síntese

e reduzindo o catabolismo protéico (ZAWADZKI et al., 1992; ANTHONY et al., 2001; CALBET; MacCLEAN, 2002).

O aumento rápido na concentração de aminoácidos é acompanhado também por um aumento de sua oxidação, enquanto que, a caseína promove uma deposição protéica por inibição do catabolismo protéico, sem aumento pronunciado na concentração plasmática e oxidação de aminoácidos. Estas evidências mostram que as proteínas do soro de leite podem ser muito adequadas em situações de estresse metabólico em que a reposição de proteínas no organismo se torna emergencial (DANGIN et al., 2001; SGARBIERI, 2004).

➤ 5.7.2. Grupo SEX

Na Figura 22 estão apresentados os tempos médios de exaustão (min.) do grupo SEX por dieta experimental e por grupo de treinamento.

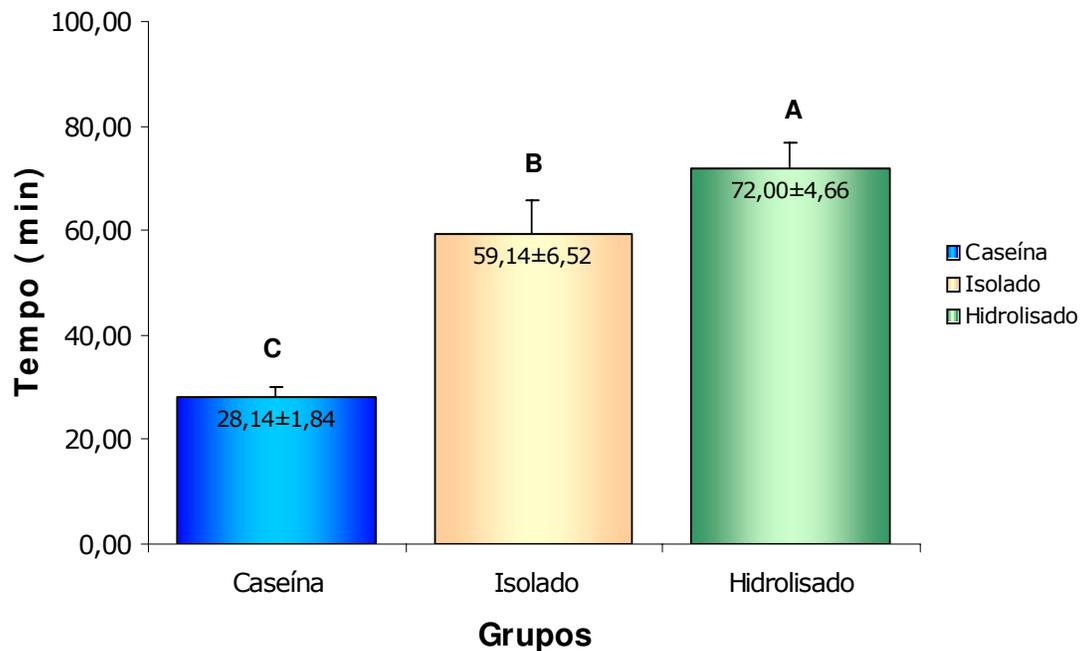


Figura 22. Tempo médio de exaustão (min.) dos animais do grupo sedentário exaustado (SEX) \pm erro padrão da média (EPM) nas três dietas utilizadas, caseína, caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL), durante 35 dias. Grupos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957)

Na Figura 22 observa-se que os tempos da exaustão foram diferentes estatisticamente para as três dietas (CAS, ISL e HSL), sendo que os animais alimentados com HSL apresentaram a maior média ($72,00 \pm 4,66$ min), seguidos dos animais que consumiram ISL ($59,14 \pm 6,52$ min) e por último, os ratos que receberam caseína ($28,14 \pm 1,84$ min).

Os animais que receberam a dieta com HSL correram para atingir a exaustão 60% (44min.) e 18% (13min.) a mais dos que receberam as dietas com CAS e ISL, respectivamente. Da mesma maneira pode-se verificar que o tempo de exaustão dos ratos que receberam o ISL foi 52% (31min.) maior que o dos animais que consumiram a dieta CAS (Figura 22). Os resultados sugerem que as proteínas de soro de leite (principalmente a proteína hidrolisada) proporcionariam maior resistência à exaustão, melhorando o desempenho físico inclusive em animais que não realizam atividade física de maneira contínua e que são levados à exaustão.

➤ 5.7.3. Grupo TEX vs grupo SEX

Na Figura 23 estão representadas as comparações do tempo de exaustão (min.) entre os grupos TEX e SEX por dieta experimental e por grupo de treinamento.

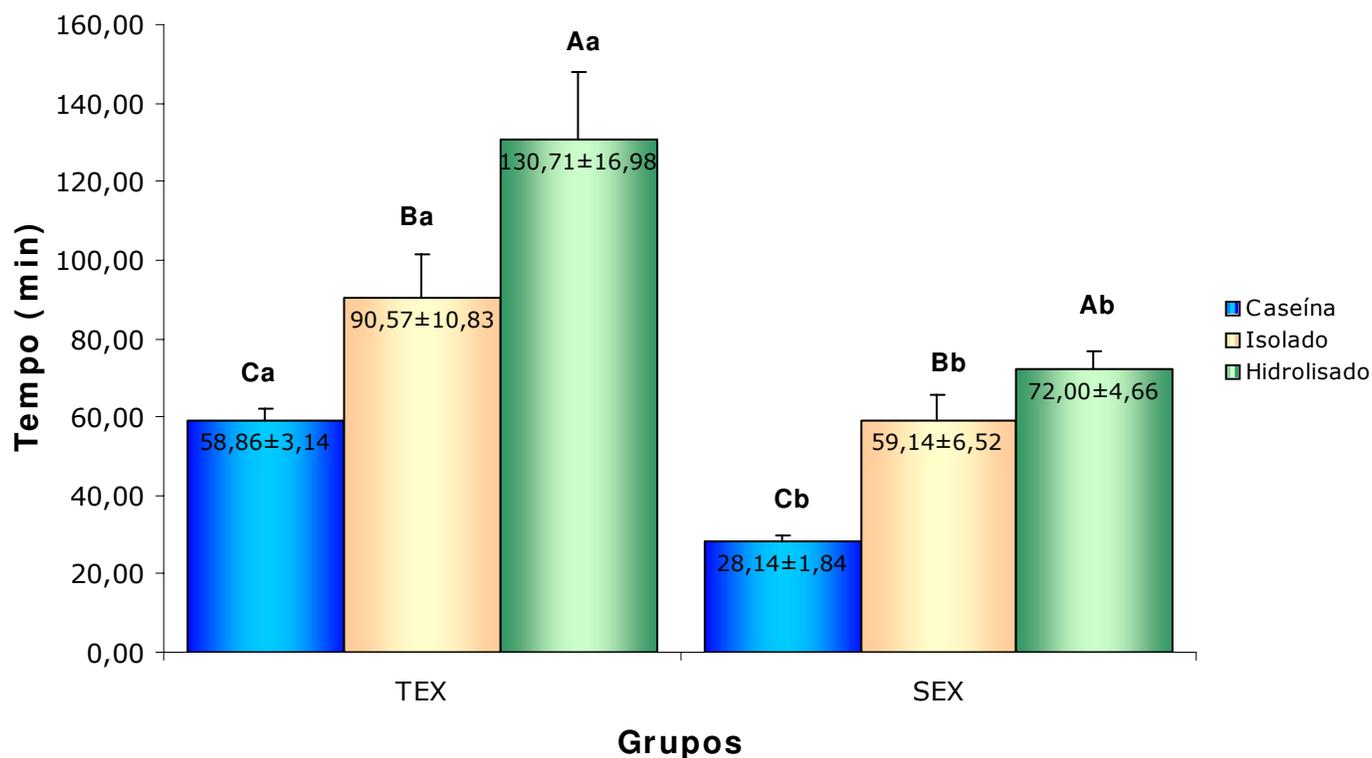


Figura 23. Tempo médio de exaustão (min.) dos grupos treinado exausto (TEX) e sedentário exausto (SEX) ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias. Letras maiúsculas referem-se às comparações entre as dietas: caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL) no mesmo grupo de treinamento. Letras minúsculas comparam a mesma dieta nos grupos TEX e SEX. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957)

Quando comparados os grupos TEX e SEX notou-se que o tempo da chegada à exaustão dos animais do grupo TEX foi significativamente superior em relação aos animais do grupo SEX para as três dietas experimentais.

Os animais do grupo TEX que consumiram a dieta padrão CAS tiveram um tempo de exaustão de 52% (31min) a mais do que os animais do grupo SEX alimentados com a

mesma fonte protéica. No caso dos ratos do grupo TEX que receberam as dietas ISL e HSL em comparação com os animais do grupo SEX que receberam as mesmas dietas, os valores correspondentes foram de 38% (31min) e 50% (59min), respectivamente.

Tanto no grupo TEX (treinados 6 vezes por semana) como no grupo SEX (com atividade física apenas duas vezes por semana e a velocidade constante de 10m/min durante 5 minutos), os ratos alimentados com as proteínas do soro de leite (HSL e ISL) e submetidos ao treinamento físico tiveram maior tempo de corrida até atingirem a exaustão em comparação com os que ingeriram CAS. Sugerindo que a ingestão das proteínas do soro de leite (HSL e ISL) proporcionariam maior resistência à exaustão melhorando o desempenho tanto nos animais ativos como sedentários, em relação aos ratos que foram alimentados com a dieta padrão (CAS), Este desempenho físico pode ser devido à composição de aminoácidos (aa) do soro de leite que diferem da caseína em aspectos que afetam processos metabólicos e fisiológicos. As proteínas do soro de leite são bem conhecidas pelo alto teor de aa essenciais, principalmente os de cadeia ramificada (BCAA), que participam da gliconeogênese, podendo regular a homeostase glicêmica. Os BCAAs estão presentes em média 25% a mais nas proteínas do soro de leite do que na caseína comercial (LAYMAN, 2003).

Estes aminoácidos são desaminados no tecido muscular formando a alanina, a qual deixara e será encaminhada para o fígado, onde será convertida em piruvato e, posteriormente, em glicose (ciclo glicose-alanina) contribuindo para a manutenção da glicemia durante exercícios prolongados. Os BCAA atuam no ciclo da alanina-glicose servindo de substratos para a produção de glicose (LANCHA JUNIOR, 1996, MARQUEZI; LANCHA JURNOR, 1997)

Os BCAA, particularmente a leucina, também podem servir como importantes doadores de nitrogênio no cérebro (HOOD; TERJUNG, 1990), por meio dos grupos amina, com a finalidade de síntese de glutamato. A leucina, não sendo uma substância neuroativa,

pode seguramente transitar pelo cérebro e ser usada como uma fonte de NH_2 com o propósito de sintetizar o glutamato. Sendo um aminoácido importante no metabolismo humano, o glutamato é o produto da transaminação do α -cetoglutarato, participando na produção de metabólitos como o piruvato ou o oxaloacetato, que participam em vias metabólicas como a gluconeogênese e na glicólise (YUDKOFF ET AL., 2005).

As proteínas do soro de leite também apresentam teores elevados de outros aa como a treonina, aa sulfurados (metionina e cisteína), lisina e triptofano, entre outros (BORGES et al., 2001). Estas proteínas contêm várias sequências de aminoácidos com propriedades bioativas, chamados de peptídeos bioativos com propriedades capazes de modular respostas fisiológicas relevantes no organismo do animal (HA; ZEMEL, 2003; SGARBIERI, 2004;).

Amaya-Farfan et al. (1997), observaram que o tempo de chegada à exaustão foi 3 vezes superior em ratos treinados em relação a ratos sedentários. O tipo de treinamento que os autores usaram foi natação, uma hora diária, 5 vezes por semana, durante 5 semanas. Foram utilizadas três fontes protéicas (α -lactoalbumina, α -lactoalbumina hidrolisada e caseína) em dietas formuladas segundo AIN-93 (REEVES et al., 1993). A α -lactoalbumina é uma das proteínas do soro de leite o que a relaciona com as fontes protéicas utilizadas neste trabalho.

No estudo realizado por Pimenta et al. (2006), ratos Wistar jovens receberam isolado de soro de leite e seu hidrolisado com grau de hidrólise 7,8% e foram submetidos a exercício físico em esteira. Os autores observaram que os ratos alimentados com a proteína hidrolisada tiveram um desempenho físico 2,6 vezes maior ao alcançado pelos ratos alimentados com a proteína isolada.

5.8. Lactato sanguíneo

Na Figura 24 estão apresentadas as concentrações de lactato sanguíneo (mmol/L) dos animais por dieta experimental e por grupo de treinamento. Este parâmetro foi medido na hora que os animais chegaram na exaustão para os grupos TEX e SEX, e para os grupos T e S foi medido antes da morte dos mesmo.

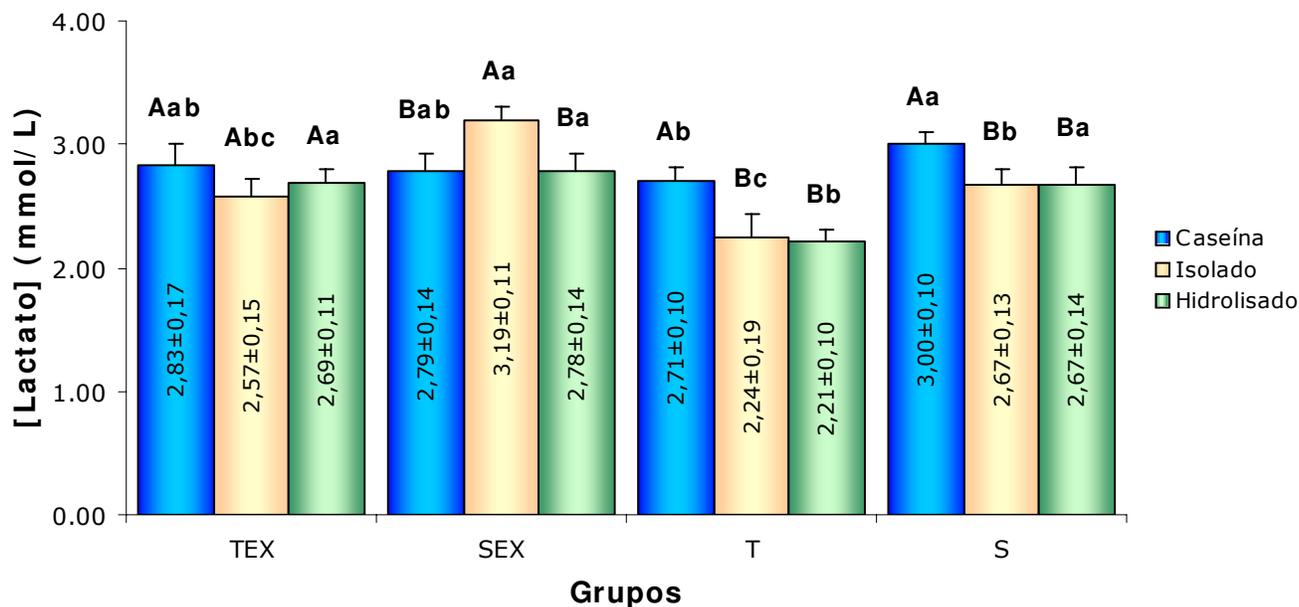


Figura 24 Concentração de lactato sanguíneo (mmol/L) \pm erro padrão da média (EPM) durante 35 dias. Letras maiúsculas representam a diferença estatística ou não entre as três dietas estudadas [caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL)] no mesmo grupo de treinamento. Letras minúsculas indicam ou não a diferença estatística da mesma dieta (CAS ou ISL ou HSL) nos diferentes grupos de atividade física [treinados exaustos (TEX), sedentários exaustos (SEX), treinado (T), sedentário (S)]. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957)

Comparando a concentração de lactato sanguíneo dos animais que receberam a dieta padrão (CAS) em relação com as outras duas fontes protéicas (ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento, observou-se que os animais alimentados com CAS tiveram um valor estatisticamente superior nos grupos T (18%) e S (11%). No grupo SEX os ratos alimentados com CAS apresentaram um valor estatisticamente inferior (12,5%) em

comparação com os animais que receberam a dieta ISL. No grupo TEX não foram observadas diferenças significativas.

Em relação à concentração de lactato sanguíneo dos animais alimentados com a dieta padrão (CAS) nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), observou-se que não houve diferenças significativas entre os grupos de treinamento TEX, SEX e S. Por outro lado, o grupo S foi estatisticamente superior ao grupo T.

Comparando a concentração de lactato sanguíneo dos animais que receberam a dieta ISL em relação às outras duas fontes protéicas (CAS e HSL) em cada grupo de treinamento, observou-se que não houve diferença significativa em relação aos que consumiram HSL exceto no grupo SEX, onde os animais que receberam a dieta com ISL apresentaram um valor estatisticamente superior (13%).

Considerando a concentração de lactato sanguíneo dos animais que foram alimentados com a dieta ISL nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), foi observado que o grupo SEX apresentou um valor significativamente maior em comparação aos outros grupos de treinamento (TEX (19,4%), T (30%) e S (16%)).

Avaliando a concentração de lactato dos animais que receberam a dieta com HSL nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S), verificou-se que o grupo T apresentou um valor significativamente menor (18%) em relação aos outros grupos (TEX, SEX e S).

De maneira geral, a concentração de lactato foi menor nos ratos alimentados com as proteínas de soro de leite (ISL e HSL) em relação aos alimentados com CAS nos diferentes grupos de treinamento, exceto no grupo SEX onde somente a concentração de lactato na dieta HSL foi menor que na dieta CAS.

Também se observou que os grupos levados à exaustão (TEX e SEX) não apresentaram diferença significativa na concentração de lactato sanguíneo entre os ratos alimentados com CAS e os que consumiram HSL. Este resultado chama a atenção devido ao

fato de que, como se observou na Figura 23, os animais alimentados com HSL tiveram tempos de exaustão estatisticamente maiores em relação aos que consumiram CAS em ambos os grupos (TEX e SEX).

Para os grupos T e S a concentração de lactato sanguíneo apresentou diferenças estatísticas entre os ratos alimentados com CAS e os que consumiram as proteínas de soro de leite (ISL e HSL) como observado na Figura 24, indicando que o consumo destas fontes protéicas pode diminuir as concentrações de lactato no sangue.

Independentemente da fonte protéica e a atividade física realizada pelos animais, os valores encontrados para a concentração de lactato sanguíneo estiveram entre os valores normais de indivíduos em repouso e que não praticam atividade física (2,21 a 3,19 mmol/L). Estes valores foram relativamente baixos em relação aos encontrados na literatura que, dependendo da atividade física realizada, já foram reportados valores entre 4 e 16 mmol/L (AMAYA-FARFAN et al., 1997; TASSI et al., 1998; PIMENTA et al., 2006; CONTARTEZE et al., 2007).

5.9. Glicogênio hepático e muscular

Após a determinação da curva padrão de glicogênio (mg/mL) (Figura 15), foram analisadas as amostras de fígado (Figura 25) e músculo (gastrocnêmio (Figura 26) e sóleo (Figura 27)) pelo método descrito no ANEXO 8.(Lo et al., 1970).

➤ 5.9.1. Concentração de glicogênio no tecido hepático

Na Figura 25 estão apresentadas as concentrações de glicogênio hepático (GHep) dos animais por dieta experimental e por grupo de treinamento. O fígado foi coletado logo após da morte dos animais (24 horas após a última sessão de atividade física).

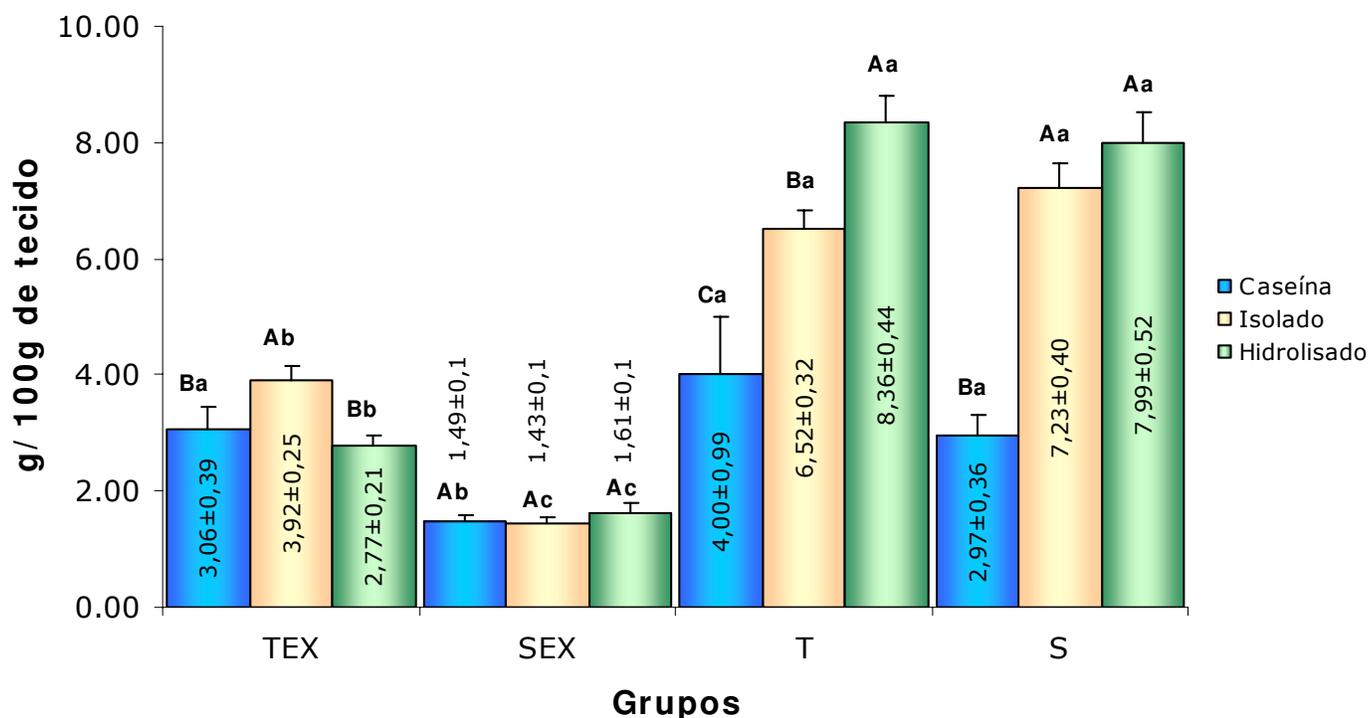


Figura 25. Concentração média de glicogênio hepático (GHep) dos animais (g/100g de tecido) ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias. Letras maiúsculas representam a diferença estatística ou não entre as três dietas estudadas [caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL)] no mesmo grupo de treinamento. Letras minúsculas indicam ou não a diferença estatística da mesma dieta (CAS ou ISL ou HSL) nos diferentes grupos de atividade física [treinados exaustos (TEX), sedentários exaustos (SEX), treinado (T), sedentário (S)]. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957)

A concentração de glicogênio hepático (GHep) dos animais alimentados com a dieta padrão (CAS) em relação às outras fontes proteicas (ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento apresentou diferenças estatísticas nos grupos T e S, sendo que os animais que

consumiram a dieta CAS apresentou valores menores. Nos grupos TEX e SEX não foram observadas diferença significativa entre as três dietas.

Em relação à concentração média de GHep dos animais alimentados com a dieta CAS nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), foram observadas diferenças significativas entre o grupo SEX e os outros grupos de treinamento (TEX, T e S), sendo estatisticamente menor a concentração de GHep do grupo SEX. Os grupos TEX, T e S não apresentaram diferenças significativas entre si.

A concentração de glicogênio hepático dos animais alimentados com a dieta ISL em relação aos que receberam a dieta HSL em cada grupo de treinamento apresentou diferenças significativas no grupo T, sendo os ratos que consumiram a dieta com ISL tiveram a concentração de GHep menor. No grupo S só foi observada diferença estatística na concentração de GHep da dieta ISL quando comparada com a dieta CAS, e nos grupos TEX e SEX, não houve diferenças entre as três dietas estudadas.

Com respeito à concentração de GHep dos ratos que receberam a dieta ISL nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S) foi observado que os grupos levados à exaustão (TEX e SEX) apresentaram diferenças significativas entre si e foram também estatisticamente diferentes dos grupos T e S. Nestes grupos (T e S) a concentração de glicogênio hepático foi em média 2,43 vezes maior que no grupo TEX e; 4,80 vezes maior que no grupo SEX.

Em relação à concentração de GHep dos animais que consumiram a dieta HSL nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S), observou-se que não houve diferenças significativas entre os grupos T e S. Estes dois últimos grupos tiveram as maiores concentrações de glicogênio hepático, apresentando valores em média 2,96 vezes maior que o grupo TEX e 5,01 vezes maior que o grupo SEX.

De modo geral verificou-se que os animais do grupo SEX apresentaram as menores concentrações de GHep em relação aos outros grupos de treinamento, também se observou que não houve diferenças estatísticas entre as três dietas (CAS, ISL e HSL) utilizadas.

Outro resultado observado foi que os animais que não foram levados à exaustão (grupos T e S) e receberam as dietas a base de proteínas do soro de leite (ISL e HSL) apresentaram maiores concentrações de glicogênio hepático em comparação com a dieta padrão (CAS).

No grupo T, os animais que consumiram HSL apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação aos alimentados com CAS e ISL. Estes animais tiveram também as maiores concentrações de GHep em relação aos outros grupos de treinamentos (Figura 25), indicando que o consumo da dieta com HSL (grau de hidrólise utilizado neste trabalho de 10%) foi favorável para o aumento da concentração de GHep, ajudando a manter e aumentar as reservas de glicogênio no fígado em comparação com a proteína padrão (CAS). Dados similares foram encontrados por Morifuji et al. (2005), eles observaram que ratos alimentados com proteínas do soro de leite aumentaram a concentração de glicogênio hepático e muscular tanto, em ratos sedentários como treinados em comparação aos que receberam caseína.

A concentração de GHep nos animais que receberam as dietas com ISL e HSL no grupo S foi significativamente superior ($\sim 2x$) em relação aos que foram alimentados com a dieta com CAS confirmando o observado por Morifuji et al. (2005).

Também foi observado que os grupos levados à exaustão TEX e SEX não apresentaram diferenças significativas entre as três dietas (CAS, ISL e HSL) utilizadas, este resultado sugere que as proteínas de soro de leite (em especial o hidrolisado) são proteínas capazes de preservar os níveis de glicogênio hepático tanto em ratos treinados como sedentários, como foi observado no teste de exaustão (Figura 23) onde os animais que

consumira as dietas ISL e HSL correram em média 47% a mais (no grupo TEX) e de 57% (no grupo SEX) em comparação aos que receberam a dieta CAS.

Abecia-Soria (2003) realizou um estudo com ratos Wistar jovens que receberam isolado de soro de leite e seu hidrolisado com grau de hidrólise 7,8% e foram submetidos a exercício físico em esteira. Nesse trabalho a dieta com HSL proporcionou maiores concentrações de glicogênio hepático em relação à dieta com ISL, já no presente trabalho, este resultado somente foi observado nos grupos T e S.

➤ **5.9.2. Concentração de glicogênio no tecido muscular**

Durante o exercício de intensidade moderada e intensa, o principal substrato energético envolvido é o carboidrato, estocado sob a forma de glicogênio no músculo. O glicogênio muscular é limitado e rapidamente depletado no exercício, sendo que sua depleção em níveis críticos está associada à fadiga durante exercício de resistência como largada (CONLEE, 1987; AFONSO et al., 2003; MORIFUJI et al, 2005).

As concentrações médias de glicogênio muscular (gastrocnêmio e sóleo) estão apresentadas nas Figuras 26 e 27, respectivamente. Os músculos foram coletados logo após da morte dos animais (24 horas após a última sessão de atividade física).

5.9.2.1 Glicogênio muscular no gastrocnêmio (GMG)

Na Figura 26 estão apresentadas as concentrações de glicogênio muscular no gastrocnêmio (GMG) dos animais por dieta experimental e por grupo de treinamento.

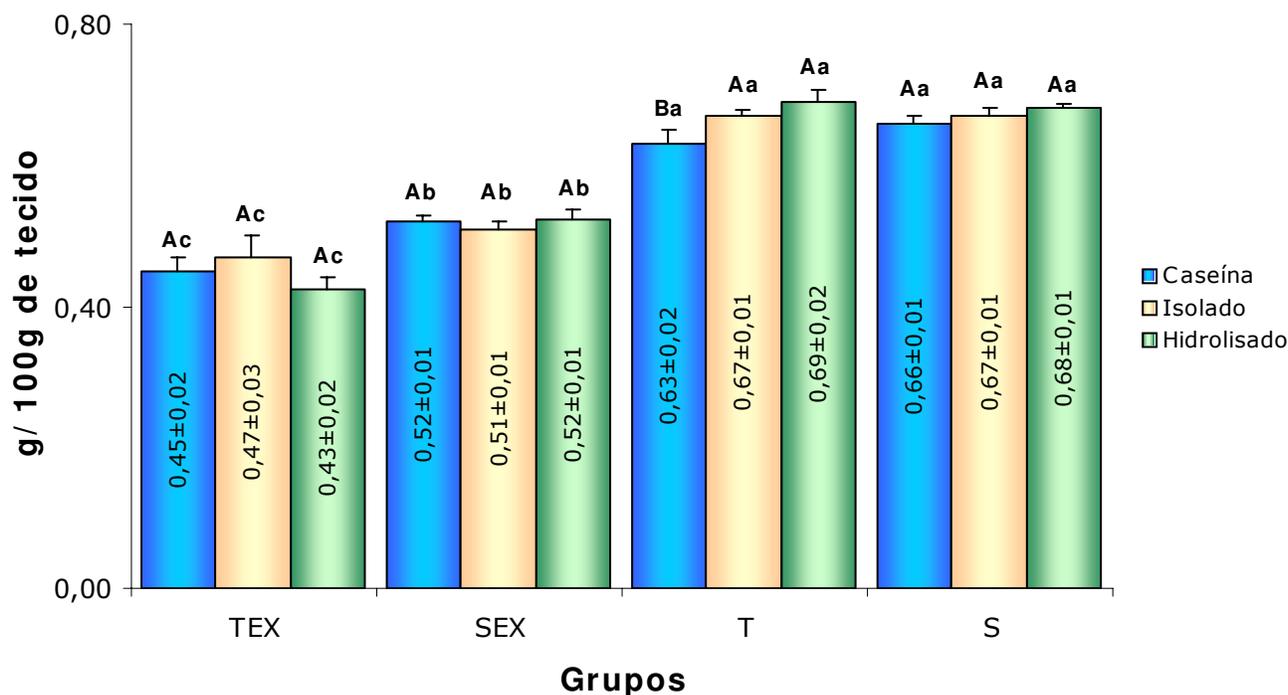


Figura 26. Concentração média de glicogênio muscular (Gastrocnêmio) (GMG) dos animais (g/100g de tecido) ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias. Letras maiúsculas representam a diferença estatística ou não entre as três dietas estudadas [caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL)] no mesmo grupo de treinamento. Letras minúsculas indicam ou não a diferença estatística da mesma dieta (CAS ou ISL ou HSL) nos diferentes grupos de atividade física [treinados exaustos (TEX), sedentários exaustos (SEX), treinado (T), sedentário (S)]. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957)

Comparando a concentração de glicogênio muscular no gastrocnêmio (GMG) dos animais que receberam a dieta padrão (CAS) em relação com as outras duas fontes protéicas (ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento, observou-se que não houve diferenças significativas nos diferentes grupos exceto no grupo T onde os animais que receberam a dieta padrão (CAS) apresentaram o valor menor.

Em relação à concentração de GMG dos animais alimentados com a dieta padrão (CAS) nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), verificou-se que os grupos levados à exaustão (TEX e SEX) apresentaram diferença estatística entre si sendo que o grupo TEX apresentou o menor valor. Estes dois grupos (TEX e SEX) apresentaram valores estatisticamente menores que os grupos que não passaram pela exaustão (T e S), sendo que não foi observada diferença significativa entre T e S.

Comparando a concentração de GMG dos animais que receberam a dieta ISL em relação aos que receberam a dieta com HSL no mesmo grupo de treinamento, observou-se que não houve diferenças significativas nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S).

A concentração de GMG dos animais alimentados com a dieta ISL e HSL nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), verificou-se que os grupos levados à exaustão (TEX e SEX) apresentaram diferença estatística entre si e com os grupos que não passaram pela exaustão (T e S). As diferenças encontradas foram iguais às descritas no caso de dieta CAS, sendo que não foi observada diferenças significativas entre os grupo T e S.

De modo geral, se pode dizer que os grupos levados à exaustão (TEX e SEX), ou seja, animais que foram submetidos a atividade física intensa, apresentaram um consumo maior das reservas de glicogênio muscular no gastrocnêmio (GMG) em relação aos grupos que não passaram pela exaustão (T e S). A concentração média de GMG entre as três dietas no grupo T foi 1,47 vezes maior que no grupo TEX, enquanto esta concentração no grupo S foi 1,29 vezes maior que no grupo SEX. Isto confirma que as reservas de glicogênio muscular diminuem progressivamente com exercícios prolongados (ROMIJN et al., 1993).

Também foi observado que não houve diferenças estatísticas na concentração de GMG entre as três dietas estudadas nos grupos levados à exaustão (TEX e SEX). Porém, os

animais alimentados com ISL e HSL correram por muito tempo até atingir a exaustão em relação aos que consumiram CAS ($p < 0,05$) em ambos os grupos (TEX e SEX) (Figura 23).

Resultados similares foram encontrados Ramos (2001). O autor realizou um estudo com ratos submetidos à atividade física (natação) e alimentados com hidrolisado de soro de leite de alto grau de hidrólise (30%) comparada com seu concentrado e a caseína o autor não encontrou diferenças significativas na concentração de glicogênio hepático nas três dietas estudadas, contudo a dieta com hidrolisado apresentou uma concentração menor.

Por outro lado Morifuji et al. (2005) estudaram o efeito do consumo das proteínas do soro de leite e a caseína na concentração de glicogênio hepático e muscular em ratos treinados (natação, 120min/dia, 6 dias/semana durante 2 semanas) e sedentários. Os ratos foram mortos após 15 horas da última seção de treinamento e submetidos. Os autores observaram que os animais alimentados com soro de leite tiveram maiores concentrações de glicogênio hepático e muscular.

Mum estudo realizado com ratos Wistar jovens que receberam isolado de soro de leite e seu hidrolisado com grau de hidrólise 7,8% e submetidos a exercício físico em esteira e mortos 48 horas após a última seção de atividade física (exaustão), não foram observadas diferenças significativas no glicogênio muscular do gastrocnêmio entre as dietas ISL e HSL (ABECIA-SORIA, 2003). No presente trabalho também não foi observado diferenças significativas entre as dietas ISL e HSL nos diferentes grupos treinamento (TEX, SEX, T e S), neste trabalho os animais foram mortos 24 horas após a exaustão.

5.9.2.2 Glicogênio muscular no sóleo (GMS)

Na Figura 27 estão apresentadas as concentrações de glicogênio muscular no sóleo (GMS) dos animais por dieta experimental e por grupo de treinamento.

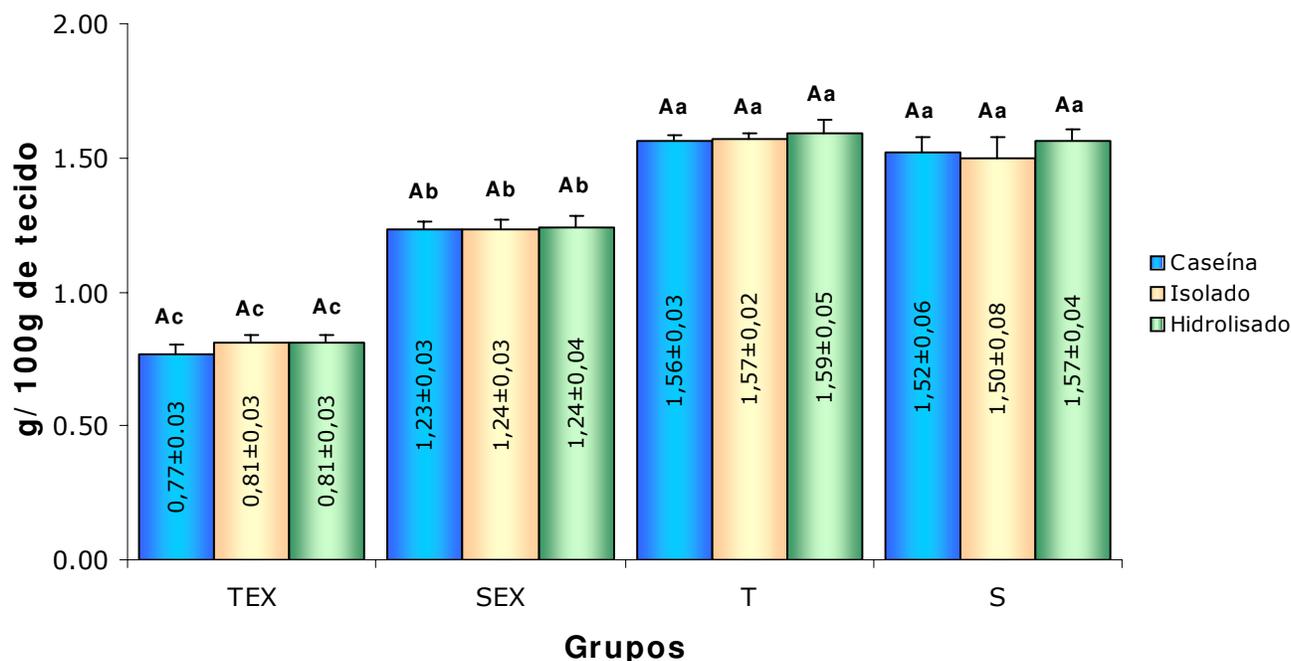


Figura 27. Concentração média de glicogênio muscular (Sóleo) (GMS) dos animais (g/100g de tecido) ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias. Letras maiúsculas representam a diferença estatística ou não entre as três dietas estudadas [caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL)] no mesmo grupo de treinamento. Letras minúsculas indicam ou não a diferença estatística da mesma dieta (CAS ou ISL ou HSL) nos diferentes grupos de atividade física [treinados exaustos (TEX), sedentários exaustos (SEX), treinado (T), sedentário (S)]. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957)

Comparando a concentração de GMS dos animais que receberam a dieta padrão (CAS) em relação com as outras duas fontes protéicas (ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento, observou-se que não houve diferenças significativas entre os diferentes grupos.

Em relação à concentração de GMS dos animais alimentados com a dieta padrão (CAS) nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), verificou-se que os grupos

levados à exaustão (TEX e SEX) apresentaram diferença significativas entre si sendo que o grupo TEX apresentou o menor valor. Estes dois grupos (TEX e SEX) apresentaram valores estatisticamente menores que os grupos que não passaram pela exaustão (T e S). Nos grupos T e S não foi observada diferença significativa entre si.

Comparando a concentração de GMS dos animais que receberam a dieta ISL em relação aos que receberam a dieta com HSL no mesmo grupo de treinamento, observou-se que não houve diferenças significativas nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S).

Em relação à concentração de GMS dos animais alimentados com a dieta ISL e HSL nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), verificou-se que os grupos levados à exaustão (TEX e SEX) apresentaram diferença estatística entre si e com os grupos que não passaram pela exaustão (T e S). As diferenças encontradas foram iguais às descritas no caso de dieta CAS. Nos grupos T e S não foi observada diferença significativa entre si.

De modo geral se pode dizer que os grupos levados à exaustão (TEX e SEX), ou seja, animais que foram submetidos a atividade física intensa, apresentaram um consumo maior das reservas de glicogênio muscular no sóleo (GMS) em relação aos grupos que não passaram pela exaustão (T e S). A concentração média de GMS entre as três dietas no grupo T foi 1,96 vezes maior que no grupo TEX, enquanto esta concentração no grupo S foi 1,23 vezes maior que no grupo SEX. Isto confirma que as reservas de glicogênio muscular diminuem progressivamente com exercícios prolongados (ROMIJN et al., 1993).

Também foi observado que não houve diferenças estatísticas na concentração de GMS entre as três dietas estudadas nos grupos levados à exaustão (TEX e SEX). Porém, os animais alimentados com ISL e HSL correram por mais tempo até atingir a exaustão ($p < 0,05$) em relação aos que consumiram CAS em ambos os grupos (TEX e SEX) (Figura 23). Este dado sugere que as proteínas do soro de leite conseguem manter os estoques de glicogênio muscular elevados por mais tempo. Isto pode ser devido à elevada concentração de

aminoácidos de cadeia ramificada que as proteínas do soro possuem. Estes aminoácidos são liberados pelo fígado durante a atividade motora (LANCHA JUNIOR, 2004). Com o esforço intenso, os aminoácidos de cadeia ramificada atingem, sobretudo, a musculatura exercitada, onde são consumidos e participam da conversão do piruvato em alanina, a qual é encaminhada do músculo para o fígado, para nova formação de piruvato e apoiar a gliconeogênese hepática. Com o esforço moderado, os aminoácidos de cadeia ramificada atingem a mitocôndria da musculatura exercitada, participando da síntese de glutamina, a qual segue para os tecidos para a formação de glutamato (LAYMAN et al., 2003; LANCHA JUNIOR, 2004). Shimomura et al. (2000), em experimento com cobaias encontraram resultados que sugerem que uma dieta rica em BCAA preserva as reservas de glicogênio do fígado e da musculatura esquelética durante exercício, e que a diminuição na atividade complexa de desidrogenase do piruvato nestes tecidos, pelos BCAA dietéticos, está envolvida nestes mecanismos.

5.10. Atividade das enzimas TGP, TGO, CK e LDH no soro sanguíneo dos animais alimentados com as dietas CAS, ISL e HSL nos diferentes grupos de treinamento.

O aumento da atividade enzimática da TGP/ALT e TGO/AST está relacionado com a extensão, e não com a gravidade da lesão, pois estas enzimas estão presentes predominantemente no citoplasma. Dessa forma, mesmo uma lesão que não cause morte celular pode ser suficiente para que ocorra a liberação desta enzima na corrente sanguínea (PEREZ et al., 1997; SHEFFER; GONZÁLEZ, 2006).

A CK e LDH são enzimas muito sensíveis para indicar lesão muscular, podendo ocorrer um incremento na atividade plasmática destas enzimas no esforço prolongado (KRAMER; HOFFMANN, 1997). Por serem citossólicas e de tamanhos pequenos, conseguem ultrapassar a membrana celular mesmo que não exista um dano tecidual muito grande. Na realidade, um simples aumento de permeabilidade da membrana é suficiente para que ocorra o extravasamento dessas enzimas (PEREZ et al., 1997).

As enzimas TGO/AST, TGP/ALT e LDH foram determinadas no mesmo dia da morte dos animais e a CK foi determinada no segundo dia após a morte dos animais, devido à estabilidade. Os animais foram mortos 24 horas após a última sessão de atividade física.

➤ 5.10.1. Transaminase glutâmico-pirúvica (TGP/ ALT)

Na Figura 28 estão apresentadas as atividades da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP/ALT) dos animais por dieta experimental e por grupo de treinamento.

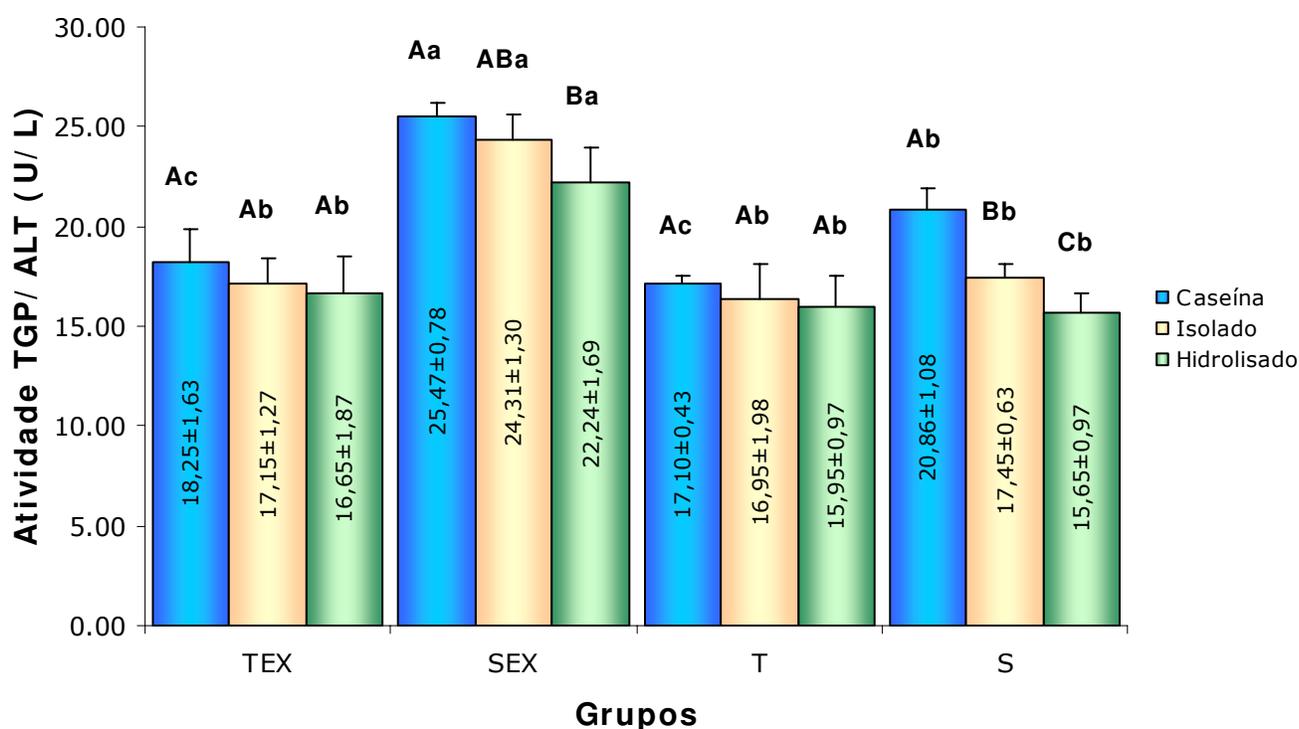


Figura 28. Atividade enzimática média (U/L) da TGP/ALT no soro sanguíneo dos animais \pm erro padrão da média (EPM) durante 35 dias. Letras maiúsculas representam a diferença estatística ou não entre as três dietas estudadas [caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL)] no mesmo grupo de treinamento. Letras minúsculas indicam ou não a diferença estatística da mesma dieta (CAS ou ISL ou HSL) nos diferentes grupos de atividade física [treinados exaustos (TEX), sedentários exaustos (SEX), treinado (T), sedentário (S)]. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957)

Comparando a atividade da TGP/ALT dos animais que receberam a dieta padrão (CAS) em relação às outras duas fontes protéicas (ISL e HSL) no mesmo grupo de

treinamento, observou-se que não houve diferença estatística nos grupos TEX e T entre os três tipos de dietas. No grupo SEX, os animais que receberam a dieta CAS tiveram uma atividade enzimática maior em relação aos que consumiram a dieta HSL. No grupo S constatou-se que os animais que receberam a dieta padrão (CAS) apresentaram atividade da TGP/ALT significativamente maior que os ratos alimentados com as outras duas dietas (ISL e HSL).

Em relação à atividade da TGP/ALT dos animais alimentados com a dieta padrão (CAS) nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), observou-se que não houve diferenças estatísticas entre os grupos TEX e T. O grupo SEX apresentou uma atividade enzimática significativamente maior em comparação aos outros grupos (TEX, T e S).

A atividade da TGP/ALT dos animais alimentados com dieta ISL em relação aos que receberam HSL nos diferentes grupos de treinamento não apresentaram diferença estatística, exceto no grupo S, onde a atividade da enzima TGP/ALT foi significativamente maior nos animais alimentados com a dieta ISL em comparação aos que receberam a dieta com HSL.

Comparando a atividade da TGP/ALT entre os ratos que receberam as dietas ISL e HSL nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), verificou-se que no grupo SEX a atividade enzimática foi estatisticamente maior (28,5%), enquanto que entre os grupos TEX, T e S, não houve diferenças significativas.

De maneira geral, observou-se que os ratos que receberam HSL em todos os grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S), apresentaram valores menores de atividade enzimática (TGP/ALT) em relação aos alimentados com as dietas com CAS e ISL. Porém, não foi observada diferenças estatísticas exceto nos grupos S e SEX. Neste último grupo a diferença significativada foi entre os ratos com dieta HSL e os animais alimentados com a dieta CAS (Figura 28).

Analizando o efeito do exercício observou-se que os grupos que realizaram atividade física contínua (TEX e T) apresentaram concentrações menores da TGP/ALT em relação aos grupos sedentários (SEX e S). Num estudo feito com ratas (Fisher) submetidas a 9 semanas de exercício físico (natação) e alimentadas com proteína padrão (caseína) não foi observada diferença significativas entre animais treinados e sedentários na concentração da TGP/ALT, os (GONÇALVES, 2007).

Koutedakis et al. (1993) num estudo feito com humanos observaram que houve um aumento agudo da atividade da TGP/ALT nos indivíduos treinados em comparação com os sedentários. No presente trabalho foi observado o contrário, indicando que indivíduos que praticam uma atividade regular podem manter os níveis da TGP/ALT em concentrações menores que os sedentários.

Também foi observado que a atividade enzimática da TGP/ALT do grupo SEX teve médias estatisticamente superiores em relação aos outros grupos (TEX, T e S) para as três dietas utilizadas (CAS, ISL e HSL). Embora os valores encontrados neste trabalho estejam dentro os valores de referência para esta enzima (DANTAS et al., 2006), os resultados sugerem que poderia haver uma maior lesão hepática em animais sedentários levados à exaustão (WILLARD et al., 1993).

➤ 5.10.2. Transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO/ AST)

Na Figura 29 estão apresentadas as atividades da transaminase glutâmico-pirúvica (TGO/AST) dos animais por dieta experimental e por grupo de treinamento.

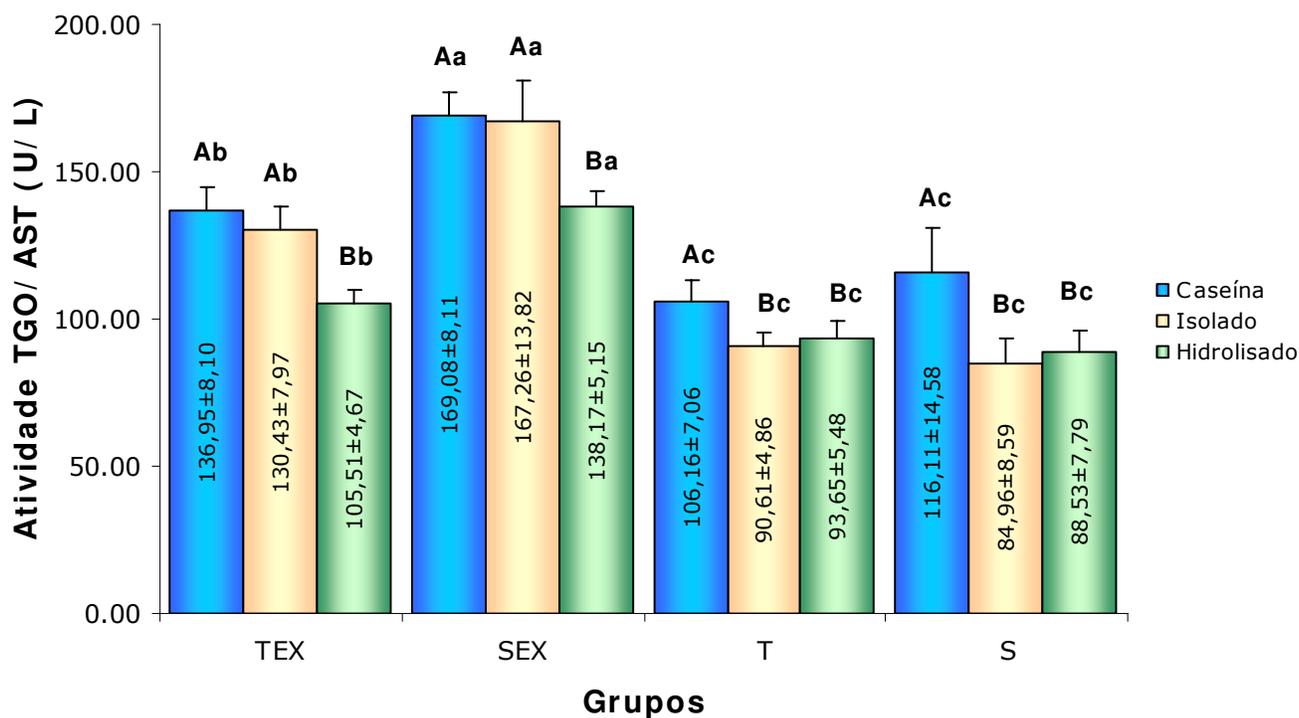


Figura 29. Atividade enzimática média (U/L) da TGO/AST no soro sanguíneo dos animais \pm erro padrão da média (EPM) durante 35 dias. Letras maiúsculas representam a diferença estatística ou não entre as três dietas estudadas [caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL)] no mesmo grupo de treinamento. Letras minúsculas indicam ou não a diferença estatística da mesma dieta (CAS ou ISL ou HSL) nos diferentes grupos de atividade física [treinados exaustos (TEX), sedentários exaustos (SEX), treinado (T), sedentário (S)]. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957)

Comparando a atividade enzimática da TGO/AST nos animais que receberam a dieta padrão (CAS) em relação às outras duas fontes protéicas (ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento, observou-se que os animais alimentados com a dieta CAS apresentaram um valor estatisticamente maior em todos os grupos (TEX, SEX, T e S) em relação aos ratos que receberam a dieta HSL. Nos grupos TEX e SEX, os ratos que consumiram a dieta CAS não

apresentaram diferenças significativas em relação aos que receberam a dieta ISL. Nos grupos T e S não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 29).

Em relação à atividade da TGO/AST dos animais alimentados com a dieta padrão (CAS) nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), observou-se que os grupos TEX e SEX apresentaram diferenças estatísticas entre eles e não foi observada diferença estatística entre os grupos T e S. O grupo SEX apresentou uma atividade enzimática significativamente maior em comparação com todos os outros grupos (TEX, T e S).

A atividade da TGO/AST nos animais que receberam a dieta ISL em relação aos que consumiram a dieta HSL nos diferentes grupos de treinamento foi estatisticamente maior para os grupos TEX e SEX, não havendo diferença significativa nos grupos T e S entre estas dietas.

Em relação à atividade da TGO/AST dos animais alimentados com as dietas ISL e HSL nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), identificou-se que os grupos TEX e SEX apresentaram diferenças estatísticas entre eles e não foi observada diferença significativa entre os grupos T e S. O grupo SEX apresentou uma atividade enzimática significativamente maior em comparação aos outros grupos (TEX, T e S).

De maneira geral podemos observar que os ratos que receberam a dieta com HSL apresentaram valores estatisticamente menores de atividade enzimática (TGO/AST) em relação aos alimentados com as dietas com CAS e ISL nos grupos TEX e SEX. Nos grupos T e S somente nos animais que consumiram a dieta com CAS foi encontrado diferença estatística. Este resultado sugere que o consumo da dieta com HSL com grau de hidrólise médio (10%) poderia proporcionar uma melhor proteção contra danos teciduais em relação à dieta com CAS tanto em ratos sedentários ou submetidos a exercício físico.

Analisando o efeito do exercício nos grupos T e S observou-se que não houve diferença estatística entre estes grupos. Resultados similares foram encontrados num estudo feito Gonçalves, (2007) com ratas Fisher sedentárias ou submetidas a treinamento físico

(natação) por 9 semanas e alimentadas com dieta padrão (caseína), o autor não encontrou diferença estatística na concentração da TGO/AST entre os animais treinados e sedentários.

Também foi observado que o grupo SEX teve médias de atividade enzimática da TGO/AST significativamente maiores em relação aos outros grupos de atividade física (TEX, T e S) nas três dietas. Como a TGO/AST, assim como TGP/ALT, é uma enzima indicadora de dano hepático (WILLARD et al., 1993), os resultados sugerem que poderia haver maior lesão hepática e muscular nos animais sedentários levados à exaustão.

➤ 5.10.3. Creatina Quinase (HK)

Na Figura 30 estão apresentadas as atividades da creatina quinase (CK) dos animais por dieta experimental e por grupo de treinamento

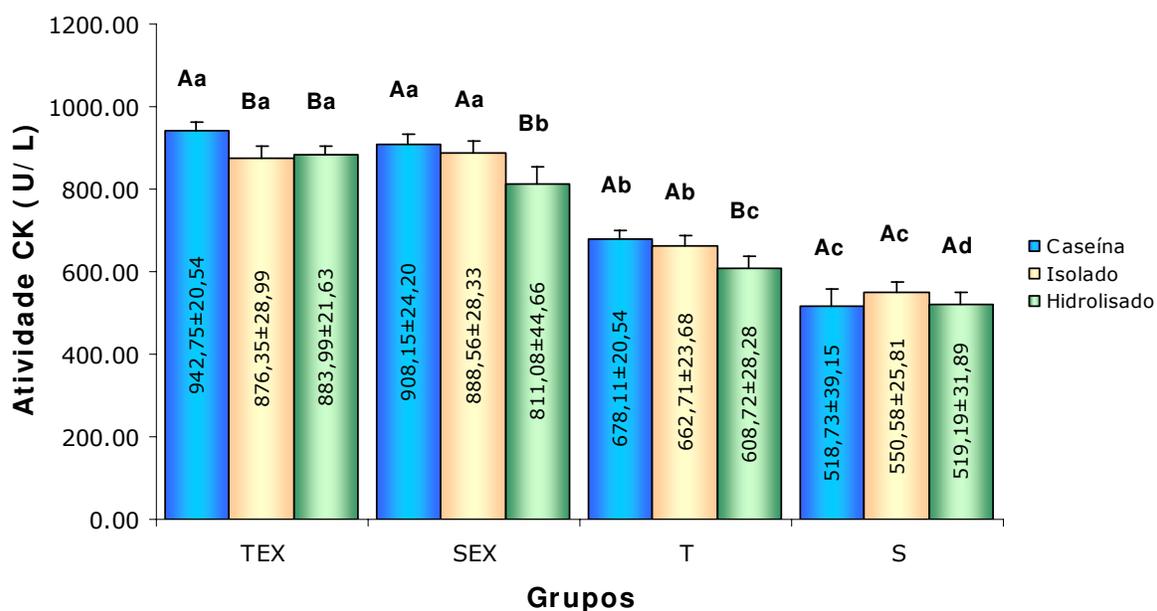


Figura 30. Atividade enzimática média (U/L) da CK no soro sanguíneo dos animais ± erro padrão da média (EPM) durante 35 dias. Letras maiúsculas representam a diferença estatística ou não entre as três dietas estudadas [caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL)] no mesmo grupo de treinamento. Letras minúsculas indicam ou não a diferença estatística da mesma dieta (CAS ou ISL ou HSL) nos diferentes grupos de atividade física [treinados exaustos (TEX), sedentários exaustos (SEX), treinado (T), sedentário (S)]. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957).

Comparando a atividade enzimática da CK dos animais que receberam a dieta padrão (CAS) em relação às outras fontes protéicas (ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento, observou-se que os animais alimentados com a dieta CAS apresentaram um valor estatisticamente maior nos grupos TEX, SEX e T em relação aos ratos que receberam a dieta com HSL. No grupo S não foi observada diferença significativa entre as três dietas estudadas (CAS, ISL e HSL). Os animais alimentados com a dieta CAS apresentaram um valor estatisticamente maior no grupo TEX em relação aos ratos que receberam a dieta com ISL. Nos grupos SEX e T não houve diferenças entre estas duas dietas.

Em relação à atividade da CK dos animais alimentados com a dieta padrão (CAS) nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), constatou-se que os grupos TEX e SEX não apresentaram diferenças estatísticas entre eles. Estes dois grupos apresentaram valores estatisticamente maiores que os grupos sem exaustão. O grupo T teve um valor significativamente maior que o grupo S.

Com respeito à atividade enzimática da CK dos animais alimentados com as dietas ISL e HSL no mesmo grupo de treinamento, verificou-se que nos grupos TEX e S não houve diferenças estatísticas entre estas duas dietas (ISL e HSL). Nos grupos SEX e T observou-se que houve diferenças significativas entre as dietas ISL e HSL, sendo estatisticamente maior a atividade enzimática da CK para a dieta ISL.

Em relação à atividade da CK dos animais alimentados com a dieta ISL nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), verificou-se que os grupos TEX e SEX não apresentaram diferenças estatísticas entre eles. Estes dois grupos apresentaram valores estatisticamente maiores que os grupos sem exaustão. O grupo T teve um valor significativamente maior que o grupo S.

Avaliando a atividade enzimática da CK nos animais alimentados com HSL nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), observou-se diferenças significativas

entre todos os grupos, sendo que os animais do grupo TEX apresentaram o maior valor de atividade da CK, seguidos na ordem pelo ratos do grupo SEX, T e S.

Como é conhecido, a CK é a enzima mais sensível para indicar lesão muscular, podendo ocorrer um incremento na atividade plasmática desta enzima no esforço prolongado (KRAMER; HOFFMANN, 1997). Por ser citossólica e de tamanho pequeno, consegue ultrapassar a membrana celular mesmo que não exista um dano tecidual muito grande. Na realidade, um simples aumento de permeabilidade da membrana é suficiente para que ocorra o extravasamento desta enzima (PEREZ et al., 1997).

De maneira geral, pode-se observar na Figura 30 que os ratos que receberam a dieta com HSL apresentaram valores estatisticamente menores de atividade da CK em relação aos alimentados com a dieta com CAS em todos os grupos de treinamento exceto no grupo S, considerado grupo controle. Este resultado é muito interessante considerando que os animais que foram levados até à exaustão (TEX e SEX) e consumiram a dieta com HSL, foram capazes de correr por um tempo estatisticamente maior em relação aos animais que receberam a dieta com CAS (Figura 23). Contudo, observou-se que a atividade enzimática da CK foi menor nos animais alimentados com a dieta HSL nos grupos submetidos a exercício físico. Isto sugere que o consumo da dieta com HSL com grau de hidrólise médio (10%) pode proporcionar uma melhor proteção contra lesões musculares em relação à dieta com CAS em animais submetidos a exercício físico (Figura 30).

➤ 5.10.4. Lactato desidrogenase (LDH)

Na Figura 31 estão apresentadas as atividades da lactato desidrogenase (LDH) dos animais por dieta experimental e por grupo de treinamento.

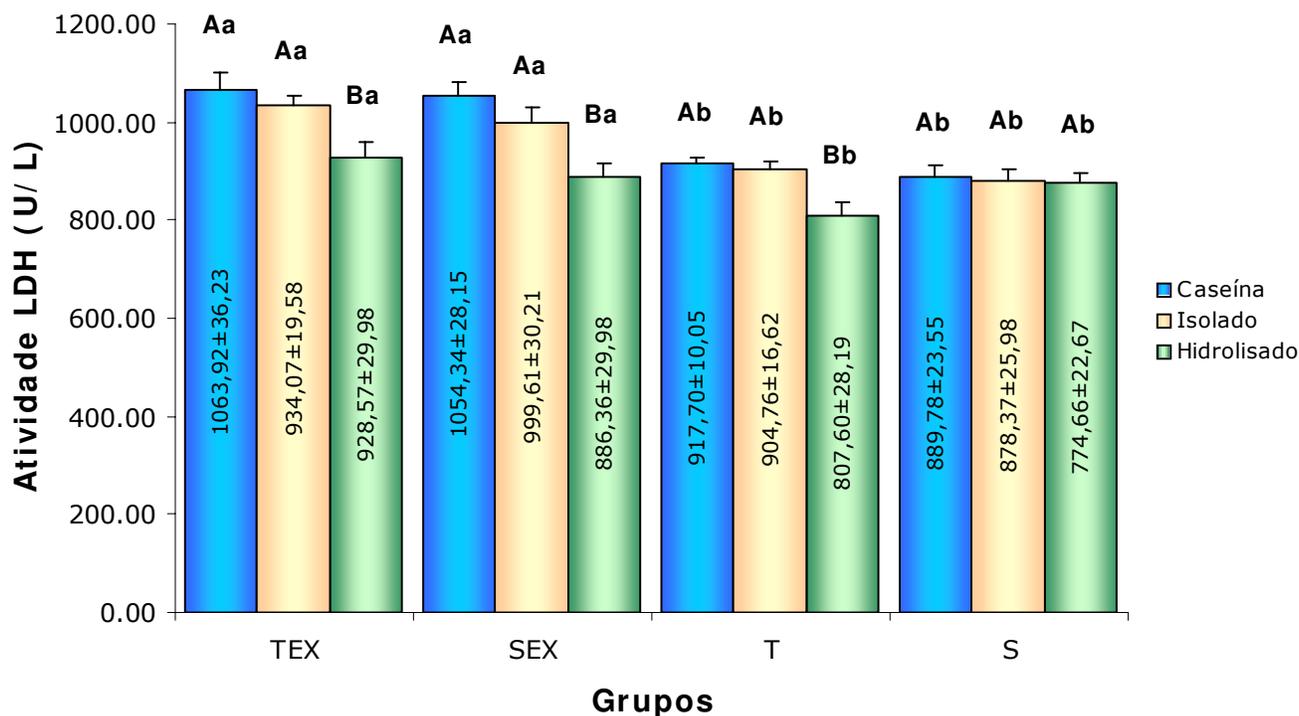


Figura 31. Atividade enzimática média (U/L) da LDH no soro sanguíneo dos animais \pm erro padrão da média (EPM) durante 35 dias. Letras maiúsculas representam a diferença estatística ou não entre as três dietas estudadas [caseína (CAS), isolado de soro de leite (ISL) e hidrolisado de soro de leite (HSL)] no mesmo grupo de treinamento. Letras minúsculas indicam ou não a diferença estatística da mesma dieta (CAS ou ISL ou HSL) nos diferentes grupos de atividade física [treinados exaustos (TEX), sedentários exaustos (SEX), treinado (T), sedentário (S)]. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas entre si, já seja comparando as dietas (CAS, ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento ou a mesma dieta no diferentes grupos de atividade física estudados, segundo Teste de Duncan ($p < 0.05$) (COCHRAN; COX, 1957).

Comparando a atividade enzimática da LDH dos animais que receberam a dieta padrão (CAS) em relação com as outras duas fontes proteicas (ISL e HSL) no mesmo grupo de treinamento, observou-se que os animais alimentados com a dieta CAS apresentaram um valor estatisticamente maior nos grupos TEX, SEX e T somente em relação aos ratos que

receberam a dieta com HSL. No grupo S não foi observada diferença significativa entre as três dietas estudadas (CAS, ISL e HSL).

Em relação à atividade da LDH dos animais alimentados com a dieta padrão (CAS) nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), constatou-se que os grupos TEX e SEX não apresentaram diferenças estatísticas entre eles. Estes dois grupos apresentaram valores estatisticamente maiores que os grupos sem exaustão. Não foi observada diferença significativa entre os grupos T e S.

A atividade enzimática da LDH nos animais alimentados com ISL e HSL no mesmo grupo de treinamento, foi estatisticamente maior nos animais que receberam a dieta ISL em comparação aos que consumiram HSL nos grupos TEX, SEX e T, no grupo S não foi observada diferença estatística significativa entre as três dietas.

Em relação à atividade da LDH dos animais alimentados com a dieta ISL nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), verificou-se que os grupos TEX e SEX não apresentaram diferenças estatísticas entre si, sendo estatisticamente diferentes dos grupos T e S, os quais não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Avaliando a atividade enzimática da LDH dos animais alimentados com a dieta HSL nos diferentes grupos de treinamentos (TEX, SEX, T e S), observou-se que os grupos levados à exaustão (TEX e SEX) não apresentaram diferenças estatísticas entre eles e tiveram valores estatisticamente maiores que os grupos que não foram exauridos (T e S), não havendo diferenças estatísticas entre estes últimos.

Assim como a CK, a LDH é uma enzima citossólica e de tamanho pequeno, que consegue ultrapassar a membrana celular mesmo que não exista um dano tecidual muito grande (PEREZ et al., 1997). A LDH também é uma enzima indicadora de lesão muscular, podendo ocorrer um incremento na atividade plasmática desta enzima no esforço prolongado (KRAMER; HOFFMANN, 1997).

De maneira geral, observou-se na Figura 31 que os ratos que receberam a dieta HSL apresentaram valores estatisticamente menores de atividade da LDH em relação aos alimentados com a dieta com CAS e ISL em todos os grupos de treinamento exceto no grupo S, considerado grupo controle. Assim como no caso da CK, pode-se dizer que este dado é muito importante, uma vez que os animais levados à exaustão (TEX e SEX) da dieta HSL, foram capazes de correr por um tempo significativamente maior em relação aos animais que receberam a dieta com CAS (Figura 23). Contudo, observou-se que a atividade enzimática da LDH foi menor nos animais alimentados com a dieta HSL nos grupos submetidos a exercício físico. Isto indica que o consumo da dieta com HSL com grau de hidrólise médio (10%) proporcionou uma melhor proteção contra lesões musculares em relação à dieta com CAS nos animais submetidos a exercício físico (Figura 31).

➤ **5.10.5. Discussão geral sobre a atividade enzimática**

Analisando os resultados da atividade das quatro enzimas analisadas no soro sanguíneo, observou-se que, de modo geral, as atividades foram maiores nos grupos levados à exaustão, sugerindo maiores danos teciduais em exercícios intensos. Segundo GARBUS et al. (1964), ratos não treinados sujeitos ao exercício físico intenso demonstraram maior liberação de enzimas musculares que ratos treinados. Observando que no presente trabalho estes grupos correspondem aos grupos SEX e TEX, respectivamente, os resultados achados por GARBUS et al. (1964), foram confirmando para as quatro atividades enzimáticas estudadas.

O grupo SEX teve médias de atividade enzimática estatisticamente maiores (no caso das enzimas TGO e TGP) ou iguais (no caso das enzimas CK e LDH) em comparação às do grupo TEX, mesmo apresentando tempos menores para atingir a exaustão. Isto sugere que a lesão tecidual produzida seria menor em animais que praticam atividade física regular do que em indivíduos sedentários.

Também de maneira geral foi possível observar neste trabalho que não houve aumento da atividade enzimática nos grupos treinados (T) em relação aos sedentários (S) nas três dietas estudadas, sugerindo que o treinamento não causou lesões nos tecidos. Este resultado contrasta com o encontrado por Newsholme; Leech (1988) e Lancha Junior (1996) que observaram que a atividade da alanina aminotransferase (TGP/ALT) é maior (3X) no tecido muscular de ratos treinados em comparação aos sedentários.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. As dietas elaboradas com as proteínas de soro de leite isolado (ISL) e hidrolisado com grau de hidrólise 10% (HSL) tiveram influência nos diferentes parâmetros metabólicos estudados, em ratos jovens Wistar submetidos a exercício físico em esteira, em comparação com a dieta padrão (CAS)
2. Os animais alimentados com as dietas ISL e HSL apresentaram um consumo de dieta diário e um ganho de peso estatisticamente menor que os que receberam a dieta padrão (CAS) em todos os grupos de treinamento exceto no grupo TEX no qual não houve diferenças estatísticas com relação ao consumo de dieta.
3. As três fontes protéicas, caseína (CAS), isolado (ISL) e hidrolisado (HSL) de soro de leite são de excelente qualidade nutricional de acordo com o quociente de Eficiência Protéica (tipo PER).
4. Os consumos das proteínas do soro de leite (ISL e principalmente HSL), fez com que o animal estendesse o tempo de permanência no exercício, antes de que alcançará a exaustão, em relação à CAS, nos grupos TEX e SEX, sem alterar as concentrações de lactato nestes grupos.
5. A concentração de lactato sanguíneo foi estatisticamente menor nos ratos alimentados com as proteínas do soro de leite (ISL e HSL), quando comparada com os que receberam a dieta padrão (CAS) nos grupos T e S.
6. O uso das proteínas de soro de leite (ISL e HSL) resultou em aumento significativo das reservas de glicogênio hepático nos grupos que não foram levados a exaustão, treinados (T) e sedentários (S), em comparação com os grupos exauridos (TEX e SEX), após 24 horas do teste da exaustão.

7. A concentração de glicogênio muscular (tanto do gastrocnêmio como do sóleo) não foi afetada pela ingestão das proteínas de soro de leite (ISL e HSL) em comparação com a ingestão de proteína padrão (CAS) nos diferentes grupos de treinamento (TEX, SEX, T e S)
8. A atividade enzimática da alanina e aspartato aminotransferases (TGP/ALT e TGO/AST), creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) apresentou de maneira geral valores menores nos animais que consumiram as dietas com proteínas de soro de leite (ISL e HSL) em relação aos que ingeriram a dieta padrão (CAS), sugerindo a possibilidade de proteção à células contra as lesões, (causadas pela atividade física), e melhorando a recuperação dos tecidos danificados.
9. De maneira geral pode-se concluir que o uso das proteínas do soro de leite [principalmente o hidrolisado (10% grau de hidrólise)] em relação à proteína padrão (CAS) como única fonte protéica em ratos submetidos a exercício físico, promoveu a) menor ganho de peso em todos os grupos, b) maior resistência à exaustão tanto no grupo TEX como no SEX, c) maior concentração de glicogênio hepático nos grupos T e S e d) maior proteção contra possíveis lesões hepáticas e musculares nos diferentes grupos estudados (TEX, SEX, T e S).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

*Referências seguindo as normas da NBR 10520/ 2002 DA ABNT: manual

ABECIA-SORIA, M.I., **Efeito da alimentação sub-crônica do hidrolisado das proteínas do lactosoro em ratos sedentários e exercitados**. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição)-Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, p.141, Campinas, 2003.

ADIBI, S.A.; MORSE, E.L., Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption, **The Journal of Clinical Investigation**, 50 (11), p.2266-2275, Ann Arbor, Michigan, 1971.

ADLER-NISSEN, J., Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 27 (6), p.1256-1262, Washington, D.C., 1979.

AFONSO, M.; SOUZA, C.N.; ZAGATTO, A.M.; LUCIANO, E., Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos wistar, **Mortiz**, 9 (2), p.87-93, Rio Claro São Paulo, 2003.

AIMUTIS, W.L., Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis, **Journal of Nutrition**, 134 (4), p.989s-995s, Bethesda, Maryland, 2004.

ALEXANDER, J.W.; GOTTSCHLISH, M.M., Nutritional immunomodulation in burned patients, **Critical Care Medicine**, 18 (2), p.S149-S153, Philadelphia Pennsylvania, 1990.

AMAYA-FARFAN, J.; PACHECO, M.T.B., Amino acids: (A) properties and occurrence. In: Finglas BC, Trugo PL., **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, 2nd ed. p.146-153, Baltimore, Maryland, 2003.

AMAYA-FARFAN, J.; TASSI, E.M.M.; AZEVEDO, J.R.M., Efeito da proteína hidrolisada na formulação de dietas para ratos submetidos ao exercício, **Journal of Biomolecular Medicine and Free Radicals**, 3 (2), p.66-69, São Paulo, 1997.

ANDERSEN, P.; SALTIN, B. Maximal perfusion of skeletal muscle in man, **The Journal Physiology**, 366, p.233-249, Cambridge, UK, 1985.

ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S., Signaling Pathways Involved in Translational Control of Protein Synthesis in Skeletal Muscle by Leucine¹, **Journal of Nutrition**, 131 (3), p.856S-860S, Bethesda, Maryland, 2001.

ARAÚJO, A.M.; SOARES, Y.N.G., Perfil de Utilização de repositores protéicos nas academias de Belém, Pará. **Revista de Nutrição**, 12 (1), p.81-89, Campinas, São Paulo, 1999.

ARIAS, G.M.P.; DIAZ, H.D.P.; ARISTIZABAL, R.J.C.; JARAMILLO, L.H.N., Efeitos da desidratação, durante exercício sub-máximo de longa duração, na concentração sanguínea do lactato, na frequência cardíaca e na percepção subjetiva do esforço, **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, 9 (4), p.41-46, Brasília, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.) **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 15. ed., Arlington, 1990.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society**, Ed. D. Feistane, 15 ed., p.109 Washington D.C. 1995.

BALDWIN, J.; SNOW, R.J.; GIBALA, M.J.; GARNHAM, A.; HOWARTH, K.; FEBBRAIO, M.A., Glycogen availability does not affect the TCA cycle or TAN pools during prolonged, fatiguing exercise, **Journal of Applied Physiology**, 94 (6), p.2181-2187, Bethesda, Maryland, 2003.

BERGSTROM J, HERMANSEN L, HULTMAN E, SALTIN B. Diet muscle glycogen and physical performance, **Acta Physiologica Scandinavica**, 71 (2), p.140-150, Stockholm, 1967.

BIOLO, G.; WILLIAMS, B.D.; FLEMING, R.Y.D.; WOLFE, R.R., Insulin actin on muscle protein kinetics and amino acid transport during recovery after resistance exercise. **Diabetes**, 48 (5), p.949-57, Alexandria, Virginia, 1999.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J., A rapid method of total lipid extraction and purification, **Canadian Journal Biochemistry and Physiology**, 37 (8), p.911-917, Ottawa, 1959.

BLOMSTRAND, E.; SALTIN, B., BCAA intake affects protein metabolism in muscle after but not during exercise in humans, **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, 281, p.E365-E374, Bethesda, Maryland, 2001.

BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M.P.; MAUBOIS, J.L.; BEAUFRÈRE, B., Slow and fast dietary proteins differently modulate post-prandial protein secretion, **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, 94 (26), p.14930-14935, Washington, DC, 1997.

BONEN, A.; BAKER, S.K.; HATTA, H., Lactate transport and lactate transporters in skeletal muscle, **Canadian Journal of Applied Physiology** 22 (6), p.531-552. Ottawa, Ontario, 1997.

BONEN, A.; MISKOVIC, D.; TONOUCI, H.; LEMIEUX, K.; WILSON, M.C.; MARETTE, A.; HALESTRAP, A.P., Abundance and subcellular distribution of MCT1 and MCT4 in heart and fasttwitch skeletal muscles, **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 278 (6), p.E1067-1077, Bethesda, Maryland, 2000.

BORGES, P.F.Z.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.P.; JACOBUCCI, H.B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S., Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo, **Brazilian Journal Food Technology**, 4 (52), p.1-8, Campinas, São Paulo, 2001.

BØRSHEIN, E.; AARSLAND, A.; WOLFE, R.R., Effect of an amino acids, protein, and carbohydrate mixture in net muscle protein balance after resistance exercise. **International Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism**, 14 (3), p.255-271, Germantown, New York, 2004.

BOUNOUS, G., Whey Protein Concentrate (WPC) and Glutathione Modulation in Cancer Treatment, **Anticancer Reserch**, 20 (6C), p.4785-4792, Athens, 2000.

BROOKS, G., FAHEY, T.; WHITE, T., **Exercise physiology: Human Bioenergetics and its Applications**, 3rd ed., Mayfield publishing Company, California, 2000.

BROOKS, G.A., Aminoacid and protein catabolism during exercise and recovery. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 19 (5), p.150-156, Natick, Massachusetts 1987.

BROUNS, F.; SARIS, V.H.M.; BECKERS, E.; ADLERCREUTZ, H.; VAN DER VUSSE, G.J.; KEIZER, H.A.; KUIPERS, H.; MENHEERE, P.; WAGENMAKERS, A.J.M.; TEN HOOR, F., Metabolic changes induced by sustained exhaustive cycling and diet manipulation, **International Journal of Sports Medicine**, 10 (Suppl.1), p.S49-S62, Thieme, Stuttgart, 1989.

BRUKE, L.M.; READ, R.S.D., Dietary supplements in sport, **Sports Medicine**, 15 (1), p.43-65, Mairangi Bay, Auckland, 1993.

BUSH B.M., **Interpretation of laboratory results for small animal clinicians** Blackwell Scientific, Oxford, UK, 1991.

CAHILL, G.E., Starvation in man, **New England Journal of Medicine**, 19 (12), p.668-675, Waltham, Massachusetts, 1970.

CALBET JAL, MACLEAN DA. Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. **Journal of Nutrition**, 132(8), p.2174-2182, Bethesda, Maryland, 2002.

CAMARGO, P.B.; VOLTARELLI, F.A.; MACHADO DE OLIVEIRA, C.A.; PAIVA, M.F.; GOBALTTO, C.A.; ROSTOM DE MELLO, M.A., Metabolismo proteico no músculo esquelético de ratos submetidos a exercício em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio, [http:// www.efdeportes.com/](http://www.efdeportes.com/), **Revista Digital**, Año 10-Nº 93. Buenos Aires, 2006.

CAMÕES, M.; LOPES, C., Fatores associados à atividade física na população portuguesa, **Revista de Saúde Pública**, 42(2), p.208-216 São Paulo-Brasil, 2008).

CAMPBELL, B.; KREIDER, R.B.; ZIEGENFUSS, T.; LA BOUNTY, P.; ROBERTS, M.; BURKE, D.; LANDIS, J.; LOPEZ, H.; ANTONIO J., International Society of Sports Nutrition position stand: protein and exercise, **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, 4 (8), p.1-7, Texas, 2007.

CAPERUT, E.C.; DOS SANTOS, R.V.T.; MELLO, M.T.; COSTA ROSA, L.F.B.P., effect of endurance training on hypothalamic serotonin concentration and performance (short communication), **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 36, p.89–191, Melbourne, 2009.

CARVALHO, I.S., BCAA (Aminoácidos de Cadeia Ramificada), **Fitness and Performance Journal**, 4 (5), p. 253, Rio de Janeiro, 2005.

CERSOSIMO E., Fisiologia da nutrição, **Cultura Médica**, p.37-45, Rio de Janeiro, 1987.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A., **Bioquímica Ilustrada** 2ª edição, editora Artmed. Porto Alegre, 1996.

CLAEYS, E; DE SMET, S.; BALCAEN, A.; RAES, K; DEMEYER, D.; Quantification of fresh meat peptides by SDS-PAGE in relation to ageing time and taste intensity, **Meat Science**, 67 (2), p.281-288, Oxon, England, 2004.

CLARK, K., Nutritional guidance to soccer players for training and competition, **Journal of Sports Sciences**, 12 (S), p.S43-S50, Florence, Kentucky, 1994.

COCHRAN, W.G.; COX, G.M., **Experimental Design**, p.127-131, Wiley-New York, 1957.

COLGAN, M., **Optimum sports nutrition: Your competitive edge (A complete nutritional guide for optimizing athletic performance)**, Ed. Advanced Research Pr, Setauket, New York, 1993.

Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, **Manual de procedimentos analíticos**, Extrato Etéreo (hidrólise ácida) método N° 52, 2005.

CONLEE, R.K., Muscle glycogen and exercise endurance: a twenty-years perspective, **Exercise and Sports Science Review**, 15 (1), p.1-28, Philadelphia, Pennsylvania, 1987.

CONN, E.E.; STUMPF, P.K., **Introdução à bioquímica**, 4 ed. Tradução de J.R. Magalhães; L.; Mennucci, Edgard Blücher. Tradução de Outlines of biochemistry, p.525, São Paulo, 1980.

CONTARTEZE, R.V.L.; MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; DE MELLO, M.A.R., Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidades igual e superior à máxima fase estável de lactato, **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 13 (3), p.169-174, São Paulo, 2007.

CORNELIUS, L.M., Anormalidade do perfil bioquímico padrão. In LORENZO, M.D.; CORNELIUS, L.M, Ed **Diagnóstico Clínico em Pequenos Animais**, 2ed, Interlivros, Cap, 61 p. 435-478, Rio de Janeiro, 1996.

DANGIN. M.; BOIRIE, Y.; GARCIA-RODENAS, C.; GACHON, P.; FAUQUANT, J.; CALLIER P.; BALLE, O.V.R.E.; BEAUFRE, B.R.E., The digestion rate is an independent regulating factor of post prandial protein retention, **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 280 (2), p.E340-E348, Bethesda, Maryland, 2001.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; NAKAMURA, R.K.; BARONI, C.S.; BERSANI-AMADO, C.A., Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá Estado do Paraná, **Acta Scientiarum. Health Science** 28 (2), p.165-170, Maringá, 2006.

DAVIS J.M.; BAILEY, S.P., Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. **Medicine and Science Sports and Exercise**, 19, p.S166-S171, Natick, Massachusetts, 1987.

DE REZENDE GOMES, M; TIRAPEGUI, J., Relação de alguns suplementos nutricionais e o desempenho físico, **Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)**, 50 (4), p.317-329. ISSN 0004-0622. Disponível em http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222000000400001&script=sci_arttext, Caracas, 2000.

DE WIT J.N., Nutritional and functional characteristics of whey proteins in foods products, **Journal of Dairy Science**, 81 (3), p.597-608, Champaign, Illinois, 1998.

DOHM, G.L.; HECKER, A.L.; BROWN, W.E.; KLAIN, G.J.; PUENTE, F.R.; ASKEW, E.W.; BEECHER, G., Adaptation of metabolism protein to endurance training increased aminoacids oxidation in response to training, **Biochemical Journal**, 164 (3) p.705-708, London, 1977.

EIGEL, W.N.; BUTLER, J.E.; ERNSTROM, C.A.; FARRELL, H.M.; HARWALKAR, V.R.; JENNESS, R.; WHITNEY, R.McL., Nomenclature of proteins of cow's milk, **Journal of Dairy Science**, 67 (8), p.599- 1631, Champaign, Illinois, 1984.

ELPHICH, G.F.; GREENWOOD, B.N.; CAMPISI, J.; FLESHNER, M., Increase serum IgM in voluntarily physically active rats: a potential role for B1 cells, **Journal Applied Physiology**, 94 (2), p.660-667, Bethesda, Maryland, 2003.

ETZEL, M.R., Manufacture and use of dairy protein fractions, **Journal of Nutrition**, 134 (4), p.996s-1002s, Bethesda, Maryland, 2004.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) **Energy and protein requirements**, FAO Nutritional Studies, Geneva 1985

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Amino-acid content of food and biological data on proteins. FAO Nutritional Studies, Roma, vol.24, 1970.

FELL, J.W.; RAYFIELD, J.M.; GULBIN, J.P.; GAFFNEY, P.T., Evaluation of the Accusport® Lactate analyzer, **International Journal of Sports Medicine**, 19 (3), p.199-204, Thieme, Stuttgart, 1998

FERNANDES, G.F.M.; BEZERRA, J.J.B., Lactato: intermediário metabólico da glicólise aeróbia, **Revista digital vida e saúde**, 2 (5), Juiz de Fora, Minas Gerais, 2003

FIELDING, R.A.; PARKINGTON, J., What are the dietary protein requirements of physically active individuals? New evidence on the effects of exercise on protein utilization during post-exercise recovery, **Nutrition in Clinical Care**, 5 (4), p.191-196, Boston, Massachusetts, 2002.

FOX, E.L.; MATHEWS, D.K., **Bases fisiológicas da educação física e dos desportos**, ed. InterAmericana, 3ª edição, Guanabara, Rio de Janeiro, 1986.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44(1), P.6-29, Washington, D.C, 1996.

FRÜHBECK, G., Slow and fast dietary proteins, **Nature**, 391, p.843-845, London, England, 1998.

GALLANI, M.C.B.J., **Efeito do exercício agudo na natação e do ácido ascórbico sobre variáveis bioquímicas de cobaias sedntárias e treinadas**, Dissertação (Mestrado)–Instituto de Biociências Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

GARBUS, J.; HIGHMAN, B.; ALTLAND, P.D., Serum enzymes and lactic dehydrogenase isoenzymes after exercise and training in rats, **American Journal Physiology**, 207, p.467-472, Bethesda, Maryland, 1964.

GARCIA, M.; GUZMAN, R.; CABEZAS, I.; MERINO, V.; PALMA, C.; PEREZ, R., Evaluación del entrenamiento tradicional del caballo criollo chileno de rodeo mediante el análisis de variables fisiológicas y bioquímicas sanguíneas, **Archivos de Medicina Veterinaria**, 31 (2), p.167-176, Valdivia-Chile, 1999.

GINGER, M.R.; GRIGOR, M.R., Comparative aspects of milk caseins, **Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 124 (2), p.133-145, Elsevier, London, Amsterdam, New York, 1999.

GLADDEN L.B., Symposium: The role skeletal muscle in lactate exchange during exercise: introduction, **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 32 (4), p.753-755, Natick, Massachusetts, 2000.

GLADDEN, L.B., Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium, **The Journal of Physiology**, 558 (1), p.5-30, London, 2004.

GLADDEN, L.B., Muscle as a consumer of lactate, **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 32 (4), p.764-771, Natick, Massachusetts, 2000.

GLADDEN, L. B. A "Lactatic" Perspective on Metabolism. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 40 (3), p.477-485, Natick, Massachusetts, 2008.

GOLDBERG, A., Influence of insulin and contractile activity on muscle size and protein balance. **Diabetes**, 28, suppl. 1, p.18-24, 1979.

GONÇALVES, A.C., **Avaliação nutricional, defesas antioxidantes e perfil de lipídeos séricos em ratas treinadas submetidas à dieta hipercolesterolêmica**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação do núcleo de pesquisas em ciências biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em ciências Biológicas área de concentração; Bioquímica Estrutural e fisiológica, Ouro Preto-MG, 2007

GOODMAN, M.N., Amino acid and protein metabolism. In: HORTON, E.S.; TERJUNG, R., eds. **Exercise Nutrition and Energy Metabolism**, p.89-99, New York, Macmillan, 1988.

GOREHAM, C.; GREEN, H.J.; BURNETT, M.B.; RANNEY, D., High-resistance training and muscle metabolism during prolonged exercise, **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 276 (3), p.E489-E496, Bethesda, Maryland, 1999.

GUERRA, I. Importância da alimentação do atleta visando a melhora da performance. **Revista Nutrição em Pauta**, 4, p.63-66, 2002.

GUERRA, I.; SOARES, E.A.; BURINI, R.C., Aspectos nutricionais do futebol de competição, **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 7 (6), P.200-206, São Paulo, 2001.

GUYTON, A., **Tratado de Fisiología Médica**, traducción Santiago Sapiña Renard, Editorial Interamericana, 1988.

HA, E.; ZEMEL, M.B., Functional properties of whey, whey components and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people, **Journal of Nutritional Biochemistry**, 14 (5), p.251-258, New York, NY, 2003.

HAGEN, S.R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J., Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino-acids, **Journal of Association of the Official Analytical Chemists**, 72 (6), p.912-916, Washington, DC, 1989.

HAMBREUS, L., Nutritional aspects of milk proteins. *In*: Fox PL, editor. **Advanced Dairy Chemistry**. v.1, Proteins, p.457, London, 1992.

HANSEN, P.A.; NOLTE, L.A.; CHEN, M.M.; HOLLOSZY, J.O., Increased GLUT-4 translocation mediates enhanced insulin sensitivity of muscle transport after exercise, **Journal of Applied Physiology**, 85 (4), p.1218-1222, Bethesda, Maryland, 1998.

HARAGUCHI, F.K., **Avaliação nutricional e hipercolesterolemia da "proteína do sor do leite" comercial**, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica, Ouro Preto, 2007.

HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; DE PAULA, H., Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana, **Revista de Nutrição**, 19 (4), p.479-488, Campinas, São Paulo, 2006.

HARALAMBIE, G.; BERG, A., Serum urea and changes with exercise duration, **European Journal of Applied Physiology**, 36 (1), p.138-139, New York, NY, 1976.

HASHIMOTO, T.; MASUDA, S.; TAGUCHI, S.; BROOKS, G.A., Immunohistochemical analysis of MCT1, MCT2 and MCT4 expression in rat plantaris muscle. **The Journal of Physiology**, 567 (1), p.121-129, London, 2005.

HASHIMOTO, T.; BROOKS, G. A. Mitochondrial Lactate Oxidation Complex and an Adaptive Role for Lactate Production. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 40 (3), p.486-494, Natick, Massachusetts, 2008.

HASTEN, D.L.; PAK-LODUCA, J.; OBERT, K.A.; YARASHESKI, K.E., Resistance exercise acutely increases MHC and mixed muscle protein synthesis rates in 78-84 and 23-32 yrs old, **American of Journal Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 278 (4), p.E620-E626, Bethesda, Maryland, 2000.

HAWLEY, J.A.; BURKE, L.M., Effect of meal frequency and timing on physical performance, **British Journal of Nutrition**, 77 (1), p.S91-S103, Cambridge, 1997.

HAYES, A.; CRIBB, P.J., Effect of whey protein isolate on strength, body composition and muscle hypertrophy during resistance training, **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 11 (1), p.40-44, Bruxelles, 2008.

HENDERSON, A.S.; BLACK, A.L.; BROOKS, G.A., Leucine turnover and oxidation in trained rats during exercise, **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 249 (2), p. E137-E144, Bethesda, Maryland, 1985.

HENG, G.B., Chemical composition of bovine colostrum: (Food for Health in the Pacific Rim, Trumbull (Conn), **Food and Nutrition Press**, p.405, Shangai China, 1999.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; Amigo, L., β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides (Review Article), **Amino Acids**, 35 (2), p.257-265, Netherlands 2008.

HOLLMANN, W.Y.; HETTINGER, T., **Medicina do Esporte**, 4º Barueri: Manole, 2005.

HOOD, D.A.; TERJUNG, R.L., Amino acid metabolism during exercise and following endurance training, **Sports Medicine**, 9 (1), p.23-35, Mairangi Bay, Auckland, 1990.

HOOD, D.A.; TERJUNG, R.L., Effect of endurance training on leucine metabolism in perfused rat skeletal muscle, **American Journal of physiology-Endocrinology and Metabolism**, 253 (6), p.E648-56, Bethesda, Maryland, 1987.

HORWITZ W, ed. **Official Methods of Analysis**, 12 ed.: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1094p, Washington DC, 1975.

IVY, J.L.; DING, Z.; HWANG, H.; CIALDELLA-KAM, L.C.; MORRISON, P.J., Post exercise carbohydrate-protein supplementation: phosphorylation of muscle proteins involved in glycogen synthesis and protein translation, **Amino Acids**, 35 (1), p.89-97, Netherlands, 2008.

IVY, J.L.; GOFORTH JR, H.W.; DAMON, B.M.; MCCAULEY, T.R.; PARSONS, E.C.; PRICE, T.B., Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate-protein supplement. **Journal of Applied Physiology**, 93 (4), p.1337-44, Bethesda, Maryland, 2002.

IVY, J.L.; KUO, C.H., Regulation of Glut 4 protein and glycogen synthase during muscle glycogen synthesis after exercise, **Acta Physiologica Scandinavica**, 162 (3), p.295-304, Stockholm, 1998.

JAYAPRAKASHA, H.M.; BRUECKNER, H., Whey protein concentrate: A potential functional ingredient for food industry, **Journal Food Science Technology**, 36 (3), p.189-204, Chester, Cheshire, 1999.

JEBB, S.A.; MOORE, M.S., Contribution of a sedentary lifestyle and inactivity to the etiology of overweight and obesity: current evidence and research issues, **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 31 (11), supl (173), p.S534-S541, Natick, Massachusetts, 1999.

JENTJENS, R.L.; VENABLES, M.C.; JEUKENDRUP, A.E., Oxidation of exogenous glucose, sucrose, and maltose during prolonged cycling exercise, **Journal Applied Physiology**, 96 (4), p.1285-1291, Bethesda, Maryland, 2003.

JONES, M.G.; SWAMINATHAN, R., The clinical biochemistry of creatine kinase **Journal of the International Federation of Clinical Chemistry**, 2 p.108-114, Shelton, Connecticut 1990.

KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M., Proteins in whey: chemical, physical and functional properties, **Advances in Foods and Nutrition Reserch**, 33, p.343-438, Nebraska, Lincoln, 1989.

KRAEMER, W.J.; FREEK, S.J.; EVANS, W., Strength and power training: physiological mechanisms of adaptation, **Exercise and Sport Sciences Reviews**, 24 (1), p.363-397, Philadelphia, Pennsylvania, 1996.

KRAMER, J.W.; HOFFMANN, W.E., Clinical enzymology. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L., (Eds) **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5th. Academic Press., cap.12, p.303-335, San Diego, California, 1997.

KOUTEDAKIS, Y.; RAAFAT, A.; SHARP, N.C.; ROSMARIN, M.N.; BEARD M.J.; ROBBINS, S.W., Serum enzyme activities in individuals with different levels of physical fitness, **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, 33 (3), p.252-257, Torino-Italy, 1993

LANCHA JUNIOR, A.H., Atividade física, suplementação nutricional de aminoácidos e resistência periférica à insulina, **Revista Paulista de Educação Física**, 10 (1), p.68-75, São Paulo, 1996.

LANCHA JUNIOR, A.H.; RECCO, M.B.; ABDALLA, D.S.; CURI, R., Effect of aspartate, asparagine, and carnitine supplementation in the diet on metabolism of skeletal muscle during a moderate exercise, **Physiology and Behavior**, 57 (2), p.367-71, Elsevier, London, Amsterdam, New York, 1995.

LANCHA JUNIOR, A.H. Nutrição e metabolismo aplicados à atividade motora. São Paulo: Atheneu; 2004

LANG, H.; WURZBURG, W., Creatine Kinase, an Enzyme of Many Forms, **Clinical Chemistry**, 28 (7), p.1439-1447, Washington, DC, 1982.

LAYMAN, D.K., The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. **Journal of Nutrition**, 133 (1), p.261S-267S, Bethesda, Maryland, 2003.

LAYMAN, D.K.; BAUM, J.I., Dietary protein impact on glycemic control during weight loss, **Journal of Nutrition**, 134 (4), pp.968s-973s, Bethesda, Maryland, 2004.

LEES, R., **Manual de Análises de Alimentos** (Laboratory Handbook of methods of food analysis), Ed, Acribia, 17, p.124-125, Zaragoza, 1979.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica** Tradução. De Lodi, W.R. e Simões, A.A. 5 ed. Savier, 725p. São Paulo, 1989.

LEHNINGER, A.L.; BOZAL, F., **Princípios de Bioquímica** (Metabolismo, bioquímica, proteínas, enzimas, lípidos, hormonas, nutrición, genética, vitaminas), Trad. Ortés, J. Barcelona, Ed. Omega, 1013p. Barcelona-España, 1986.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M., **Princípios de Bioquímica**, Tradução de W.R. Lodi, e. Simões, A.A. Tradução de: Principles of biochemistry, Sarvier 839p, São Paulo, 1995.

LEMON, P.W.R., MULLIN, J.P., Effects of initial muscle glycogen levels on protein catabolism during exercise, **Journal of Applied physiology**, 48, p.624-629, Bethesda, Maryland, 1980.

LEMON, P.W.R.; NAGLE, F.J.; MULLIN, J.P.; BENEVEGA, N.J., In vivo leucin oxidation at rest and during two exercise intensities, **Journal of Applied physiology**, 53 (1), p.947-954, Bethesda, Maryland, 1982.

LEMON, P.W.R.; PROCTOR, D.N., Protein intake and athletic performance, **Sports Medicine**, 12 (5), p.313-325, Mairangi Bay, Auckland, 1991
LEMON, P.W.R., Do athletes need more dietary protein and amino acid?, **International Journal of Sport Nutrition**, 5 Suppl p.S39-61, London, Ontario, 1995.

LEMON, P.W.R., Dietary protein requirements in athletes, **Journal of Nutritional Biochemistry** 8 (2), p.52-60, New York, NY, 1997.

LEMON, P.W.R., Influência da proteína alimentar e do total de energia ingerida no aumento da força muscular, **Sports Science Exchange**, vol. 10, Ohio, 1997.

LEMON, P.W.R., Effects of exercise on dietary protein requirements, **International Journal of Sport Nutrition**, 8 (4), p.426-447, London, Ontario, 1998.

LIMA-SILVA, A.E.; ADAMI, F.; NAKAMURA, F.Y.; DE-OLIVEIRA, F.R.; GEVAERD, M.S., Metabolismo de gordura durante o exercício físico: mecanismos de regulação. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, 8 (4), p.106-114, Florianópolis-SC, 2006.

LIMA-SILVA, A.E.; FERNANDES, T.C.; DE-OLIVEIRA, F.R.; NAKAMURA, F.Y.; GEVAERD, M.S., Metabolismo do glicogênio muscular durante o exercício físico mecanismos de regulação, **Revista de Nutrição**, 20 (4), p.417-429 Campinas, São Paulo, 2007.

LO, S.L.; RUSSELL, J.C.; TAYLOR, A.W., Determination of glycogen in small tissue samples, **Journal of Applied Physiology**, 28 (2), p. 234-236, Bethesda, Maryland, 1970.

LOLLO, P.C.B.; **Influência da suplementação de proteínas do soro de leite na composição corporal, desempenho físico e parâmetros bioquímicos de atletas juvenis de futebol** Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Alimentos e Nutrição – Área de Nutrição Experimental e Aplicada a Tecnologia de Alimentos, CAMPINAS-SP, 2007.

LOLLO, P.C.B; DE ARRUDA, M.; COVRE, M FREDERICO, C.R.; MIYASAKA, C.K., Yo-Yo intermittent recovery test in a young soccer team of Brazil before and after protein supplementation plus carbohydrate, **Journal of Sports Science and Medicine**, Suppl. 10, Bursa, Turkey, 2007.

LÖNNERDAL B., Nutritional and physiologic significance of human milk proteins, **American Journal of Clinical Nutrition**, 77 (6), p.1537S-1543S, Bethesda, Maryland, 2003.

LOPES, H.J.J., Enzimas no laboratório clínico aplicações diagnósticas, **Gold Analisa Diagnóstica Ltda**, Belo Horizonte-MG, 1998.

LÓPEZ J.; FERNÁNDEZ, A., Metabolismo y utilización de los substratos durante el ejercicio. En LÓPEZ J **Fisiología del Ejercicio** 2º ed. Panamericana, p.11-46, Madrid, España, 1998.

MANNINEN, A.H., Review Protein hydrolysates in sports nutrition, **Nutrition and Metabolism**, 6 (38) p.1-5, London, 2009.

MARKUS CR, OLIVER B, DE HAAN EHF., Whey Protein rich in alfa-lactoalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects, **American Journal of Clinical Nutrition**, 75 (6), p.1051-1056, Bethesda, Maryland, 2002.

MARQUEZI, M.L.; LANCHÁ JUNIOR, A.H., Possível efeito da suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada, aspartato e asparagina sobre o limiar anaeróbico, **Revista Paulista de Educação Física**, 11 (1), p.90-101, São Paulo, 1997.

MARQUEZI, M.L.; ROSCHEL, H.A.; COSTA, A.S.; SAWADA, L.A.; LANCHÁ J.R, A.H., Effect of aspartate and asparagine supplementation on fatigue determinants in intense exercise, **International Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism**, 13 (1), p.65-75, Germantown, New York, 2003.

MARSHALL, K.R.; HARPER, W.J., Whey protein concentrates, **Bulletin of the International Dairy Federation**, 233, p.21-32, 1988.

MATSUDO, S.M.; MATSUDO, V.R.; ARAÚJO, T.; ANDRADE, D.; ANDRADE, E.; OLIVEIRA, L.; BRAGGION, G., Nível de atividade física da população do Estado de São Paulo: análise de acordo com o gênero, idade e nível sócio-econômico, distribuição geográfica e de conhecimento. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, 10 (4), p.41-50, Brasília, 2002.

MAUBOIS, L.; FAUQUANT, J.; FAMELART, M.H.; CAUSSIN, F., Milk microfiltrate, a convenient starting material for fractionation of whey proteins and derivatives, **The importance of whey and whey components in Food and Nutrition Proceedings of**

the 3rd International Whey Conference, p.59-72, Munich, Chicago: American Dairy products Institute, 2001.

McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L., . **Fisiologia do exercício** - energia , nutrição e desempenho humano, 3ª ed., Guanabara Koogan Rio de Janeiro, 1992.

McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L., **Fisiologia do exercício Energia Nutrição e desempenho humano**, 4ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1998.

McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L., **Medida do consumo energético humano**, In: Fisiologia do exercício, 4ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1998.

McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L , **Fisiologia do esporte e do exercício**, 2ª ed. São. Paulo: Manole, 2001

McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L., **Fundamentos de fisiologia do exercício**, 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

McINTOSH, G.H.; ROYALE, P.J; LEU, R.K.L.; REGESTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L.; KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W., Whey proteins as functional food ingredients?, **International Dairy Journal**, 8 (5-6), p.425-434, Kidlington, Oxford, 1998.

McLESTER JUNIOR, J.R., Muscle contraction and fatigue: the role of adenosine 5'-diphosphate and inorganic phosphate, **Sports Medicine**, 23 (5), p.287-305, Mairangi Bay, Auckland, 1997.

MEREDITH, C.N.; ZACKIN, M.J.; FRONTERA, W.R.; EVANS, W.J., Dietary protein requirements and protein metabolism in endurance-trained men, **Journal of Applied Physiology**, 66 (6), p. 2850-2856, Bethesda, Maryland, 1989.

MEREDITH, J.W.; DITESHEIM, J.A.; ZALOGA, G.P., Visceral protein levels in trauma patients are greater with peptide diet than with intact protein diet, **The Journal of Trauma**, 30 (7), p.825-829, San Antonio, Texas, 1990.

MODLER, H.W., Milk processing. In: NAKAI, S.; MODLER, W., (Eds.), **Food Proteins: Processing Applications**, Wiley-VCH, Inc., p.1-21, New York, 2000.

MORIFUJI, M.; KOGA, J.; KAWANAKA, K., HIGUCHI, M., Branched-Chain Amino Acid-Containing Dipeptides, Identified from Whey Protein Hydrolysates, Stimulate Glucose Uptake Rate in L6 Myotubes and Isolated Skeletal Muscles, **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, 55 (1), p.81-86, Tóquio, 2009.

MORIFUJI, M.; SAKAI, K.; SANBONGI, C.; SUGIURA, K., Dietary Whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats, **British Journal of Nutrition**, 93 (4), p.439-445, Cambridge, 2005.

MOTTA, V.T., **Bioquímica (Metabolismo de aminoácidos)** Autolab Análises Clínicas, Editora Educus 1º edição, p 332, São Paulo, 2005.

NEWSHOLME, E.A.; BLOMSTRAND, E., Branched-Chain Amino Acids: Metabolism, Physiological Function, and Application: Session III Branched-Chain Amino Acids and Central Fatigue, **Journal of Nutrition**, 136 (1), p.274S-276S, Bethesda, Maryland, 2006.

NEWSHOLME, E.A.; LEECH, A.R., **Biochemistry for the Medical Sciences**, p.982, John Willey, New York 1988.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), World Health Organization (WHO) (World. Expert Committee on Physical Status: the use and interpretation of antropometry physical status: the use and interpretation of antropometry: repor of a WHO Expert Commitee. Switzerland; 1995, Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: <03 de abril de 2007>.

PACHECO, M.T.B.; BIGHETTI, E.; ANTÔNIO, M.; CARVALHO, J.E.; ROSANELI, C.F.; SGARBIERI, V.C., Efeito de um hidrolisado de proteínas de soro de leite e de seus peptídeos na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos, **Revista de Nutrição**, 19 (1), p.47-55, Campinas, São Paulo, 2006.

PELLEGRINOTTI, I.L., **Análise comparativa das atividades da lactatodesidrogenase no soro e na saliva de indivíduos treinados e não treinados**, editora UNICAMP, Campinas-São Paulo, 1989.

PELLET P.L.; YOUNG V.R, **Nutritional Evaluation of Protein Foods**, The United Nations University, 154p, Tokyo Japan, 1980.

PEREZ, R.M.; GARCIA, I.; CABEZAS, R.; GUZMAN, V.; MERINO, S.; VALENZUELA, C.; GONZALEZ., Actividad física y adaptación fisiológica del caballo chileno a la competencia de rodeo, **Archivos de Medicina Veterinaria**, 29, p.221-234, Valdivia, 1997.

PHILLIPS, S.M.; TIPTON, K.D.; FERRANDO, A.A.; WOLFE, R.R., Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover, **American Journal of physiology-Endocrinology and Metabolism**, 276 (1), p.E118-E124, Bethesda, Maryland, 1999.

PILEGAARD H.; DOMINO K.; NOLAND T.; HELLSTEN Y.; HALESTRAP AP.; BANGSBO J. Effect of high-intensity exercise training on lactato/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism American Journal of Physiology**, 276(2), p.E255-E261, Bethesda 1999a.

PIMENTA, F.M.V., **Efeito do consumo do hidrolisado das proteínas do soro lácteo no desempenho físico e no metabolismo protéico do rato exercitado**. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição)-Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 106p, Campinas, 2002.

PIMENTA, F.M.V.; ABECIA-SORIA, M.I.; AULER, F.; AMAYA-FARFAN, J., Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level, **International Dairy Journal**, 16 (9), p.984-991, kidlington, Oxford, 2006.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T., **Fisiologia do Exercício**, Teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho, ed. Manole São Paulo, 2000.

PUNIDADAS, P.; RIZVI, S.S.H., Separation of milk proteins into fractions rich in casein or whey proteins by cross flow filtration, **Food Research International**, 31 (4), p.265-272, Amsterdam, Netherlands, 1998.

RAMOS, A.G., **Utilização das proteínas do soro lácteo por ratos jovens** Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição)-Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C.J.R., AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, **Journal of Nutrition**, 123 (11), p.1939-51. Bethesda, Maryland, 1993.

REGESTER, G.O.; McINTOSH, G.H.; LEE, V.W.K.; SMITHERS, G.W., Whey proteins as nutritional and functional food ingredients, **Food Australia**, [s.I], 48 (3), p.123-128, março, Austrália, 1996.

ROBERGS, R.A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D., Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **AJP Regulatory Integrative and Compomparative Physiology**, 287, p.R502-516, 2004.

ROBERGS, R.A., Exercise-induced metabolic acidosis: Where do the protons come from?, **Sport Science (Review Biochemistry)**, 5 (2), p.1-20, Albuquerque, NM, 2001.

ROMIJN J.A.; COYLE, E.F.; SIDOSSIS, L.S.; GASTALDELLI, A.; HOROWITZ, J.F.; ENDERT, E.; WOLFE, R.R., Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration, **American Journal of physiology-Endocrinology and Metabolism**, 265 (3), p.E380-E391, Bethesda Maryland, 1993.

ROSSI, L.; TIRAPGUI, J., Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição, **Revista Paulista de Educação Física**, 13 (1), p.67-82, São Paulo, 1999.

SALZANO JR, I., Nutritional supplements: practical applications in sports, human performance and life extension, **Symposium Series** 007, p.75-202, São Paulo, 1996-2002.

SARTORI, C.D.F.; MINOZZO, F.C.; BARGIERI, J.V., Suplementação de aminoácidos e derivados protéicos no exercício, **CENTRO DE ESTUDOS DE FISILOGIA DO EXERCÍCIO (CEFE)**, disponível em <http://www.centrodeestudos.org.br/artigos.html>, São Paulo, 2007.

SCHAGGER, H.; WON JAGOW, G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa., **Analytical Biochemistry**, 166 (2), p.368-379, San Diego, Califórnia, 1987.

SCHEFFER, J.F.S.; GONZÁLEZ, F.H.D., Enzimologia Clínica em Medicina Veterinária. 2006, Disponível em <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/index.htm>. Acesso em 4.9.07.

SCOTT, K.P.; HOWLEY, E.T., **Fisiologia do exercício Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho** terceira edição, editorial Manole Ltda, São Paulo-Brazil, 2000.

SGARBIERI, V.C., **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**, ALMED; UNICAMP, 387p, Campina, São Paulo, 1987.

SGARBIERI, V.C., Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite, **Revista de. Nutrição**, 17 (4), p. 397-409, Campinas, São Paulo, 2004.

SGARBIERI, V.C., **Proteínas em Alimentos Protéicos: propriedades, degradações, modificações**: Editora-Livraria Varela, p.139-157, Campinas, São Paulo, 1996.

SGARBIERI, V.C., Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite, **Brazilian Journal of Food Technology**, 8 (1), p.43-56, Campinas, São Paulo, 2005.

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B., Revisão Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2 (12), p. 7-19, Campinas, São Paulo, 1999.

SHAW, L.M.; STROMME, J.H.; LONDON, J.L.; THEODORSEN, L., International Federation of Clinical Chemistry. Scientific Committee, Analytical Section. Expert Panel on

Enzymes. IFCC methods for measurement of enzymes. Part 4. IFCC methods for gamma-glutamyltransferase [(gamma-glutamyl)-peptide: amino acid gamma-glutamyltransferase, EC 2.3.2.2], **Clinical Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, 135: p.315f-338f, Maryland Heights, Missouri, 1983.

SHIMOMURA, Y.; MURAKAMI, T.; NAKAI, N.; NAGASAKI, M.; OBAYASHI, M.; LI, Z.; XU, M.; SATO, Y.; KATO, T.; SHIMOMURA, N.; FUJITSUKA, N.; TANAKA, K.; SATO, M. Suppression of glycogen consumption during acute exercise by dietary branched-chain amino acids in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, 46(2) p.71-77. 2000.

SMITH, L.L.; Overtraining, excessive exercise and altered immunity: is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response?, **Sports Medicine**, 33 (5) p.347-64., Mairangi Bay, Auckland, 2003.

SMITHERS, G.W.; BALLARD F.J.; COPELAND, A.D.; DE SILVA, K.J.; DIONYSIUS, D.A.; FRANCIS, G.L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P.A.; MCINTOSH, G.H.; MITCHELL, I.R.; PEARCE, R.J.; REGESTER, G.O., Symposium: advances in dairy foods processing and engineering New Opportunities from the Isolation and Utilization of Whey Proteins, Division of Food Science and Technology-Melbourne Laboratory, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), **Journal of Dairy Science**, 79 (8), p.1454-1459, Champaign, Illinois, 1996.

SMOLKA, M.B., **Exercício físico e expressão da proteína de estresse HSP72 em músculos de ratos submetidos a diferentes a diferentes tipos de treinamento**, Dissertação apresentada, no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Campina, 1999.

SNYDER, A.C., Overtraining and glycogen depletion hypothesis, **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 30 (7), p.1146-1150, Natick, Massachusetts, 1998.

SOARES, E.A., Manejo nutricional no exercício físico, **Revista Nutrição em Pauta**, 3, p.49-48, 2001.

SPACKMAN, D.C.; STEIN, W.H.; MOORE, S., A recording apparatus for use in the chromatography of amino acids, **Analytical Biochemistry**, 30 p.1190-1206, San Diego, Califórnia, 1958.

STANCANELLI, M., **Efeito Ergogênico do Caldo de Cana**, Dissertação de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular-Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

STURK, A.; SANDERS, G.T.B., Macroenzymes: prevalence, composition, detection and clinical relevance, **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, 28 (2), p.65-81, Berlin, 1990.

TADICH, N.; GALLO, C.; ALVARADO, M., Valores bioquímicos sanguíneos de equinos que tiran carretones en la ciudad de Valdivia (Chile) **Archivos de Medicina Veterinaria** 32 (2), p.171-183. Valdivia-Chile, 2003.

TARNOPOLSKY, M.A., Building muscle: nutrition to maximize bulk and strength adaptations to resistance exercise training, **European Journal of Sport Science**, 8 (2), p.67-76, Oxfordshire, 2008.

TASSI, E M.M.; AMAYA-FARFAN, J.; AZEVEDO R., Hydrolyzed α -lactalbumin as a source of protein to the exercising rat, **Nutrition Research**, 18 (5), p.875-881, Oxford, 1998.

TASSI, E.M.M., **Desenvolvimento de dietas para o desempenho físico. Comparação de olipeptídios de α -lactalbumina com a proteína intacta como fonte protéico-energética, no rato** Dissertação de Mestrado na Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 1996.

THE INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY IFCC Section (1980) nº. 1, **Clinical Chemistry**, 26 (12), p. 1748-1753, Finland, 1980.

TIRAPEGUI, J., Nutrição: **Fundamentos e Aspectos Atuais**, cap 11, Ed Atheneu São Paulo, 2002.

TONON, C.R.; DE MELLO, R.M.A.; DIAS, T.F.; ANARUMA, C.A., Teor Protéico da Dieta e Crescimento Muscular em Ratos Submetidos ao Treinamento Anaeróbio **Motriz**, 7 (2), p.69-74, São Paulo-Brasil, 2001.

TORNOPOLSKY, M.A.; MacDOUDALL, J.D.; ATKINSON, S.A., Influence of protein intake and training status on nitrogen balance and lean body mass, **Journal of Applied Physiology**, 64 (1), p.187-93, Bethesda, Maryland, 1988.

TORRES, G.A.; SANZ, A.B.; GARCÍA, A.A.; GARRIDO, P.G., **Dieta de Triatletas en Periodo Pretemporada y Precompetitivo**, (III Congreso de La asociación española de ciencia del deporte, 11-13 mar/2004)

www.unex.es/eweb/cienciadeporte/congreso/04%20val/comunica.htm, Valencia-España, 2004.

TSINTZAS, K.; WILLIAMS, C., Human muscle glycogen metabolism during exercise: effect of carbohydrate supplementation, **Sports Medicine**, 25 (1), p.7-23, Mairangi Bay, Auckland, 1998.

UCHIDA, M.C.; BACURAU, A.V.N.; AOKI, M.S.; BACURAU, R.F.P., Consumo de Aminoácidos de Cadeia Ramificada não Afeta o Desempenho de Endurance, **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 14 (1), p.42-45, Niterói Rio de Janeiro, 2008.

USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 15, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR15/sr15.html>, 2002.

VAN DER MEULEN, J.H.; KUIPERS, H.; DRUKKER, J., Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats, **Journal of Applied Physiology**, 71 (3), p.999-1004, Bethesda, Maryland, 1991.

VAN HALL, G.; RAAYMAKERS, J.S.H.; SARIS, W.H.M.; WAGENMAKERS, A.J.M., Ingestion of branched-chain amino acids and tryptophan during sustained exercise in man: failure to affect performance, **Journal of Physiology**, 486 (3), p.789-794, London, 1995.

VAN HALL, G.; SARIS, W.H.M.; WAGENMAKERS, A.J., Effect of carbohydrate supplementation on plasma glutamine during prolonged exercise and recovery, **International Journal of Sports Medicine**, 19 (2), p.82-86, Thieme, Stuttgart, 1998.

VAN HALL, G.; SHIRREFFS, S.M.; CALBET, J.A.L., Muscle glycogen resynthesis during recovery from cycle exercise: no effect of additional protein, **Journal of Applied Physiology**, 88 (5), p.1631-1636, Bethesda, Maryland, 2000.

VAN LOON, L.J.C.; SARIS, W.H.M.; VERHAGEN, H.; WAGENMAKERS, A.J.M., Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate, **American Journal of Clinical Nutrition**, 72 (1), p.96-105, Bethesda, Maryland, 2000.

WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B., Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 42 (4), p.353-375, Philadelphia Pennsylvania, 2002.

WHITE, J.A.; HART, R.J.; FRY, J.C., An evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials, **The Journal of Automatical Chemistry**, 8 (4), p.170-177, New York, NY, 1986.

WHITE, T.P.; BROOKS, G.A., (U-14C) glucose, alanine and leucine oxidation in rats at rest and two intensities of running. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, 240 (2), p.E155-E165, Bethesda Maryland, 1981.

WILLARD, M.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G.H., **Diagnostico Clínico Patológico Práctico en los Animales Pequeños**, Intermedica Buenos Aires, 1993.

WONG, D.W.S.; CAMIRANT, W.M.; PAVLATH, A.E., Structures and functionalities of milk proteins, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 36 (8), p.807-844, Philadelphia Pennsylvania, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The world health report-Reducing Risks, Promoting Healthy Life, 2002, <http://www.who.int/whr/2002/en/>

YARASHESKI, K.E.; PAK-LODUCA, J.; HASTEN, D.L.; OBERT, K.A.; BROWN, M.B.; SINACORE, D.R., Resistance exercise training increases mixed muscle protein synthesis rate in frail woman and men >76 yr old, **American Journal Physiology**, 277 (1), p.E118-E125, Bethesda, Maryland, 1999.

YUDKOFF, M.; DAIKHIN, Y.; NISSIM, I.; HORYN, O.; LUHOVYY, B.; LAZAROW, A.; NISSIM, I. Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine. **Journal of Nutrition**, 135, p.1531S-1538S, Bethesda, Maryland, 2005.

ZAWADZKI KM, YASPELKIS BB III, IVY JL. Carbohydrate-protein complex increased the rate of muscle glycogen storage after exercise, **Journal of Applied Physiology**, 72(5), p.1854-1859, Bethesda, Maryland, 1992.

ZINSLY, P.F.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.P.; JACOBUCCI, H.B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S., Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo, **Brazilian Journal of Food Technology**, 4, p.1-8, Campinas, 2001.

ZIMERER, G.V., **Consumo de alimentos funcionais com ação antioxidante e exercícios orientados de baixa intensidade em adultos podem influenciar na qualidade de vida no item (estado de saúde)**, Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-Graduação apresentado como requisito de avaliação da disciplina Orientação de Estudos I, II e III do Instituto Superior de Educação, da Faculdade de Ensino Superior de São Miguel do Iguaçu, 2007

ZOPPI, C.C., **Adaptações induzidas pelo treinamento físico no metabolismo oxidativo e sistema de defesa antioxidante em músculo e sangue de rato e sua correlação com os níveis de lesão muscular**, 83p Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 1999.

ANEXOS

8. ANEXOS

8.1. ACEPÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

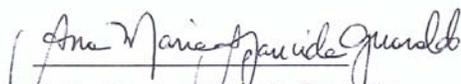
Certificamos que o Protocolo nº 840-1, sobre "EFEITOS METABÓLICOS INDUZIDOS PELA INGESTÃO DAS PROTEÍNAS DO LACTOSORO E SEU HIDROLISADO (GRAU DE HIDRÓLISE MÉDIO) EM RATOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka / Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán / María Inés Abecia-Soria está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 08 de junho de 2005.

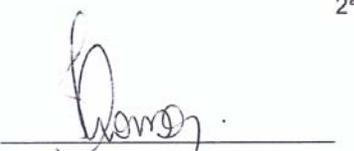
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 840-1, entitled "THE METABOLIC EFFECT OF THE HYDROLYZATED WHEY PROTEIN (MEDIUM HYDRILYSIS DEGREE) IN TRAINING RATS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on June 8, 2005.

Campinas, 25 de abril de 2007.

2ª. VIA


Profª. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP


Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 3788-6359
FAX 55 19 32893124

8.2. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO E PROTEÍNA BRUTA PELO MÉTODO DE KJELDAHL (SEMI-MICRO)

Introdução:

Neste método a matéria orgânica é digerida em meio fortemente ácido na presença de catalisador, sendo o N orgânico fixado sob a forma de sulfato de amônia. Após a adição de um excesso de álcali. A NH_4 destilada é captada por uma solução titulada de ácido. A transformação completa de N orgânico a sulfato de amônio requer quantidades apropriadas de H_2SO_4 bem como a seleção de um catalisador efetivo em uma temperatura e tempo de digestão apropriada. Esta escolha dependerá da natureza da substância a ser analisada.

O método de Kjeldahl determina a matéria nitrogenada total de uma amostra. Contribui para o nitrogênio total não somente de proteínas e seus produtos de degradação até os aminoácidos, como também o de purinas, pirimidinas, creatinina, vitaminas, uréia, aminas e amidas. O método não determina grupos nitro, nitroso, azo, hidrazo e ciano, a não ser que reduzam estes grupos.

Para determinação da "proteína bruta" multiplicam-se o nitrogênio total encontrado por um fator de conversão nitrogênio/proteína, adequado para a amostra em análise, caso já tenha sido determinado. No caso contrário, utiliza-se o fator geral empírico 6,25 que foi determinado por Kjeldahl para albumina de carne bovina. Outros fatores de conversão já determinados para alimentos são:

- Leite e produtos lácteos 6,38;
- Trigo e produtos tritícolas 5,70;
- Gelatina 5,55;
- Ovo 6,68;
- Arroz 5,95;
- Soja 5,71;
- Cevada, aveia, centeio 5,83;
- Nozes 5,46;
- Carne 6,25;
- Feijão 5,4;

O princípio do método consiste na transformação do nitrogênio das substâncias nitrogenadas, por ebulição com ácido sulfúrico concentrado ($d=1,84$) e catalisadores, é dizer que acontece a digestão da matéria orgânica até a completa oxidação de carbono e

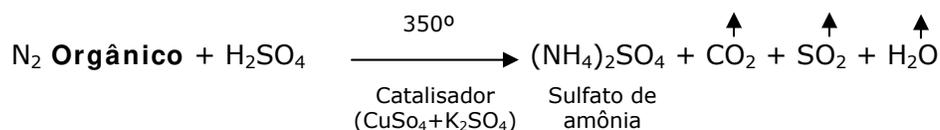
hidrogênio e, redução no nitrogênio protéico que é retido sob a forma de sulfato de amônio. A amônia liberada após a adição de solução de NaOH concentrado e aquecimento, é recolhida num volume conhecido de solução ácida (após destilação, a amônia é recolhida em ácido bórico). O excesso é titulado em solução ácida padronizada (HCl diluído 0,02N). O nitrogênio é então determinado por titulação com ácido clorídrico valorado, ao vermelho de metilo (pH 4,2 – 6,3).

Procedimento geral:

- 1- Pesar de 0,2 a 0,3 g de amostra (1-3 mL se for líquida) em tubo de Kjeldahl de 200 mL, esta pesagem pode ser efetuada em papel ou diretamente no tubo.
- 2- Adicionar 1g de mistura catalisadora e 5mL de H₂SO₄ concentrado (na capela).

1º FASE: DIGESTÃO

Realizada com ácido mineral forte (H₂SO₄). O tratamento é feito em capela para eliminar produtos de decomposição.



Aqui se converte todo o N (que esta na forma de proteína, ácidos nucléicos, etc). em ácido amônico. O término da digestão vai depender do manipulador. Ela inicia-se com aquecimento lento 50°C e aumenta-se gradativamente a temperatura em 50°C por vez, cada 30 min. Até 350-375°C evitando a formação de espuma; atingida a temperatura máxima da digestão, continuar o aquecimento até as paredes internas de o tubo fiquem perfeitamente limpas e a fumaça branca de dióxido de enxofre (SO₂); praticamente cessar e o líquido apresentar coloração verde-esmeralda ou translúcida. O tempo vai de 6 a 12 horas.

2ª FASE: DESTILAÇÃO

Após esfriar, proceder à destilação no destilador de nitrogênio (Tecnal), recolhendo o destilado em um Erlenmeyer de 250mL contendo 10mL de ácido bórico (H_3BO_3), com 3 a 4 gotas do indicador de Andersen; proceder a titulação até atingir volume aproximado de 100 mL. Trata-se o líquido proveniente da digestão com hidróxido de sódio 50%. Isso faz com que exista a formação de **Sulfato de Sódio e Hidróxido de Amônio**.



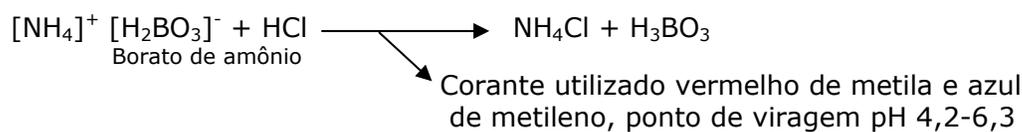
O hidróxido de amônio se decompõe e vira amônia. A amônia reage com o ácido bórico colocado no Erlenmeyer e vai resultar em borato de amônio



A amônia está na presença de um corante do ácido bórico (vermelho) que depois fica esverdeado.

3ª FASE DE TITULAÇÃO

A titulação é feita com HCl 0,02N que reage com o borato de amônio, formando o cloreto de amônio que restitui o ácido bórico. Titular o destilado até virar para rosa.



Equipamentos:

- Balança analítica.
- Digestor, com termostato até 350°C.
- Aparelho de destilação semi-micro Kjeldahl.

Reagentes:

- Ácido sulfúrico H_2SO_4 concentrado p.a (capela);
- Ácido clorídrico HCl (0,02N) padronizado;
- Hidróxido de sódio (NaOH) 50% em água;
- Ácido Bórico H_3BO_3 , solução a 2% em água;
- Indicador de Andersen;
- Mistura catalisadora;

Preparo de soluções e reagentes:

Mistura catalisadora: misturar e homogeneizar: 95g de sulfato de potássio (K_2SO_4); 5g de sulfato de cobre ($CuSO_4$).

Hidróxido de sódio a 50% em água: medir em um béquer de plástico aproximadamente 700mL de água destilada com auxílio de uma proveta, pesar 500g de NaOH, pegar uma bacia e colocar água e gelo, colocar o béquer com água destilada, adicionar as lentilhas de NaOH, e lentamente homogeneizar com uma bagueta (bastão de plástico) até dissolver por completo as lentilhas, esperar esfriar e depois transferir a solução para um balão de 1000mL, completar até a marcação do balão com água destilada. ESTOCAR EM FRANCO DE PLÁSTICO. (Efetuar este procedimento na capela, utilizando luvas).

Ácido Bórico solução 2% em água: pesar 20g, dissolver em 800mL de água destilada, homogeneizar bem e logo transferir para um balão de 1000mL e completar até a marcação com água destilada.

Indicador de Andersen:

A: Solução de vermelho de metila: 0,1g em 75mL de álcool etílico p.a 96° GL

B: Solução de metileno: 0,1g em 80mL de álcool etílico p.a 96° GL

Misturar 50mL de (A) em 25mL de (B).

Ácido clorídrico (0,02N), padronizado: Primeiramente prepara-se a solução de ácido clorídrico (0,02N), logo Secar o carbonato de sódio (Na_2CO_3) por 2 horas em mufla a 250°C, pesar (em Erlenmeyer 125ml) cerca de 21,2 mg de Na_2CO_3 e adicionar volumetricamente 20ml de água destilada fervida e fria, adicionar 3 gotas do indicador utilizado na análise de proteína pelo método de Kjeldahl (normalmente é o indicador de Andersen), o líquido ficará da cor verde. Realizar este procedimento por triplicata, Titular (com a solução de ácido clorídrico (HCl) previamente preparado (3,4ml de HCl em 2L de água destilada = 0,02N se for da marca Merck)) até que o líquido vire para a cor rosa. (Encher bem a bureta incluindo a ponta)

Cálculos

O cálculo do por que pesar 21,2 mg de Na_2CO_3

$$N_{Na_2CO_3} \times V = m/Eq \quad \text{onde } Eq = Na_2CO_3 = 53$$

$$0,02 \times 20ml \times 53 = m$$

$$m = 21,2 \text{ mg}$$

Cálculo da verdadeira normalidade do HCl preparado

$$N_{\text{HCl}} \times V = m_{\text{Na}_2\text{CO}_3} / \text{Eq}_{\text{Na}_2\text{CO}_3}$$

$$N_{\text{HCl}} \text{ real} = (m_{\text{Na}_2\text{CO}_3} / \text{Eq}_{\text{Na}_2\text{CO}_3}) / V_{\text{HCl}}$$

Exemplo:

Pesos do Na_2CO_3	Volume gasto do HCL
1) 21,3mg	19,7ml
2) 21,3mg	19,8ml
3) 21,2mg	19,6ml

$$N_{\text{HCl}} \text{ real} = (m_{\text{Na}_2\text{CO}_3} / \text{Eq}_{\text{Na}_2\text{CO}_3}) / V_{\text{HCl}}$$

$$N_{\text{HCl}} \text{ real} = (21,3\text{mg}/53) / 21,3\text{ml}$$

$$1) N_{\text{HCl}} \text{ real} = 0,020400$$

$$2) N_{\text{HCl}} \text{ real} = 0,020297$$

$$3) N_{\text{HCl}} \text{ real} = 0,020408$$

$$\text{Média } N_{\text{HCl}} \text{ real} = 0,020368$$

Lembres-se isto é uma padronização, portanto o desvio padrão das triplicatas deve ser muito baixo (<1%). Se isto não ocorrer, repetir o procedimento.

Cálculo:

$$\% N = \frac{(\text{Vol.HCl amostra}-\text{Vol. HCl branco}) \times 0,014007 \times 100 \times N \text{ HCl}}{\text{Peso amostra}}$$

Peso amostra

Referência Bibliográfica:

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12 ed. Washington, D.C; Horwitz, W. ed. 1975, p. 927-928

Montes, AL. Bromatologia. Tomo 1. Buenos Aires, Ed. Universitária de Buenos Aires. 1966, p. 10

Vogel, A.I. Química analítica quantitativa (A text-book of quantitative inorganic analysis). V. 1 2 ed. Buenos Aires. Ed. Kapelusz 1960, p. 349-351

Williams. P.C. The of titanium dioxide as a catalyst for large scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. J. Scien. Food Agric., 24:343-348, 1973

Pearson, D. Técnicas de laboratório para el análisis de alimentos (Laboratoty techniques in food analysis). Zaragoza, Ed. Acribia. 1976, p. 62-68.

8.3. DETERMINAÇÃO DE AMINOACIDOS SÉRICOS LIVRES

Preparação do eluente A

Em um Becker de 250mL pesar 4,9248g ($\pm 0.0001g$) de acetato de sódio trihidratado a 99,9-100%, transferir para um balão volumétrico de 1000mL; completar o volume com água ultra-pura e homogeneizar; filtrar em filtro Milopore FGLPO 1300 de 0,22 μ m de poro e 13 mm de diâmetro, hidrofóbico, branco, liso, retirar do balão um volume aproximado de 60mL de solução, com auxílio de um Becker de 100mL; adicionar ao balão 60mL de acetonitrila a 99,7-100%, grau HPLC, com auxílio de uma proveta de 100mL; adicionar com microseringa 200 microlitros de EDTA dissódico a 2g/L da marca Vetec [99%] Rio de Janeiro-Brasil; baixar o pH da solução para 6,60, com ácido acético glacial P.A da marca Ecibra [99,7%] São Paulo-Brasil; degassar por 3min., usando agitação magnética e vácuo.

Preparação do eluente B ou padrão interno (ácido α -animo butílico (AAAB))

Em um Becker de 250mL pesar 2,464g ($\pm 0,0001g$) de acetato de sódio trihidratado da marca Synth, [99,9-100%], São Paulo-Brasil; transferir para um balão volumétrico de 500mL, completar o volume com água ultra-pura e homogeneizar; filtrar em filtro de 0,22 μ m; medir, com uma proveta graduada, 400mL desta solução filtrada em poro de 0,22 μ m e transferir para um balão volumétrico de 1000mL; adicionar ao balão 600mL de acetonitrila da marca J.T. Baker [99,7-100%], México DC-Mexico grau HPLC, com auxílio de uma proveta de 1000mL; adicionar, com microseringa, 200 μ L de EDTA dissódico a 2g/L; baixar o pH da solução para 6,60, com ácido acético glacial; Degassar, usando agitação magnética e vácuo.

Amostras de plasma, soro e sangue:

- Pesar 200 μ L da amostra homogeneizada no agitador em um tubo tipo Eppendorf de 1,5mL, adicionar com microseringa 50 μ L do padrão B.
- Adicionar 250 μ L de metanol 99%, agitar em vortex por 10 segundos, em seguida centrifugar a 5438G (8000rpm) por 15min.
- Filtrar o sobrenadante em membrana de 0,22 μ m, tomar uma alíquota de 40 μ L do filtrado com microseringa e transferir para um tubo de vidro de 6X50 mm, a fim de proceder a derivatização.

- Colocar o tubo no vial de secagem e secar a amostra na estação de vácuo, até 70 militorr.
- Remover o tubo do vial de secagem e adicionar com microseringa aproximadamente 20uL de solução de re-secagem (solução de trioetilamida) e homogeneizar em vortex por 15 segundos e secar novamente a amostra como descrito na etapa acima.
- Remover o tubo do vial de secagem e adicionar aproximadamente 20uL de solução derivatizante com PITC (reativo de Ellman).
- Repetir o procedimento de agitação no vortex, deixar em repouso por 20 minutos.
- Após o repouso, com o tubo dentro do vial, proceder novamente à secagem. No final desta fase o tubo deverá estar com cristais brancos, não oleosos.
- Medir, com uma microseringa com precisão de 5 uL, 500uL do diluente (fosfato de sódio bi-básico heptahidratado P.A., da marca Synth [98,0-102%], São Paulo-Brasil e transferir para o tubo contendo amostra seca e derivatizada.
- Vedar o tubo com três camadas de teflon e deixar no ultra-som por 10min. Homogeneizar o conteúdo em um vortex por 30 segundos.
- Transferir para um Eppendorf de 0,5mL e centrifugar por 2min. a 8000rpm, transferir para o vial de injeção com uma pipeta descartável.
- Injetar a amostra no analisador de aa (cromatografo) da marca Pickering laboratories modelo PC x 3100 post column Califórnia-USA, previamente condicionado. As amostras nesta última fase são estáveis por 48 horas.

Condições do cromatografo:

Detector: comprimento de onda em 254nm

Temperatura: na coluna 55°C.

Condições da Bomba (Tabela 1):

Tabela 1. Condições da bomba do cromatografo

Gradiente **Fluxo = 1,00mL/ min.**

Tempo	% A	% B
0,00	100,00	0
5,00	95,00	5,00
10,00	77,5	22,50
11,80	68,00	32,00
20,00	40,00	60,00
23,00	0,00	100,00
28,00	0,00	100,00
28,10	100,00	0,00
31	100,00	0,00

(White; Hart; Fry, 1986; Hagen; Frost; Augustin, 1989)

8.4. ELETROFORESES EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS-TRICINA PARA SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DE BAIXO PESO MOLECULAR- método 02/ 2002

Introdução:

A eletroforese SDS-PAGE em sistema descontínuo utilizando tricina como íon carregador, permite a resolução de pequenas proteínas a concentrações de acrilamida menores do que em sistema SDS-PAGE com glicina.

Neste sistema, além, da tricina substituir a glicina no tampão de corrida, são empregados três géis (gel de separação, gel espaçador e gel de empilhamento) e não dois como no procedimento para sistema SDS-PAGE. A resolução superior das proteínas, essencialmente na faixa de 5 a 20 kDa pode ser omitido do procedimento se a resolução de pequenos peptídeos, abaixo de 5 kDa, não for de interesse.

Materiais:

Equipamentos:

Sistema Mini-Protean II com fonte da Bio Rad

Materiais:

Beckers de 150mL

Microseringas

Pipetas

Preparo de reagentes

Solução A: Anode Buffer

0,2 de Tris (pH 8,9)- utilizar na cuba inferior

Pesar 12,11g de Tris-Base. Adicionar 400mL e agitar até completa dissolução. Acerta o pH para 8,9 com HCl de 6N e completar para 500 mL com água destilada. Este tampão não deve ser reutilizado e deve ser armazenado por no máximo 5 dias em refrigerador. Utiliza-se cerca de 250mL em cada corrida.

Solução B: Cathode Buffer

0,1M de Tris; 0,1M de Tricina; 0,1% de SDS (pH 8,25)-utilizar na cuba superior

Pesar 6,05g de TRiS-Base, 8,96g de Tricina e 0,5g de SDS. Adicionar 400mL e agitar até completa dissolução. Verificar o pH que deve ser muito próximo de 8,25 e completar o volume para 500mL. Nunca acertar o pH com ácido ou base. Este tampão não deve se reutilizado e deve ser armazenada por no máximo 5 dias em refrigerador. Utiliza-se cerca de 150mL em cada corrida.

Solução C: Gel Buffer**3M de Tris, 0.3% de SDS (pH 8.45)**

Pesar 36,34g de Tris; 0,3g de SDS, dissolver em 80mL de água destilada, acertar o pH para 8,45 com HCL 6N e completar o volume para 100mL. Armazenar em refrigerador.

Solução D: Solução acrilamida/ bis-acrilamida (49.5% T; 3% C)

Pesar 48g de acrilamida e 1,5g de bis-acrilamida, dissolver e completar o volume para 100mL. Filtrar em papel de filtro comum e armazenar sob refrigeração.

Solução E: Solução acrilamida/ bis-acrilamida (49.5% T; 6% C)

Pesar 46,5g de acrilamida e 3,0g de bis-acrilamida, dissolver e completar o volume para 100mL. Filtrar em papel de filtro comum e armazenar sob refrigeração.

Cuidado no preparo deste reagente, pois é neurotóxico

Solução F: Solução de Persulfato de amônia 10%

Pesar 1g de persulfato e dissolver 10mL de água destilada. Armazenar congelado.

Solução G: Tampão da amostra

Tampão redutor com SDS: 62,5 mM Tris-HCL, 20% de glicerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol (pH 6,8)

Água destilada	3,4mL
0.5 M tris-HCl, pH 6.8	1,0mL
Glicerol	1,6mL
SDS 10%	1,6mL
β -mercaptoetanol	0,4mL
Comassie Blue G250 (pitada)	
Volume total	8.0mL

Preparo da amostra (preparar apenas 1 mL)

As amostras devem ser diluídas em tampão de amostra (solução G) em concentração entre 1 e 2 % de proteína ou mais. Esse valor vai depender da amostra analisada. Aquecer em banho-maria a 40°C por 30 minutos. Armazenar as amostras preparadas congeladas.

Preparação dos géis (preparar sempre os géis com 1.5 mm de espessura)

Neste procedimento são utilizados 3 géis:

Gel inferior (de separação) com 4 cm de altura

Gel espaçador (10%T, 3%C) com 1 cm de altura

Gel superior (empilhamento) com 0,5 cm de altura

Tabela 1: volumes para preparação dos géis com 1,5mm de espessura

	Gel superior 4%T,3%C	Gel espaçador 10%T,3%C	Géis de Separação			
			10%T 3%C	16.5%T 3%C	16.5%T 6%C	16.5%T 6%C com 6M uréia
Sol.49.5%T, 3%C	0.3mL	1.6mL	1.6mL	5.0mL		
Sol.49.5%T,6%C					5.0mL	5.0mL
Gel Buffer	1.1mL	2.5mL	2.5mL	5.0mL	5.0mL	5.0mL
Glicerol			0.8mL	1.5mL	1.5mL	
Uréia						5.4g
Água destilada	2.8mL					
TEMED	5µL	5µL	5µL	5µL	5µL	5µL
Pres. de Amônia 10%	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL

5.1. Procedimento para preparo dos géis:

1. Passar graxa na borracha cinza e nos espaçadores (1,5mm)
2. Montar placa maior e menor com espaçadores.
3. Acoplar as placas ao suporte de acrílico transparente para preparo dos géis.
4. Preparar o gel inferior e aplicar nas placas.
5. Colocar água ou álcool isopropílico imediatamente após a aplicação do gel inferior para que o gel fique bem reto. Esperar polimerizar por 30 minutos.

6. Secar a água ou álcool e aplicar o gel espaçador. Esperar polimerizar por 30 minutos. Secar.
7. Aplicar o gel superior.
8. Esperar polimerizar (30 minutos)
9. Acoplar as placas no eletrodo, colocar tampão de corrida. São 2 Tampões diferentes.
10. Aplicar as amostras (20 μ L) e colocar para correr.

*** Nesse sistema com 3 géis utiliza-se 85 V fixo, o que dá cerca de 110 mA e 7W de potência. Pode ocorrer aquecimento do sistema de eletroforese.***

Observações pertinentes ao método

A resolução de peptídeos, pela metodologia descrita por SCHAGGER e JAGOW (1987), não é fácil, principalmente quando os peptídeos se encontram na faixa de 2000 a 6000 Da. O que a prática tem mostrado é que, para cada amostra de hidrolisado serão necessários ensaios preliminares para definir as condições ideais para cada amostra. Normalmente utilizamos géis de resolução com (16,5%T, 3%C), aplicamos 20 μ L de padrão (de 1.060 a 2.6600 que apresenta apenas 5 bandas nesse sistema, perdendo a última banda de 1.060 Da ou padrão de 2.512 a 16.949 Da que apresenta todas as 6 banda nesse sistema)

Amostras de hidrolisado bovino, de frango de peru, de soja, de trigo (2% de proteína) apresentaram boa resolução em gel (16,5%T; 3%C) com 1.5mm de espessura, utilizando o método 1 para corar os géis.

Hidrolisado de gelatina (2% de proteína) foram resolvidos em gel com 1,5mm de espessura, gel de resolução (14%T; 4%C), utilizando o método 2 para corar os géis.

Referências:

CLAEYS, E.; DE SMET, S.; BALCAEN, A.; RAES, K.; DEMEYER D. Quantification of freshmeat peptides by SDS-PAGE in relation to ageing time and taste intensity. **Meat Science**, 67, p. 281-288, Oxon, England, 2004.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, Vol 166, p368-379, San Diego, Califórnia, 1987.

8.5. PROTOCOLO UTILIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE POR TNBS (EM BASE AO ARTIGO ORIGINAL)

ADLER-NISSEN, J.; Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid; **J.Agric.Food Chem.**, Vol. 27 N^o6, 1979.

Proteínas hidrolisadas enzimaticamente possuem propriedades funcionais, como: baixa viscosidade maior habilidade de emulsificação e alta solubilidade, sendo estas vantagens para uso em alimentos.

Para obter desejáveis propriedades organolépticas e funcionais de hidrolisados da proteína da soja, deve ser controlado o grau de hidrólise (GH).

O grau de hidrólise é definido como a percentagem de ligações peptídicas clivadas. O TNBS determina a concentração de grupos amino primários.

Basicamente este método é um ensaio espectrométrico que forma um cromóforo pela reação do TNBS com aminas primárias. Esta reação ocorre sob condições alcalinas é interrompida abaixando o pH.

CONSIDERAÇÕES

- Dodecil sulfato de sódio (SDS) é utilizado como agente desnaturante.
- Mercaptoetanol para prevenir a agregação das proteínas que é excluída com a reação deste reagente com o TNBS.
- Tampão utilizado com o TNBS e o bicarbonato de sódio (pH 8,5), mas este forma CO₂ durante a acidificação.
- Borato não é recomendável na presença de açúcar, ao passo que o fosfato é recomendável, pois ele permite a escolha de um pH menos alcalino do que frequentemente é utilizado.
- Tempo de reação de 1 hora foi considerado ótimo para o procedimento.

CONDIÇÕES DURANTE A REAÇÃO

Concentração do tampão = 0,10M

Concentração de TNBS = $1,43 \times 10^{-3}$ M

Concentração da Leucina = $0,008 \times 10^{-3}$ M

pH = 8,2

Temperatura = 50°C

pH após adição de HCL é 3,7-3,9

pH abaixo de 3,5 causa turbidez

PARTE EXPERIMENTAL

1. HCl 0,1M
2. TNBS – Acido tinitrobenzenosulfônico dihidratado p.a.
3. SDS – Dodecil sulfato de sódio p.a.
4. Padrão Leucina
5. Tampão fosfato 0,2125M

[NaH_2PO_4 0,2125M + Na_2HPO_4 0,2125M até pH $8,20 \pm 0,02$ (proporção de volumes é aproximadamente 43:1000)]

SOLUÇÃO DE TNBS 0,1%

O TNBS é dissolvido em água deionizada em balão volumétrico (100 ou 150ml), envolvido com papel alumínio.

OBS: a solução deve ser preparada imediatamente antes do uso.

HCl 0,1N

SDS 1%

1.500 mM de padrão leucina em SDS 1%

As reações do branco e da solução padrão serão realizados recolocando na amostra SDS 1% e $1,500 \times 10^{-3}\text{M}$ (1,5mM) de L-leucina em 1% SDS, respectivamente. A absorbância do branco e do padrão será pela média de 6 determinações individuais.

As condições durante a reação foram as seguintes:

- Concentração tampão: 0,10M
- Concentração TNBS: $1,43 \times 10^{-3}\text{M}$
- Concentração leucina: $0,088 \times 10^{-3}$
- pH: 8,2
- Temperatura: 50°C
- pH depois da adição de HCl 3,7-3,9; um pH abaixo 3,5 poderá causar turbidez

REAÇÃO DO TNBS

250mL de amostra, contendo entre $0,25 \times 10^{-3}$ e $2,5 \times 10^{-3}$ amino eqiv/L



Misturar no tubo com 2,00 mL de tampão fosfato a pH 8,2



2mL de solução de TNBS 0,10%



Agitar o tubo, e colocar em banho-maria a $50 \pm 1^\circ\text{C}$ por 60 min.

OBS: Durante a incubação o tubo deve estar envolvido em papel alumínio, para evitar a aceleração da reação por exposição à luz.



Acrescentar 4,0mL de HCl 0,100N para finalizar a reação



Resfriar a temperatura ambiente por 30 min (resfriamento abaixo da temperatura ambiente pode causar turbidez devido à presença de SDS).

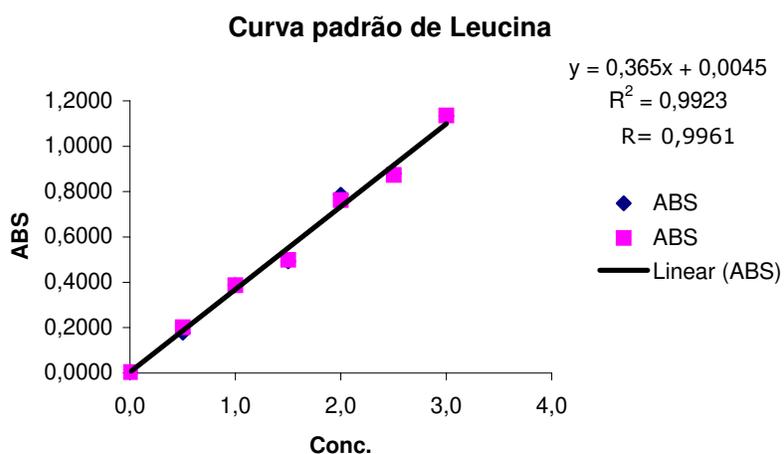


Fazer a leitura a 340nm, utilizando água como branco



A reação pode ser considerada de 1ª ordem com relação à o grupo amino.

CURVA PADRÃO DE LEUCINA



Conc.	ABS	ABS
0,0	0,0046	0,0046
0,5	0,1784	0,2022
1,0	0,3875	0,3866
1,5	0,4914	0,4994
2,0	0,7861	0,7624
2,5	0,8805	0,8735
3,0	1,1330	1,1350

1 a 4 a = 20mg hidrolisado
 1 a 4 b = 30mg hidrolisado

amostra	mg	mg/ml	%proteína	proteína bruta
1a	20,1	0,4020	83,79	0,3368
1b	30,0	0,6000	83,79	0,5027
2a	20,3	0,4060	84,16	0,3417
2b	30,2	0,6040	84,16	0,5083
3a	20,0	0,4000	84,15	0,3366
3b	30,0	0,6000	84,15	0,5049
4a	20,1	0,4020	84,32	0,3390
4b	30,1	0,6020	84,32	0,5076

$y=0,365x+0,0045$

Amostra	Ptn bruta mg/ml*%ptn	Abs	conc. NH2 eqv Abs-0,0045/0,365	NH2/mg [Nh2]*1000/ptn b	NH2/g NH2/mg/1000	GH (NH2/g/8.8)*100	Média
1a	0,337	0,119	0,315	933,850	0,934	10,612	
1a	0,337	0,116	0,305	905,379	0,905	10,288	10,450
1b	0,503	0,191	0,510	1014,249	1,014	11,526	
1b	0,503	0,181	0,485	964,109	0,964	10,956	11,241
2a	0,342	0,118	0,310	907,629	0,908	10,314	
2a	0,342	0,118	0,310	906,828	0,907	10,305	10,309
2b	0,508	0,183	0,489	962,111	0,962	10,933	
2b	0,508	0,187	0,501	985,827	0,986	11,203	11,068
3a	0,337	0,117	0,308	916,498	0,916	10,415	
3a	0,337	0,115	0,303	899,405	0,899	10,221	10,318
3b	0,505	0,173	0,461	913,242	0,913	10,378	
3b	0,505	0,186	0,498	986,497	0,986	11,210	10,794
4a	0,339	0,116	0,307	904,352	0,904	10,277	
4a	0,339	0,122	0,323	952,843	0,953	10,828	10,552
4b	0,508	0,195	0,522	1027,667	1,028	11,678	
4b	0,508	0,188	0,504	992,044	0,992	11,273	11,476
							10,776

Bibliografía:

ADLER-NISSEN, J.; Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid; **J.Agric.Food Chem.**, Vol. 27 N°6, 1979.

8.6. LIPÍDEOS X MÉTODO DE BLIGH DYER

Princípio:

Neste método, a amostra é homogeneizada com uma mistura de clorofórmio (dissolve os lipídeos polares e apolares) e metanol (destrói as associações lipídeos - proteínas liberando os lipídeos, em proporção tal que um sistema miscível (monofásico) é formado com água da amostra. Este sistema de solvente já tinha sido utilizado por Folch et alli (1951), mas o método empregava volumes grandes e inconvenientes de solventes, tornando-se pouco práticos. Uma diluição e nova extração posterior com volumes determinados de clorofórmio e água separam o sistema monofásico em duas camadas, formando um sistema bifásico: camada cloroformica mais pesada, contendo os lipídeos, e camada metanólica contendo água e os compostos não-lipídicos. Desta forma, é obtido um extrato lipídico purificado quando a camada cloroformica é isolada. O método permite muita flexibilidade de procedimento, mas é imperativo que as proporções entre os volumes clorofórmio: metanol: água seja 1:2: 0,8 e 2:2: 1,8 antes e depois da diluição respectivamente. Este método apresenta vantagens marcantes sobre a maioria dos métodos existentes de extração e purificação de lipídeos.

- a) Todas as classes de lipídeos são extraídas, polares e apolares, pois o clorofórmio é um solvente orgânico para qualquer classe de lipídeo, e o metanol tem função dupla de facilitar o embebedimento da amostra e desfazer as ligações lipídeo-proteína (Lovern, 1965);
- b) A extração é realizada sem aquecimento, podendo os lipídeos extraídos ser utilizados para qualquer tipo de determinação, sem alterações químicas e físicas;
- c) O método independe da umidade da amostra;

Procedimento:

- 1- Tarar a quantidade de béquers necessários para a análise (nº tubos = nº béquer);
- 2- Pesar entre 2,0 e 2,5g (amostras com teor de gordura acima de 20%) ou 3,0-3,5g (amostras com teor de gordura abaixo de 20%) de amostra finamente moída e homogeneizada
- 3- Transferir para o tubo de 70mL;
- 4- Adicionar lentamente e exatamente 10mL de clorofórmio, + 20mL de metanol (álcool metílico) + 8mL de água destilada. (Usar a pêra para pipetar ou proveta);
- 5- Fechar e vedar os tubos (usar veda rosca);

- 6- Agitar no agitador rotativo por 30 min;
 - 7- Adicionar exatamente 10mL de clorofórmio + 10mL de solução de sódio 1,5%;
 - 8- Agitar vigorosamente por 2 min;
 - 9- Deixar separar as camadas naturalmente ou centrifugar a 1000 rpm por 2 min;
 - 10- Succionar a camada metanólica superior e armazenar como resíduo;
- (*)
- 11- Em um béquer filtrar a camada inferior (pode ser adicionada 1g de Na_2SO_3) em papel de filtro quantitativo (a solução deve ficar límpida);
 - 12- Medir exatamente 5mL do filtrado e transferir para 1 béquer de 50mL previamente tarado, (O que ficar sobrando descartar como resíduo);
 - 13- Evaporar o excesso de solvente em uma chapa de aquecimento e colocar nas estufas a 100°C, por 1 hora, esfriar em dessecador e pesar;

Equipamentos:

- Tubo pirex 250 x 25 mm com tampa de rosca, com teflon ou PVC de 70 cm;
- Agitador rotativo para tubos;
- Chapa de aquecimento;
- Estufa á 100°C;
- Centrifuga em 1000 rpm;
- Balança semi-analitica com precisão de 0,01g;
- Béquer;
- Veda rosca;
- Marcador;
- Funis;
- Papel filtro;

Reagentes:

- Clorofórmio P.A.
- Metanol p.a (álcool metílico)
- Sulfato de sódio (Na_2SO_4) p.a.
- Sulfato de sódio, solução a 1,5% em água. (reagente a ser preparado)

Preparo da solução de: Sulfato de sódio (Na_2SO_4)

- Pesar 1,5g de sulfato de sódio em balança analítica (utilizar um béquer);
- Dissolver com auxílio de uma bagueta (bastão de vidro) com água destilada;
- Transferir a solução para um balão volumétrico de 1000mL;
- Completar o volume, homogeneizar a solução;
- Transferir para um frasco de vidro escuro e etiquetar;

Cálculo:

$$\% \text{ lipídeos totais} = \frac{\text{m resíduo (lipídeos)} \times 4 \times 100}{\text{m da amostra (g)}}$$

(*) PROCEDIMENTO PARA DESCARTE DO RESÍDUO.

Armazenar em um frasco de vidro separando, o metanol e o clorofórmio para posterior queima. Rotular com etiqueta de Resíduo de FEA.

Referência Bibliográfica:

- Bligh, E.G.; Dyer, W.J., A rapid method of total lipid extraction and purification. Can, J. Biochem. Physiol. 37:911-917, 1959
- Folch, J.; Ascoli, I.; Lees, M., Meath, J.A.; Lebaron, F.N., Preparation os lipid extracts from brain tissue. J. Biol. Chem. 191:883-841, 1951
- Lovern, J.A.–Some analytical problems is the analysus of fish and fish products. J.A.O.A.C. 48:60-68, 1965.

8.7. DETERMINAÇÃO DE GORDURA POR MOJONNIER (MÉTODO PARA O LEITE E DERIVADOS AOAC)

- Pesar 2g da amostra e transferir para frasco Erlenmeyer com tampa esmerilhada.
- Adicionar 2 mL de etanol P.A. da marca QM, pureza 99,7%, São Paulo-Brasil, e agitar de maneira a umedecer todas as partículas da amostra, formando uma pasta.
- Adicionar 10 mL da solução de HCl 70%, tampar e agitar vigorosamente.
- Levar o frasco para banho-maria a 100°C por 45-50 min., agitando ocasionalmente a cada 15 min.
- Remover o frasco do banho-maria e deixar esfriar a temperatura ambiente.
- Adicionar 10 mL de etanol P.A. e agitar vigorosamente.
- Adicionar 30 mL da solução de éter etílico, tampar e agitar vigorosamente durante 30 segundos.
- Remover cuidadosamente a tampa e deixar os vapores saírem.
- Transferir para tubos de centrífuga e centrifugar por 2 min, a 1600 rpm.
- Transferir o sobrenadante para um frasco Erlenmeyer de 250 mL previamente seco e tarado.
- Repetir três vezes mais a partir do 6º item, usando 5 mL de etanol e 20 mL da solução de éter ou até não se observar mais gordura na amostra.
- Evaporar a mistura de ésteres em banho-maria e levar o frasco Erlenmeyer à estufa a 105°C por 2 horas ou até peso constante.
- Esfriar em dessecador e pesar.

$$\text{Cálculo: Extrato etéreo em \%} = \frac{A-B}{C} \times 100$$

Onde A = Peso do recipiente+ resíduo em grama

B = Peso do recipiente em grama

C = Peso da amostra em grama

Referências bibliográficas:

Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal; **Manual de procedimentos analíticos** Extrato Etéreo (hidrólise ácida) método N° 52, 2005

8.8. SÓLIDOS TOTAIS E UMI DADE

Introdução:

O teor de água presente em qualquer alimento é importante sob vários aspectos. É uma das determinações de difícil execução, visto que os métodos usuais para a sua quantificação envolvem a destilação de água presente no alimento e com isto, outros compostos voláteis também são evaporados. Em função da temperatura a que é submetida à amostra para evaporação da água pode haver caramelização de compostos tipo açúcares, além da degradação de outros componentes.

Na determinação do teor de água de um produto alimentício o termo umidade refere-se à somatória da água volatilizada nas condições do método analítico e dos demais componentes também volatilizados ou decompostos com a temperatura do ensaio.

Princípio:

Fundamenta-se na evaporação da água presente no alimento e pesagem do resíduo não volatilizado. O teor da umidade é definido pela mudança de peso da amostra, determinado sob certas condições de temperatura e pressão. As condições mais indicadas de secagem são: O aquecimento +/- 100°C por 24h ou a 70°C com circulação de ar ou a vácuo, respectivamente, o que permite uma segurança razoável entre o espaço de tempo em que a análise é feita e uma grande aproximação do teor de umidade.

Procedimento:

1- Secar previamente as cápsulas de alumínio ou placas de petri, em estufa a +/- 105°C contendo areia tratada (quando a amostra for muito úmida) por +/- 3 a 4 horas;

2- Retirar a cápsula da estufa, colocar no dessecador, com sílica gel, e deixar esfriar, por +/- 1 hora;

3- Amostra: pipetar 10mL ou pesar 10g de amostra em cápsula ou placa tarada;

Amostra com pouco teor de água: pesar analiticamente 5g de amostra em cápsula ou placa tarada;

Recolocar a placa na estufa a +/-105°C durante 24 horas ou overnight; retirá-la e colocá-la no dessecador;

4- Depois de fria, pesar a placa novamente;

5- Repetir a operação até o peso constante.

Equipamentos:

- balança analítica com precisão de 0,1mg
- estufa a +o/- 105°C ou a 70°C a vácuo

Exemplo:

Amostra	m cadinho	m amostra	m cadinho + amostra
1A	15,9181	0,9786	16,8967
1B	22,1380	0,9961	23,1341

Após estufa:

Amostra	m cadinho + amostra	m resíduo
1A	16,8384	0,9203 (m cad+amostra após - m cad)
1B	23,0806	0,9426 (m cad+amostra após - m cad)

Cálculo:

$$\% \text{ Sólidos totais} = \frac{\text{m do resíduo (g)} \times 100\text{g}}{\text{m de amostra (g)}}$$

$$1A \ \% \text{ Sólidos totais} = \frac{0,9203 \times 100}{0,9786} = 94,04\%$$

$$1B \ \% \text{ Sólidos Totais} = \frac{0,9426 \times 100}{0,9961} = 94,63\%$$

Amostra 1 % Sólidos totais média = 94,34%

UMIDADE

A partir do cálculo da porcentagem de sólidos totais da amostra torna-se de extrema facilidade a determinação da porcentagem de umidade na amostra, utilizando a fórmula abaixo descrita:

Cálculo:

$$\% \text{ umidade} = 100 - \% \text{ sólidos totais}$$

Referência Bibliográfica:

Horwitz, W. (ed) – Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists – AOAC. Washington, D.C, 12 ed., 1094p; 1975 (Metodo AOAC de referencia 15010).

8.9. DETERMINAÇÃO DE CINZAS

Princípios gerais do método:

Cinza é um termo analítico equivalente ao resíduo inorgânico após calcinação da matéria orgânica de uma amostra. As cinzas geralmente não são as mesmas substâncias inorgânicas presentes na amostra original, devido às perdas por volatilização ou interações químicas entre seus constituintes. A determinação de cinzas fornece uma indicação da riqueza da amostra em elementos minerais.

Reagentes:

Nitrato de amônio NH_4NO_3 (se necessário)

Equipamentos:

- Cadinhos de porcelana
- Bico de Bunsen
- Forno de Mufla com termostato

Procedimento:

- 1- Colocar os cadinhos de porcelana na mufla por um dia para tarar;
- 2- Após tirar da mufla, colocar em dessecador, para esfriar, e pesar;
- 3- Pesar, de 3 a 5g de amostra direto no cadinho de porcelana (amostra com alto teor de umidade deve-se secar);
- 4- Carbonizar a amostra na chama de um bico de Bunsen, de forma suave, até cessar o desprendimento de fumaça;
- 5- Colocar os cadinhos contendo as amostras carbonizadas no forno de mufla, deixando a temperatura elevar-se lentamente até 550°C a 600°C e calcinando-se até a obtenção das cinzas claras (2-3 horas; se passado este tempo, as cinzas não ficarem claras, mexe-se as cinzas cuidadosamente, com um bastão de vidro com alça ou ponta fina de platina e, após esfriar, adiciona-se cristais de nitrato de amônio, levando-se o cadinho ao forno de platina e, após esfriar, adiciona-se cristais de nitrato de amônio, levando-se o cadinho ao forno por mais uma hora);
- 6- Esfriar os cadinhos contendo as cinzas em dessecador e pesar.

Cálculos:

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{\text{m amostra} + \text{cadinho(g)} - \text{m do cadinho (g)}}{\text{m da amostra (g)}} \times 100$$

Referência Bibliográfica:

LEES, R. Manual de análisis de alimentos (Laboratory Handbook of methods of food analysis) – Zaragoza. Ed, Acribia. 1979, p. 17, 124-125

PEARSON, D. Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos (Laboratory techniques in food analysis). Zaragoza, Ed. Acribia. 1976, p. 68-69.

8.10. DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR (gastrocnêmio e sóleo)

Reagentes:

- 1) Solução de hidróxido de potássio a 30% (KOH) saturada com sulfato de sódio. Grão de KOH (300g, nº 73201 Merck, grau de reagentes) dissolvidos em água destilada com sulfato de sódio (Fisher no. S-421 anidro, certificado ACS).
- 2) Álcool etanol 95%
- 3) Fenol 5%. Cristais de fenol (250g, Mallincrodt nº 9928, grau reagente) foram dissolvidos em água destilada até completar 5 litros.
- 4) Ácido sulfúrico 96-98% (Fischer nº. A-300, grau reagente)
- 5) Soluções de glicogênio padrão. Pó de glicogênio (25mg, Fischer no. G-47, reagente químico) dissolvido em água até completar 5mL, isto forneceu uma concentração de glicogênio de 5mg/mL.

Soluções menos concentradas de glicogênio foram preparadas por diluição volumétrica desta solução "estoque".

Procedimentos:

1. Os órgãos (fígado e músculo) foram retirados do nitrogênio líquido, mantidos em gelo e pesados em balança semi-analítica. Foram alíquota das amostras de aproximadamente 35 mg de músculo gastrocnêmio, 20 mg de músculo sóleo e 15 mg de fígado, transferidas para tubos de ensaio mantidos em gelo, contendo 0,5 mL de solução de KOH 30% saturada com sulfato de sódio e observando-se que o tecido estivesse completamente imerso na solução.
2. Os tubos foram tampados e colocados em banho com água fervente por 20-30 min, até que uma solução homogênea fosse obtida.
3. Os tubos foram então removidos e resfriados em gelo.
4. No gelo adicionou-se 0,6 mL de etanol 95%, precipitando o glicogênio do digerido alcalino, permaneceram durante 30 min.
5. Após pós esse período os tubos foram centrifugadas a 765xG por 30 min e os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados.
6. Os precipitados de glicogênio foram dissolvidos em 3 ml de água destilada.

7. Duas alíquotas de 1 mL da solução aquosa de glicogênio foram transferidas para tubos de ensaio.
8. Adicionou-se 0,5 mL de fenol a 5% às alíquotas e, em seguida, 2,5 mL de H₂SO₄ a 96-98% foram adicionados rapidamente e diretamente na superfície do líquido.
9. Os tubos foram agitados e deixados em banho de água a temperatura ambiente por 10 min. Depois foram agitados de novo ante de fazer as leituras.
10. Foram feitas as leituras de absorbância das amostras a 490nm em espectrofotômetro Beckman DU70.
11. O tubo branco foi preparado utilizando-se 1mL de água destilada ao invés de solução de glicogênio.

CURVA PADRÃO

Padronização respeitando os princípios de Lo et al. (1970), porém visando minimizar resíduos de fenol, foram diminuídas as quantidades utilizadas dos reagentes.

Solução mãe:

250mg de glicose em 50ml de água ultra pura.

Soluções filhas:

- 1) P100 = 25 µl solução mãe + 5mL de água destilada.
- 2) P200 = 50µl solução mãe + 5 mL de água destilada.
- 3) P300 = 75µl solução mãe + 5 mL de água destilada.
- 4) P400 = 100µl solução mãe + 5mL de água destilada.
- 5) P600 = 150µl solução mãe + 5mL de água destilada.

Agitar em agitador mecânico.

Passar 1mL de cada amostra para outro tubo, fazendo duplicata.

Adicionar 50µl de solução de fenol + 2,5mL de ácido sulfúrico (concentrado), colocando pela borda, porém rapidamente.

Agitar em agitador mecânico.

Digerir em banho-maria por 10 minutos, a 50°C.

Agitar em agitador mecânico novamente.

Ler no espectrofotômetro.

Padronização respeitando os princípios de Lo et al. (1970), sendo mantidas as quantidades utilizadas dos reagentes.

Referência Bibliográfica:

Lo SL, Russell JC, Taylor AW. **Determination of Glycogen in Small Tissue Samples.** Journal of applied Physiology, 28(2): 234-236, 1970.

8.11. MÉTODO PARA DETERMINAR ALANI NA AMI NOTRANSFERASE

CAT Nº 06600
Somente para
Uso in Vitro

GPT (ALT) Método Cinético – UV LIQUID STABLE



DEFINIÇÃO

O teste é feito para identificar a enzima ALT anteriormente chamada de Transaminase Glutâmico Pirúvica, encontrada no fígado. Ela está presente em pequenas quantidades nos rins, coração e tecidos do músculo esquelético. Está intimamente ligada a outra Transferase, a Aspartato Amino Transferase (AST), também conhecida como Transaminase Glutâmico Oxalacética.

FISIOPATOLOGIA

Dano químico do fígado (drogas e álcool) ou hepatite aguda provocam altos níveis de ALT.

ALT é freqüentemente comparada com AST no diagnóstico das condições hepáticas. Por exemplo, ALT tende a aumentar mais cedo na hepatite enquanto que a AST é usada no diagnóstico de danos cardíacos, pequenos aumentos são observados em insuficiência cardíaca e em intoxicação alcoólica.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Valores elevados - Câncer no fígado, hepatite, danos ao fígado por drogas e outras intoxicações químicas e pancreatite aguda.
Valores baixos - exercícios físicos rigorosos, aspirina.

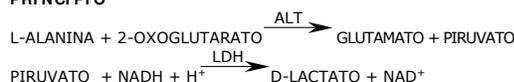
INTERFERÊNCIAS

Falsos valores elevados - antibióticos, narcóticos tais como, meperidina, morfina e codeína, e anti-hipertensivos.

MÉTODO

Teste UV otimizado de acordo com IFCC (Federação Internacional de Química Clínica).

PRINCÍPIO



LINEARIDADE E ESTABILIDADE DA REAÇÃO

A reação é linear até ? A/minuto = 0,200 a 340 nm. Para valores superiores, repetir a reação com amostra diluída em solução fisiológica 1:5 ou 1:10, multiplicando o resultado final por 5 ou 10 respectivamente.

COMPOSIÇÃO DO KIT

Reativo Tampão CAT Nº 06601
Rvo. Tampão 5 x 20 mL, Pronto para uso

Reativo Enzimático CAT Nº 06602

1 x 25 mL, Pronto para uso

Composição do mono-reagente:

Tris , pH 7,8	100 mmol/L
L-Alanina	500 mmol/L
LDH	> 1200 U/L
2-Oxoglutarato	15 mmol/L
NADH	0.18 mmol/L

MATERIAL NÃO FORNECIDO (NECESSÁRIO)

Espectrofotômetro com:

Sensibilidade a 340 nm = 0,00 1 A

Banda de passagem ≤ 10 nm

Luz estranha ≤ 0,5%

Espessura da cubeta = 1,00 cm

Temperatura termostatizada entre ± 0,2°C.

Micropipetas e pipetas com a capacidade indicada na técnica. Banho-maria com a temperatura indicada na técnica.

Cronômetro

VIDA ÚTIL E ARMAZENAMENTO

O kit é estável até a data do seu vencimento impressa na caixa, quando mantido refrigerado.

O Reativo único de Trabalho (mono-reagente) é estável, após sua preparação, por 2 semanas refrigerado.

PRECAUÇÕES

O kit não contém derivados de sangue humano, porém, considerar qualquer amostra de paciente como potencialmente infectante. Evitar a contato direto com as amostras. Não pipetar reagentes ou amostras com a boca.

Descartar as sobras das reações de acordo com as Boas Práticas de Laboratório em local próprio para materiais potencialmente infectantes.

AMOSTRA

Soro obtido da maneira usual, livre de hemólise. É estável 3 dias refrigerado. NAO CONGELAR.

Amostras de soro com concentração de cetó-ácidos endógenos elevados produzem valores falsamente elevados, enquanto que as provenientes de pacientes hemodializados ou com hipovitaminose, ou outras patologias associadas com deficiência de piridoxal fosfato, produzem valores falsamente diminuídos.

TÉCNICA

O DGKC recomenda a temperatura de 25°C, o Comitê de Enzimas da SSCC 37°C e a IFCC sugere 30°C.

PREPARAÇÃO DO REAGENTE DE TRABALHO

Misture 1 frasco do Rvo. Tampão (20 mL) com 5 mL do Rvo. Enzimático ou para quantidades menores, 4 partes de Rvo. Tampão + 1 parte de Rvo. Enzimático = Mono-reagente

Estabilidade: 2 semanas a 2º-8°C.
2 dias a 15º-25°C.

Proteja o mono-reagente da luz!

Os reagentes contêm Azida Sódica conservante. Não ingerir e evitar contato com a pele e mucosas.

O Reativo único de Trabalho (mono-reagente) a 340 nm com o Espectrofotômetro zerado com água deionizada, deverá estar entre 0,800 e 1,800A. Leituras inferiores indicam deterioração do Reativo.

PROCEDIMENTO PARA O TESTE

Comprimento de onda: 340 nm
Caminho óptico: 1 cm.
Temperatura: 25º, 30º, 37ºC.

Temperatura	25°C	30°C ou 37°C
Amostra	200 ? L	100 ? L
Mono-reagente	1000 ? L	1000 ? L

Misturar, ler a absorbância após 1 min, e iniciar o cronômetro. Ler absorbâncias novamente após 1, 2 e 3 min. Calcular as diferenças de absorbância por minuto (? A/minuto).

CÁLCULO

Multiplicar o ? A/minuto obtido pelo fator correspondente a temperatura e comprimento de onda de leitura:

Multiplicar o fator da tabela abaixo pelo ? A/min

	25°C	30°C ou 37°C
340 nm	952	1746

VALORES DE REFERÊNCIA

	25°C	30°C	37°C
Homens até	22 U/L	30 U/L	42 U/L
Mulheres até	17 U/L	23 U/L	32 U/L

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Recuperação

Foram efetuados testes de recuperação, utilizando 5 amostras de concentração determinada. Foram efetuadas diluições entre as mesmas dentro da faixa de linearidade do teste. A média da comparação da concentração calculada com a concentração obtida foi de 95%.

PRECISÃO

Intra-ensaio: Foram testadas 5 amostras, em 5 replicatas, durante um ensaio. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Média em U/L = 35 U/L

Coefficiente de Variação (CV %) = 6,2%

Entre-ensaios: Foram testadas replicatas de 5 amostras em 5 ensaios diferentes. Os resultados foram os seguintes:

Média em U/L = 150 U/L

Coefficiente de Variação (CV %) = 1,7%

ESTABILIDADE

Os estudos de estabilidade efetuados em um lote durante o período desde a fabricação até a data de vencimento, utilizando amostras conhecidas demonstram que não houve alteração dos resultados, quando o kit é estocado em geladeira 2-10°C. Após o vencimento do kit, os valores vão se alterando progressivamente. Portanto, recomenda-se não utilizar o kit após a data de validade impressa nas embalagens.

APRESENTAÇÃO

Kit suficiente para a preparo de 125 mL do Reativo único de Trabalho.

BI BLIOGRAFIA

- 1) Deutschen Gesellschaft fur Klinische Chemie (DGKC) Z. Klin. Chem. 10 : 281 (1972)
- 2) Scandinavian Society for Clinical Chemistry (SSCC) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33: 291 (1974)

8.12. MÉTODO PARA DETERMINAR ASPARTATO AMINOTRANSFERASE

CAT Nº 06500
Somente para
Uso in Vitro

GOT (AST)

MÉTODO CINÉTICO – UV

LIQUID STABLE

**DEFINIÇÃO**

O teste é feito para identificar a enzima AST anteriormente chamada de Transaminase Glutâmico Oxalacética encontrada no coração, fígado, músculo esquelético, rins e pâncreas. O teste é usado primariamente para identificar dano ao coração ou fígado e usado em conjunto com CK, LD e ALT, na diagnose de problemas específicos.

FISIOPATOLOGIA

Os níveis de AST começam a se elevar 6 a 10 horas após o infarto do miocárdio, com pico entre 24 e 48 horas, retornando ao normal entre 4 e 7 dias.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Valores elevados - Infarto agudo do miocárdio, câncer do fígado, cirrose, hepatite, pancreatite aguda, angina pectoris severa, exercício físico.

Valores baixos - Gravidez, beribéri, cetoacidose diabética.

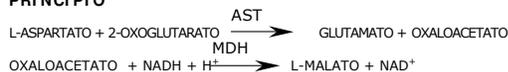
INTERFERÊNCIAS

Falsos valores elevados - Acetaminofem, Anfotericina B, Alopurinol, Anticoncepcionais orais, Metildopa, Fenotiazinas, Colchicina, Narcóticos, Corticosteróides, Barbiturados.

Falsos valores baixos - Salicilatos (aspirina)

MÉTODO

Teste UV otimizado de acordo com IFCC (Federação Internacional de Química Clínica).

PRINCÍPIO**LINEARIDADE E ESTABILIDADE DA REAÇÃO**

A reação é linear até λ A/minuto = 0,200 a 340 nm. Para valores superiores repetir a reação com amostra diluída em solução fisiológica 1:5 ou 1:10, multiplicando o resultado final por 5 ou 10 respectivamente.

COMPOSIÇÃO DO KIT

Reativo Tampão CAT Nº 06501
5 x 20 mL, Pronto para uso

Reativo Enzimático CAT Nº 06502

1 x 25 mL, Pronto para uso

Composição do mono-reagente:

Tris, pH 7,8	80 mmol/L
L-Aspartato	240 mmol/L
LDH	> 1200 U/L
MDH	> 600 U/L
2-Oxoglutarato	12 mmol/L
NADH	0.18 mmol/L

MATERIAL NÃO FORNECIDO (NECESSÁRIO)

Espectrofotômetro com:

Sensibilidade a 340 nm = 0,001 A

Banda de passagem \leq 10nm

Luz estranha \leq 0,5%

Espessura da cubeta = 1,00 cm

Temperatura termostaticada entre \pm 0,2°C.

Micropipetas e pipetas com a capacidade indicada na técnica.

Banho-maria com a temperatura indicada na técnica.

Cronômetro.

VIDA ÚTIL E ARMAZENAMENTO

O kit é estável até a data do seu vencimento impressa na caixa, quando mantido refrigerado.

O Reativo único de Trabalho (mono-reagente) é estável, após sua preparação, por 2 semanas refrigerado.

PRECAUÇÕES

O kit não contém derivados de sangue humano, porém, considerar qualquer amostra de paciente como potencialmente infectante. Evitar a contato direto com as amostras.

Não pipetar reagentes ou amostras com a boca.

Descartar as sobras das reações de acordo com as Boas Práticas de Laboratório em local próprio para materiais potencialmente infectantes.

AMOSTRA

Soro obtido da maneira usual, livre de hemólise. É estável 3 dias refrigerado.

NÃO CONGELAR.

Amostras de soro com concentração de ceto-ácidos endógenos elevados produzem valores falsamente elevados, enquanto que as provenientes de pacientes hemodializados ou com hipovitaminose, ou outras patologias associadas com deficiência de piridoxal fosfato, produzem valores falsamente diminuídos.

PREPARAÇÃO DO REAGENTE DE TRABALHO

Misture 1 frasco do Rvo. Tampão (20 mL) com 5 mL do Rvo. Enzimático ou para quantidades menores, 4 partes de Rvo. Tampão + 1 parte de Rvo. Enzimático = Mono-reagente

Estabilidade:

2 semanas a 2°-8°C.

2 dias a 15°-25°C.

Proteja o mono-reagente da luz!

Os reagentes contêm Azida Sódica como conservante. Não ingerir e evitar contato com a pele e mucosas.

A absorvância do Reativo único de Trabalho (mono-reagente) a 340 nm com o Espectrofotômetro zerado com água deionizada, deverá estar entre 0,800 e 1,800A. Leituras inferiores indicam deterioração do Reativo.

TÉCNICA

O DGKC recomenda a temperatura de 25°C, o Comitê de Enzimas da SSCC 37°C e a IFCC sugere 30°C.

PROCEDIMENTO PARA O TESTE

Comprimento de onda: 340nm

Caminho óptico: 1 cm.

Temperatura: 25°, 30°, 37°C.

Temperatura	25°C	30°C ou 37°C
Amostra	200 ? I	100 ? I
Mono-reagente	1000 ? I	1000 ? I

Misturar, ler a absorvância após 1 min. e iniciar o cronômetro.

Ler absorvâncias novamente após 1, 2 e 3 min. Calcular as diferenças de absorvância por minuto (λ A/minuto).

CÁLCULO

Multiplicar o λ A/minuto obtido pelo fator correspondente a temperatura e comprimento de onda de leitura:

Multiplicar o fator da tabela abaixo pelo λ A/min.

	25°C	30°C ou 37°C
340 nm	952	1746

VALORES DE REFERÊNCIA

	25°C	30°C	37°C
Homens até	18 U/L	25 U/L	37 U/L
Mulheres até	15 U/L	21 U/L	31 U/L

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO**Recuperação**

Foram efetuados testes de recuperação, utilizando 5 amostras de concentração determinada. Foram efetuadas diluições entre as mesmas dentro da faixa de linearidade do teste. A média da comparação da concentração calculada com a concentração obtida foi de 95%.

PRECISÃO

Intra-ensaio: Foram testadas 5 amostras, em 5 replicatas, durante um ensaio. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Média em U/L = 45 U/L

Coefficiente de Variação (CV %) = 6,0 %

Entre-ensaios: Foram testadas replicatas de 5 amostras em 5 ensaios diferentes. Os resultados foram os seguintes:

Média em U/L = 120 U/L

Coefficiente de Variação (CV %) = 1,9 %

ESTABILIDADE

Os estudos de estabilidade efetuados em um lote durante o período desde a fabricação até a data de vencimento, utilizando amostras conhecidas demonstram que não houve alteração dos resultados, quando o kit é estocado em geladeira 2-10°C. Após o vencimento do kit, os valores vão se alterando progressivamente. Portanto, recomenda-se não utilizar o kit após a data de validade impressa nas embalagens.

APRESENTAÇÃO

Kit suficiente para o preparo de 125 mL do Reativo único de Trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Deutschen Gesellschaft fur Klinische Chemie (DGKC) Z. Klin. Chem. 10 : 281 (1972)
- 2) Scandinavian Society for Clinical Chemistry (SSCC) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33 : 291 (1974)
- 3) International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)

8.13. MÉTODO PARA DETERMINAR CREATINA QUI NASE

CAT N.º 06200
Somente para
Uso in Vitro

CK-MB (NAC)

Método Cinético - UV
LIQUID STABLE



**Reativo de Trabalho: Acrescentar
400 µL de Rvo Tampão em cada
frasco de Rvo Enzimático**

DESCRIÇÃO E FINALIDADE

O teste é feito para a determinação quantitativa da isoenzima MB da Creatina Quinase em soro ou plasma

SIGNIFICADO CLÍNICO

A Creatina Quinase é uma enzima formada pela combinação de duas sub-unidades diferentes: a M (músculo) e outra sub-unidade a B (cérebro). Existe como três isoenzimas MM (muscular), MB (miocárdica) e BB (cerebral). As isoenzimas CK-MM e CK-MB se encontram principalmente nos músculos esquelético e cardíaco. A isoenzima CK-BB se encontra principalmente no cérebro. Perante um infarto de miocárdio, a CK-MB aumenta significativamente e junto com a determinação de CK total transformam-se num marcador específico para o diagnóstico do infarto.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método da Laborlab baseia-se na determinação da atividade da CK na presença de um anticorpo contra o monômero M. Este anticorpo inibe totalmente a isoenzima CK-MM e a metade da atividade da forma CK-MB, sem afetar ao monômero B das isoenzimas MB a e BB. Como normalmente a isoenzima CK-BB não se encontra no sangue, a determinação da quantidade do monômero B é praticamente específica para a forma CK-MB

LINEARIDADE

Diluir as amostras que possuam uma atividade de CK total superior a 1000 U/L com uma solução de cloreto de sódio 9 g/L 1:1 Neste caso multiplicar o resultado obtido por 2. A diluição é realizada para que a atividade de CK total fique menor que 1000 U/L. O reativo uma vez preparado possui um anticorpo anti CK-M humano, em quantidade suficiente para inibir até 1500 U/L de CK-MM.

ESTABILIDADE

O Reativo já preparado possui uma estabilidade de 8 horas à temperatura ambiente ou 10 dias entre 2-10°C. Descartar o Reativo quando a sua Absorbância for maior que 0,700A em 340 nm, zerando com água deionizada.

COMPOSIÇÃO DO KIT

Reativo Tampão CAT Nº 06202
Solução estabilizada de Imidazol 10 mmol/L, pH=6,7, EDTA 2 mmol/L, conservadores

Volume = 1 x 8 mL

Reativo Enzimático CAT Nº 06201

Contém: creatinafosfato, Adenosina-difosfato, glicose, Acetato de Magnésio, Di (adenosina-5) Pentafosfato, hexoquinase.
Volume = 20 x 1,6 mL

Reativo Padrão CAT Nº 06203

Volume = 0,5 mL pronto para uso

MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO

Espectrofotômetro ou Colorímetro com:

Sensibilidade a 340 nm = 0,001 A

Banda de passagem < 10 nm

Espessura da cubeta = 1,00 cm

Temperatura termostabilizada +/- 0,2 °C

Micropipetas e pipetas capazes de medir os volumes indicados na técnica.

Banho-maria com a temperatura indicada no procedimento.

Cronômetro.

ARMAZENAMENTO

O kit é estável até a data de validade impressa na caixa e nos rótulos dos frascos, se estocado em geladeira 2-8°C. As condições para a transporte são as mesmas que do armazenamento.

PRECAUÇÕES

O kit não contém derivados de sangue humano, porém, considerar qualquer amostra de paciente como potencialmente infectante. Evitar o contato direto com as amostras. Não pipetar reagentes ou amostras com a boca.

Descartar as sobras das reações de acordo com as Boas Práticas de Laboratório em local próprio para materiais potencialmente infectantes.

COLETA DE AMOSTRAS

Coletar sangue por venipunção. Usar soro ou plasma (colhido com heparina ou EDTA como anticoagulante).

Evitar amostras hemolisadas. A amostra deve ser recente. No soro a atividade da CK-MB diminui em até aprox. 10% em 1 hora à temperatura ambiente, ou em 24 horas à 4°C.

TÉCNICA

Preparo do Reativo de Trabalho

Acrescentar 400 µL do Reativo Tampão em cada frasco de Reativo Enzimático Volume final = 2 mL. O reativo de Trabalho preparado possui uma estabilidade de 8 horas à temperatura ambiente ou 10 dias em geladeira 2-10°C. Descartar quando a leitura em 340 nm for maior que 0,700 A, lida contra água.

COMPOSIÇÃO DO REATIVO DE TRABALHO

Imidazol	100 mmol/L
Creatina fosfato	30 mmol/L
Adenosina difosfato	2 mmol/L
Glicose	20 mmol/L
NADP	2 mmol/L
Hexokinase	≥ 2500 U/L
Glucose-6-fosfato dehidrogenase	≥ 2000 U/L
Acetato de Magnésio	10 mmol/L
Adenosina monofosfato	5 mmol/L
Di(Adenosina-5) penta fasp.	10 mmol/L

Anticorpos monoclonais com capacidade suficiente para inibir até 1500 U/L de CK-MM.

ENSAIO

Com o Espectrofotômetro ou Colorímetro em 340 nm, zerando a Absorbância contra água deionizada, colocar em uma cubeta mantida à temperatura escolhida (30-37°C):

Reativo de trabalho	1 mL
Amostra	50 ? L

Homogeneizar. Após aproximadamente 5 minutos, disparar o cronômetro e anotar a Absorbância inicial Ao. Após exatos 5 minutos determinar a Absorbância A1.

CÁLCULOS

Determine a diferença de Absorbâncias: A1 - Ao = ? ? Abs

CK-BM (U/L) = ? ? Abs x 1350

VALORES DE REFERÊNCIA

Temperatura	30°C	37°C
U/L	< 16	< 25

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Existe uma probabilidade maior de lesão do miocárdio se simultaneamente acontece: 1) Uma atividade de CK total:

Temperatura	Homens	Mulheres
30°C	> 130 U/L	> 110 U/L
37°C	> 195 U/L	> 170 U/L

2) Uma atividade de CK-MB:

a 30°C > 16 U/L

a 37°C > 25 U/L

3) A atividade de CK-MB representa de 6 a 20 % da atividade de CK total. Uma porcentagem menor que 6% provavelmente poderá indicar uma lesão do músculo esquelético. Uma porcentagem superior a 20% provavelmente poderá indicar uma forma macro da CK (CK atípica)

LIMITAÇÕES E INTERFERÊNCIAS

Não usar amostras hemolisadas, estas produzem valores falsamente aumentados. Amostras com uma atividade de CK total superior a 1000 U/L devem ser diluídas com cloreto de sódio 9 g/L (Ver Linearidade).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO**Recuperação**

Foram efetuados testes de recuperação, utilizando 5 amostras de concentração determinada. Foram efetuadas diluições entre as mesmas dentro da faixa de linearidade (< 1000 U/L de CK total). A média da comparação de concentração calculada com a concentração obtida foi de 94,7%.

PRECISÃO

Intra-ensaio: Foram testadas 5 amostras, em 5 replicatas, durante um ensaio. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Média em U/L = 35 U/L

Coefficiente de Variação (CV %) = 6,1%

Entre-ensaios: Foram testadas replicatas de 5 amostras em 5 ensaios diferentes. Os resultados foram os seguintes:

Média em U/L = 75 U/L

Coefficiente de Variação (CV %) = 4,2%

ESTABILIDADE

Os estudos de estabilidade efetuados em um lote durante o período desde a fabricação até a data de vencimento, utilizando amostras conhecidas demonstram que não houve alteração dos resultados, quando o kit é estocado em geladeira 2-10°C. Após o vencimento do kit, os valores vão se alterando progressivamente. Portanto, recomenda-se não utilizar o kit após a data de validade impressa nas embalagens.

APRESENTAÇÃO

Kit suficiente para o preparo de 20 x 2 mL de Reativo de Trabalho (40 reações x 1 mL)

BIBLIOGRAFIA

1. Tietz, N.W.: Fundamentals of Clinical Chemis", 2nd Ed., W.B.Saunders, Philadelphia, PA (1976).

2. Szasz, G.: Clin.Chem.22 (650),(1976).

3. International Federation of Clinical Chemistry. Clínica Química Acta 105:147F (1980)

4. Wu, A.H.B., Bowers, C.N.: Clin. Chem.28,2017(1982) S. Stein, W.: Med Welt 36,572(1985).

8.14. MÉTODO PARA DETERMINAR LACTATO DESIDROGENASE

CAT Nº 06700
Somente para
Uso in Vitro

LDH-P

Método Cinético – UV

LIQUID STABLE

**DEFINIÇÃO**

O teste no soro sanguíneo determina a quantidade de enzima que é encontrada no coração, fígado, rins, cérebro, músculo esquelético e glóbulos vermelhos.

FISIOPATOLOGIA

O nível de LD aumenta após 12 horas de produzido o infarto do miocárdio e seu pico é alcançado em 48 horas e se mantém elevado até 1 a 2 semanas após.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Valores elevados - infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, câncer, melanoma, leucemia aguda, mononucleose, anemia perniciosa, anemia falciforme, anemia hemolítica, hemorragia cerebral, infarto pulmonar, doenças do fígado, doenças musculares.

MÉTODO

Teste UV otimizado de acordo com a IFCC (Federação Internacional de Química Clínica)

PRINCÍPIO**LINEARIDADE E ESTABILIDADE DA REAÇÃO**

A reação é linear até : ? A/minuto = 0,150 a 340 nm.
Para valores superiores, repetir a reação com amostra diluída em solução fisiológica 1:5 ou 1:10, multiplicando o resultado final por 5 ou 10 respectivamente.

COMPOSIÇÃO DO KIT

Rvo. Enzimático CAT Nº 06701
10 x 12 mL, Pronto para uso

Rvo. Tampão CAT Nº 06702

2 x 15 mL, Pronto para uso

Composição do mono-reagente : Piruvato 1,45 mmol/L
TRIS 72,7 mmol/L
NADH 0,22 mmol/L

MATERIAL NÃO FORNECIDO (NECESSÁRIO)

Espectrofotômetro com :
Sensibilidade a 340 nm = 0,001 A
Banda de passagem ≤ 10 nm
Luz estranha ≤ 0,5%
Espessura da cubeta = 1,00 cm
Temperatura termostatizada entre ± 0,2 °C.
Micropipetas e pipetas com a capacidade indicada na técnica.
Banho-maria com a temperatura indicada na técnica.
Cronômetro.

VIDA ÚTIL E ARMAZENAMENTO

O kit é estável até a data do seu vencimento impressa na caixa, quando mantido refrigerado.
O Reativo Único de Trabalho é estável, após sua preparação, por 5 dias refrigerado ou 1 dia 15 - 25°C.

PRECAUÇÕES

O kit não contém derivados de sangue humano, porém, considerar qualquer amostra de paciente como potencialmente infectante. Evitar o contato direto com as amostras.
Não pipetar reagentes ou amostras com a boca.
Descartar as sobras das reações de acordo com as Boas Práticas de Laboratório em local próprio para materiais potencialmente infectantes.

AMOSTRA

Obter soro da maneira usual, separando do coágulo até 2 horas após a coleta. Evitar o uso de amostras com visível ou intensa hemólise, pois, produzem resultados falsamente elevados.
A amostra se mantém estável por 12 horas refrigerada. Não congelar.

TÉCNICA

Determinação cinética de Lactato Dehidrogenase segundo recomendações da IFCC. Deve-se considerar que a maior temperatura se obtém maior sensibilidade mas menor faixa de linearidade.

PREPARAÇÃO

Misture 1 frasco do Rvo. Enzimático (12 mL) com 3 mL do Rvo. Tampão ou para menores quantidades: 4 partes de Rvo. Enzimático + 1 parte de Rvo. Tampão = Mono-reagente.

Estabilidade: 5 dias a 20-80 °C.
1 dia a 150-250 °C.

PROCEDIMENTO PARA O TESTE

Comprimento de onda: 340 nm
Caminho óptico: 1 cm.
Temperatura: 30°, 37°C.

Temperatura	30 ou 37° C
Amostra	20 ? L
Mono-reagente	1000 ? L

Misturar ler a absorvância após 1 min. e dar partida no cronômetro.
Ler absorvância novamente após 1,2 e 3 min. Calcular as diferenças de absorvância por minuto (? A/minuto).

CÁLCULO

Multiplicar o ? A/minuto obtido pelo fator correspondente a temperatura e comprimento de onda de leitura:

	30 ou 37° C
340 nm	8095

VALORES DE REFERÊNCIA

Temperatura	30°C	37°C
U/L	140 - 280	200 - 400

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO**Recuperação**

Foram efetuados testes de recuperação, utilizando 5 amostras de concentração determinada. Foram efetuadas diluições entre as mesmas dentro da faixa de linearidade do teste. A média da comparação da concentração calculada com a concentração obtida foi de 95%.

PRECISÃO

Intra-ensaio: Foram testadas 5 amostras, em 5 replicatas, durante um ensaio. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Média em U/L = 120 U/L

Coefficiente de Variação (CV %) = 8,0%

Entre-ensaios: Foram testadas replicatas de 5 amostras em 5 ensaios diferentes. Os resultados foram os seguintes:

Média em U/L = 450 U/L

Coefficiente de Variação (CV %) = 4,1%

ESTABILIDADE

Os estudos de estabilidade efetuados em um lote durante o período desde a fabricação até a data de vencimento, utilizando amostras conhecidas demonstram que não houve alteração dos resultados, quando o kit é estocado em geladeira 2-10°C. Após o vencimento do kit, os valores vão se alterando progressivamente. Portanto, recomenda-se não utilizar o kit após a data de validade impressa nas embalagens.

APRESENTAÇÃO

Kit suficiente para o preparo de 150 ml de Reativo de Trabalho .

NOTAS

O reagente contém Azida Sódica como conservante. Não ingerir e evitar contato com a pele e mucosas.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Deutschen Gesellschaft fur Klinische Chemie (DGKC)
Z. Klin. Chem . 10:281 (1972)
- 2) Scandinavian Society for Clinical Chemistry (SSCC)
Scand. J. Clin., Lab. Invest. 33: 291 (1974)
- 3) International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)
Clinica Chimica Act