

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Depto. de Planejamento Alimentar e Nutrição

Curso de Alimentos e Nutrição

Dissertação de Mestrado

Utilização das Proteínas do Soro Lácteo pelo Rato Jovem

André Godoy Ramos

Orientador: Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **André Godoy Ramos** aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de agosto de 2001.

Campinas, 16 de agosto de 2001

CAMPINAS
SÃO PAULO - BRASIL
AGOSTO - 2001


Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan
Presidente da Banca



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

UNIDADE B2
N.º CHAMADA:
T/ UNICAMP
R147u
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/ 46377
PROC. 16-39-2/07
C D
PREC. R\$ 11,00
DATA 14/09/07
N.º CPD _____

CM00159811-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

R147u Ramos, André Godoy
Utilização das proteínas do soro lácteo pelo rato jovem /
André Godoy Ramos. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Jaime Amaya-Farfan
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Proteínas. 2.Soro de leite. 3.Hidrólise. 4.Insulina.
5.Exercício. I.Amaya-Farfan, Jaime. II.Universidade Estadual
de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

Comissão Examinadora



Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan
Orientador



Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro
Membro



Profa. Dra. Semíramis Martins Álvares Domene
Membro

Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Membro

· “Assim como falham as palavras quando querem exprimir qualquer pensamento.
Assim falham os pensamentos quando querem exprimir qualquer realidade”.

Fernando Pessoa

À Ana Flávia

Que a nossa intimidade seja cada vez maior e mais respeitada.

Ao José Vítor

Que eu possa transmitir segurança no caminho que ele quiser seguir.

Agradecimentos

Ao meu orientador, um grande exemplo, que me aceitou como eu sou.

À Flávia Auler sempre pronta ajudar, muito obrigado!

À Maria Inês e Fernanda pelas ajudas prestadas.

A todos os amigos do laboratório de fontes protéicas deste departamento.

Ao Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro que muito ajudou e apoiou, inclusive com a realização do radioimunoensaio para determinação de insulina nos laboratórios do Depto. de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Antônio H. Lancha Jr. E todos do Laboratório de Nutrição do Depto. de Biodinâmica da Escola de Educação Física da USP que me toleraram e me ajudaram.

À FAEP pelo auxílio financeiro doado.

À NZMP do Brasil Ltda por ter doado os produtos protéicas utilizados nas dietas experimentais.

SUMÁRIO

Resumo Geral	i
General Abstract.....	iii
1. Introdução Geral	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
3. Artigos de pesquisa.....	23
3.1. <i>Caracterização e avaliação da Qualidade Nutricional das Proteínas do Soro Lácteo, Intactas e com Alto Grau de Hidrólise.</i>	
Resumo.....	24
Abstract.....	25
3.1.1. <i>Introdução</i>	26
3.1.2. <i>Material e Métodos</i>	27
3.1.3. <i>Resultados</i>	33
3.1.4. <i>Discussão</i>	38
3.1.5. <i>Conclusões</i>	41
3.1.6. <i>Referências</i>	43
3.2. <i>Utilização das Proteínas do Soro Lácteo, Intactas e com Alto Grau de Hidrólise pelo Rato Sedentário submetido a jejum prolongado.</i>	
Resumo.....	46
Abstract.....	47
3.2.1. <i>Introdução</i>	48
3.2.2. <i>Material e Métodos</i>	49
3.2.3. <i>Resultados</i>	50

3.2.4. <i>Discussão</i>	51
3.2.5. <i>Conclusões</i>	52
3.2.6. <i>Referências</i>	54
3.3. <i>Utilização das Proteínas do Soro Lácteo, Intactas e com Alto Grau de Hidrólise pelo Rato Submetido a exercício agudo de natação.</i>	
<i>Resumo</i>	56
<i>Abstract</i>	57
3.3.1. <i>Introdução</i>	58
3.3.2. <i>Material e Métodos</i> 59	
3.3.3. <i>Resultados</i>	66
3.3.4. <i>Discussão</i>	70
3.3.5. <i>Conclusões</i>	72
3.3.6. <i>Referências</i>	73
4. <i>Conclusão Geral</i>	77
5. <i>Referências Bibliográficas Gerais</i>	78

Utilização das Proteínas do Soro Lácteo por Ratos Jovens

Resumo Geral

Os interesses com o consumo de proteínas, como nos carboidratos e lipídios, não estão somente direcionados para a quantidade e o valor biológico clássico. Alguns estudos avaliam também o tipo e a forma da proteína ingerida. A velocidade com que a proteína é digerida e seus aminoácidos absorvidos, bem como o tipo de peptídeos gerados, em função da composição da proteína, pode ter significativas influências no metabolismo protéico. O objetivo deste trabalho foi verificar se o consumo agudo de proteína solúvel, na forma intacta (CPSL) ou hidrolisada (CPSLH), interfere no metabolismo protéico/energético de ratos jovens sedentários normais com ou sem estímulo fisiológico à captação de aminoácidos (exercício e jejum). A fonte protéica utilizada neste estudo foi a mistura de proteínas do lactossoro, intactas e hidrolisadas. Seguindo o modelo da AIN-93 (Reeves, *et al.* 1993), elaboramos três dietas purificadas contendo: proteínas do soro de leite bovino, ora intacta, ora hidrolisada. Como proteína controle foi usada a caseína. Realizamos três protocolos experimentais utilizando ratos *Wistar* machos de aproximadamente 200g: 1º- Três grupos sedentários, conforme a dieta, nos quais foi avaliada a qualidade protéica através da determinação do balanço nitrogenado, digestibilidade e valor biológico aparentes; 2º- Três grupos realimentados após 60 horas de jejum onde foi controlado o ganho de peso dos animais e avaliada a velocidade de recuperação; 3º- Três grupos alimentados e exercitados, durante dez dias, em atividade com intensidade no supra-limiar metabólico, nos quais foram determinados substratos metabólicos protéico-energéticos e insulina no repouso, após 24 horas da última sessão de atividade física. As fontes protéicas de soro de leite utilizadas no primeiro experimento, independente da hidrólise prévia, apresentaram maior digestibilidade aparente do que a caseína. Para os demais parâmetros nutricionais, os resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre as três proteínas. No segundo experimento, os animais submetidos a jejum prolongado e realimentados com

proteína de soro de leite hidrolisada enzimaticamente (CPSLH) recuperaram o peso corporal mais rapidamente. No terceiro experimento, os animais submetidos a exercício agudo de natação e alimentados com CPSLH mostraram menor concentração de glicogênio muscular após 24 horas de repouso. A ausência de outras respostas diferenciadas sugere que os hidrolisados com alto grau de hidrólise possuem propriedades diferentes dos preteolisados de baixo ou médio grau.

Utilization of Milk-Whey Proteins by the Young Rat

General Abstract

Currently, the consumption of proteins is surrounded by new interests from the nutritional standpoint other than the classical biological value. Studies suggest that not only the type, but also the form of the protein ingested is important. The velocity with which a protein is digested and its amino acids absorbed, in addition to the sort of peptides generated, are now considered to have profound influence on the overall metabolism. This work evaluates the possible metabolic effects of short-term feeding with whole whey protein (CPSL) of normal young rats (male Wistar, 200g), as compared to the extensively hydrolyzed whey protein (CPSLH), and as a result of acute physical stimulation. The experimental design consisted of three assays in which the basal AIN-93 diet was modified by substituting either intact or hydrolyzed whey protein for the normal protein source casein and the animals subjected to the three different physical or nutritional challenges; i.e. i) classical sedentarism, ii) a 60-hour fasting and iii) 10-days of metabolic supra-threshold swimming activity. Results from the first experiment showed that although the whey proteins were more readily digestible than casein, neither the nitrogen balance, apparent digestibility or biological value of the whey proteins significantly altered the metabolism of the sedentary animal. From experiment 2 it could be concluded that the fasted animals fed the CPSLH recovered their body weight significantly faster than their cohorts fed the intact whey protein. Experiment 3 showed that while the animals fed the CPSLH had lower concentrations of muscular glycogen 24 hours after the exercise bout, all other biochemical parameters were indistinguishable from those produced by the CPSL. Generally, it can be concluded that differences can exist between the sedentary and the nutritionally or physically stressed animal in the utilization of this extensively hydrolyzed form of whey protein. Although no physiological advantages were seen from the use of the CPSLH, the absence of any major alterations in the general metabolism of the three categories of animals fed this hydrolyzed protein suggests that the product can be tolerated by the animal without any apparent physiological

burden. Also, it was apparent that the extensively hydrolyzed protein differs from the less extensively hydrolyzed products in the form of utilization by the body.

Keywords: exercise; protein hydrolyzate; protein metabolism; cori cycle; gluconeogenesis

1. Introdução Geral

O presente trabalho foi motivado pela observação de que o uso das proteínas do soro lácteo bovino cresceu muito nos últimos anos no Brasil e no mundo, atingindo talvez níveis abusivos, na forma de suplementos protéicos (Araújo & Soares, 1999; Kanesiro, *et al.*, 1999).

O uso de suplementos protéicos, inicialmente usados em fórmulas hospitalares, aumentou no mercado comum destinando-se aos grupos praticantes de atividade física, sejam eles atletas profissionais ou não. Há ainda uma exigência social à boa estética corporal que facilitou muito o apelo comercial. A maioria dos consumidores não está orientada por profissionais nutricionistas, chegando estes suplementos a serem considerados alimentos comuns, de livre consumo, apesar da alteração do hábito alimentar.

As proteínas do soro de leite ("*whey protein*") são as proteínas solúveis que resultam como resíduo da produção do queijo. Este subproduto se encontra no mercado na forma de concentrados protéicos, isolados protéicos ou como ingredientes de muitos produtos formulados. Produtos vendidos como suplementos de aminoácidos também são elaborados a partir de proteínas de soro de leite previamente hidrolisadas.

Tanto fabricantes como consumidores esperam que a ingestão da proteína de soro de leite influencie o metabolismo do organismo quando estimulado, no sentido de aumentar a captação de aminoácidos pela célula muscular, aumentando assim a síntese de proteínas musculares. Para indivíduos debilitados, o uso de proteínas solúveis do leite, intactas (Boirie, *et al.* 1997; Frühbeck, 1998; Parodi, 1998) ou hidrolisadas (Poullain *et al.*, 1989; Van Beresteijn, 1994) pode ser de grande utilidade para acelerar a sua recuperação. Em organismos submetidos à atividade física, o consumo de lactoalbumina (albumina do soro lácteo) hidrolisada enzimaticamente pode possibilitar uma melhor manutenção da glicemia e concentrações de glicogênio um maior rendimento e uma maior capacidade de recuperação após o esforço físico (Tassi, *et al.* 1998).

Trata-se, portanto, de uma pesquisa que avalia o valor nutricional do concentrado protéico de soro de leite, ora intacto, ora previamente hidrolisado. Avalia-se, também a capacidade de recuperação de animais submetidos a um estado catabólico prévio, seja pelo exercício físico, seja pelo jejum. Isto é, foi observado o desempenho físico, a concentração de metabólitos energéticos e a capacidade de recuperação de animais alimentados com dietas contendo concentrado protéico de soro de leite intacto (CPSL) ou hidrolisado (CPSLH), em função da atividade física e a capacidade de recuperação de animais quando realimentados com essas dietas após jejum prolongado.

No experimento com atividade física, fizemos uma avaliação com atividade intensa e de curta duração por acreditarmos que é desta forma mais comum de consumo destes suplementos alimentares. Freqüentadores de academia consomem os suplementos protéicos no intuito de ganhar massa corporal magra mais rapidamente (Araújo & Soares, 1999, Kaneshiro, *et al.*, 1999).

Foram então realizados três experimentos em laboratório de ensaios biológicos: o primeiro teve como finalidade verificar a qualidade nutricional dos produtos protéicos à base de proteínas de soro de leite utilizados neste experimento; o segundo foi para verificar a capacidade de recuperação de animais alimentados com essa fonte protéica, após serem submetidos a jejum prolongado e conseqüente alta degradação protéica; e, finalmente, um terceiro ensaio biológico que objetivou avaliar os parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo protéico-energético de animais submetidos à atividade física e alimentados com essas proteínas.

Desta forma, esta pesquisa procurou mostrar uma visão científica da verdadeira eficácia do consumo das proteínas do soro lácteo. Ao passo que não há comprovação de riscos à saúde, o consumo rotineiro deste tipo de proteína pode ser de grande valia desde de que saibamos exatamente o objetivo e os reais benefícios que podem ser esperados com a suplementação ou com a substituição de outras proteínas de alto valor biológico para cada condição fisiológica.

2. Revisão Bibliográfica

Metabolismo Energético Básico

As reações metabólicas envolvendo a transformação de nutrientes para produzir energia e garantir as funções vitais, têm sido objeto de estudo por muito tempo. A maneira pela qual os nutrientes derivados dos alimentos são utilizados pela célula, uma vez ingeridos e absorvidos, também tem sido assunto de pesquisas, inclusive pela possibilidade de que os mesmos nutrientes possam causar efeitos diferentes, dependendo do tipo de fonte alimentar.

O organismo animal necessita de fornecimento permanente de energia a fim de manter as suas diversas funções biológicas. A maioria das substâncias produtoras de energia através da oxidação está presente nos alimentos, principalmente sob a forma de carboidratos, lipídeos e proteínas. Estes macronutrientes podem ser metabolizados, após a sua ingestão, imediatamente para a produção de energia, ou transformados em reservas energéticas endógenas para posterior utilização.

No processo de geração da energia, fragmentos das moléculas de carboidrato, lipídeo e proteína perdem prótons e elétrons (H^+ e e^-), tendo seus átomos de carbono convertidos finalmente em CO_2 ou a outros compostos como o ácido láctico. Os prótons e elétrons são recebidos por coenzimas na forma oxidada (NAD^+ , FAD), que passam, assim, à forma reduzida ($NADH$, $FADH_2$).

A oxiredução das enzimas é obtida pela transferência dos H^+ e e^- para a molécula de oxigênio que, por sua vez, é convertido em água. Este processo de reoxidação resulta na síntese de um composto rico em energia, a adenosina trifosfato (ATP), a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi). A energia química do ATP será então utilizada nos processos biológicos dependentes de energia. Portanto, para que os alimentos forneçam energia na forma de ATP, ou se transformem em massa corporal na medida correta, é necessário um processo altamente controlado de obtenção, armazenamento e utilização da energia (Benyon, 1998, Salway 1999, Leninger, 1989, Murray *et al.*, 1996).

As reações bioquímicas podem ser classificadas como catabólicas ou anabólicas. As primeiras transformam moléculas complexas (proteínas, lipídeos, polissacarídeos, etc.) em moléculas simples (CO_2 , NH_3 , água). Já as vias anabólicas formam produtos finais complexos a partir de precursores simples (glicose, lipídeos e aminoácidos). As rotas anabólicas e catabólicas são compostas de seqüências multienzimáticas em que cada enzima pode exercer importantes papéis catalíticos ou reguladores (Salway 1999).

Catabolismo

As vias catabólicas, basicamente, servem para capturar energia química a partir da degradação dos substratos energéticos, ou transformar os nutrientes em precursores necessários à síntese de moléculas complexas. A geração de energia, desde a degradação de moléculas complexas, compreende em três passos básicos: 1) hidrólise do polímero em monômero; 2) conversão de monômeros em intermediários simples (já ocorre uma pequena formação de ATP); 3) oxidação do acetil-CoA. Para exemplificar podemos citar as proteínas, nosso objeto de estudo, que: 1) são transformadas em aminoácidos, 2) aminoácidos são transformados em moléculas simples ou acetil-Coa que pode ser derivado dos chamados aminoácidos cetogênicos, 3) O acetil-CoA é oxidado a dois CO_2 e quatro pares de elétrons são transferidos para as coenzimas NAD^+ e FAD para produzir NADH e FADH_2 . Neste terceiro passo, que acontece na mitocôndria, grandes quantidades de ATP são geradas à medida que os elétrons do NADH e FADH_2 fluem para o oxigênio através de reações de oxido-redução pela fosforilação oxidativa (Benyon, 1998, Salway 1999, Leninger, 1989, Murray *et al.*, 1996).

Anabolismo

As reações anabólicas combinam moléculas pequenas, como os aminoácidos, para formar moléculas complexas como as proteínas. Ao contrário das reações catabólicas, são reações que consomem energia (ATP) em rota biossintética quase sempre diferente da via degradativa. Os processos catabólicos e biossintéticos de um

determinado composto respondem, normalmente, a diferentes sinais regulatórios. As reações anabólicas freqüentemente envolvem reduções químicas nas quais o poder redutor é fornecido pelo doador de elétrons NADPH (Benyon, 1998, Salway 1999, Leninger, 1989, Murray *et al.*, 1996).

Regulação Hormonal do Metabolismo Energético

As rotas do metabolismo devem ser coordenadas de modo que a produção de energia, ou síntese de produtos finais, preencha as necessidades da célula. Alterações no fígado, tecido adiposo, músculo e cérebro, necessárias à manutenção da homeostase pré e pós absorção, com maior ou menor gasto energético, são reguladas através de hormônios que respondem às diferentes concentrações dos compostos intermediários das rotas metabólicas (BENYON, 1998). Os principais hormônios envolvidos nestes processos são: insulina, glucagon, cortisol, epinefrina (adrenalina) e norepinefrina (noradrenalina) (Murray *et al.*, 1996).

Insulina

É um hormônio protéico, secretado pelas células β do pâncreas após estímulo da glicemia que sinaliza o estado alimentado. A insulina, um hormônio anabólico, estimula a síntese de nutrientes energéticos (glicogênio e triacilglicerol) e a síntese de proteínas. Basicamente, a insulina, no fígado, inibe a glicogenólise; no músculo, aumenta a síntese de glicogênio e, no tecido adiposo, estimula a síntese de triacilgliceróis. A insulina aumenta a captação de glicose no músculo e no tecido adiposo, resultando em maior concentração de glicose, estimulando a síntese e o armazenamento de glicogênio e triacilgliceróis nestes tecidos, respectivamente. A insulina também estimula a síntese protéica e inibe a degradação de proteínas intracelulares (Leninger, 1989; Murray *et al.*, 1996).

Glucagon

As ilhotas pancreáticas, por intermédio das células α , secretam um hormônio catabólico em resposta ao baixo nível de glicose no sangue. Juntamente com a adrenalina, o glucagon se opõe a muitas ações da insulina e age especialmente para manter a glicemia por meio da ativação da glicogenólise e gliconeogênese hepáticas. O glucagon aumenta a captação de aminoácidos pelo fígado resultando em uma maior disponibilidade de esqueletos carbônicos para a gliconeogênese, diminuindo, assim, os níveis plasmáticos de aminoácidos. Este hormônio também favorece a oxidação hepática de ácidos graxos e a subsequente formação de corpos cetônicos a partir de acetil-CoA proveniente da β -oxidação (Leninger, 1989; Murray *et al.*, 1996).

Epinefrina (Adrenalina) e Norepinefrina (Noradrenalina)

Como o glucagon, essas catecolaminas são secretadas em baixos níveis de glicose sangüínea e estimulam a mobilização de glicogênio e triacilglicerol. Diferem do glucagon porque seu efeito catabólico/glicogenolítico é maior no músculo que no fígado. Ao contrário da insulina, as catecolaminas inibem a captação de glicose pelo músculo, economizando este nutriente essencial para cérebro e “obrigando” as células musculares a utilizarem os ácidos graxos provenientes do tecido adiposo como combustível. A adrenalina estimula a secreção de glucagon e inibe a de insulina. Assim, as catecolaminas aumentam a quantidade de glicose liberada no sangue pelo fígado e diminuem a utilização de glicose pelo músculo (Leninger, 1989; Murray *et al.*, 1996).

Proteínas Dietéticas

A proteína é usada pelo organismo na formação de todos os tecidos que compõe o organismo e também como precursores de hormônios e enzimas, mensageiro da célula, ácidos nucléicos e componentes do sistema imune. Como é sabido, os 20 principais resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas foram classicamente subdivididos em 8 nutricionalmente essenciais e 12 não essenciais, sendo eles: essenciais: Val, Leu, Ile, Lys, Met, Thr, Phe e Trp - A His é considerada essencial

para os recém-nascidos - não-essenciais: Tyr, Gly, Ala, Cys, Ser, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Arg. Crianças e debilitados que estão em fase de rápido crescimento celular podem ter também como constituinte essencial das proteínas dietéticas a arginina.

Estes aminoácidos têm em comum um átomo de carbono (C_{α}) no qual está ligado a um átomo de hidrogênio, um grupo amino (NH_2) e um grupo carboxílico ($COOH$). O que difere um aminoácido de outro é a cadeia lateral que está ligada na quarta valência do C_{α} (Farfan, 1994).

Estruturas das Proteínas

As proteínas encontradas na natureza realizam funções específicas. As propriedades funcionais das proteínas dependem das suas estruturas tridimensionais que podem ser classificadas em primária, secundária, terciária e quaternária.

A estrutura primária se caracteriza por apresentar apenas ligações peptídicas entre os aminoácidos.

As secundárias são estruturas estáveis e regulares, mantidas pelas ligações ou pontes de hidrogênio. Estas ligações podem ser intramoleculares ou intermoleculares, levando a cadeia polipeptídica à conformação helicoidal ou foliar respectivamente.

Estruturas primárias e secundárias podem apresentar dobramento ou formação de laço, sendo esse arranjo espacial considerado o terceiro grau de estruturação das proteínas. Na estrutura terciária, várias são as forças que a estabilizam: ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio, ligações salinas, interações eletrostáticas, interações dipolares e interações hidrofóbicas ou de Van der Waals. (Sgarbieri, 1996)

A maioria das proteínas globulares são formadas por mais de uma unidade estrutural. Estas unidades estruturais, por sua vez, podem possuir uma ou mais cadeias polipeptídicas com estruturação primária, secundária ou terciária. As unidades estruturais, formadas por essas cadeias polipeptídicas, ligam-se umas às outras por ligações não covalentes, formando então a estrutura quaternária. (Farfan, 1994, Sgarbieri, 1996).

Solubilidade das Proteínas

As diversas características físico-químicas das proteínas determinam suas propriedades funcionais. Dentre essas propriedades, a solubilidade é importante para o presente estudo, pois pode determinar diferenças fisiológicas como, por exemplo, a velocidade de absorção da proteína dietética.

A solubilidade das proteínas se altera quando pH, que afeta a natureza e a distribuição das cargas da proteína, é modificado. As proteínas são, em geral, mais solúveis em pH baixo (ácido) ou alto (alcalino) devido a alta concentração de cargas positivas ou negativas. O excesso de cargas de um mesmo sinal produz repulsão das moléculas e, conseqüentemente, maior solubilidade. O pH de menor solubilidade, chamado de ponto isoelétrico (pI), é aquele em que há um igual número de cargas positivas e negativas. Outros fatores como força iônica, constante dielétrica do solvente e temperatura também podem alterar a solubilidade das proteínas. (Sgarbieri, 1996)

A composição da proteína também é muito importante para sua caracterização. A solubilidade de uma proteína está diretamente relacionada com a composição de aminoácidos, ou seja, o conteúdo de resíduos ácidos (glutamila, aspartila) e básicos (histidila, arginila e lisila). Não só o número de cargas altera a solubilidade mas também a forma em que estas cargas, positivas e negativas, estão arranjadas na molécula protéica. O conteúdo molecular não protéico como lipídeos, carboidratos e fosfatos, também afeta a solubilidade das proteínas.

As proteínas podem ser classificadas conforme a sua solubilidade em cinco grupos: albuminas, globulinas, prolamina, glutelinas e escleroproteínas (Sgarbieri, 1996).

As albuminas são proteínas solúveis em água e coaguláveis pelo calor. A albumina do ovo, albumina de soro sangüíneo e lactalbumina são exemplos deste grupo protéico.

Globulinas são insolúveis ou pouco solúveis em água pura, mas sua solubilidade é grande em soluções salinas. São normalmente fáceis de serem extraídas com

soluções salinas e precipitação por diluição ou diálise. Tecidos animais, soro sanguíneo e sementes contêm globulinas.

Prolaminas são insolúveis em água e soluções salinas e solúveis em solução alcoólica. Estas proteínas são encontradas em grãos (zeína do milho, gliadina do trigo).

Glutelinas são insolúveis em água, solução salina e em solução alcoólica, sendo, porém, solúveis em soluções ácidas. Assim como as prolaminas, elas estão presentes em cereais como no arroz que contém 80% das suas proteínas na forma de glutelina. Podemos também citar como exemplo a glutenina do trigo que é uma glutelina típica.

Proteínas insolúveis ou praticamente insolúveis, normalmente fibrilares como, por exemplo, queratina, colágeno e elastina, estão classificadas no grupo das escleroproteínas. Para solubilizar estas proteínas é preciso a degradação da molécula com ácidos, bases, detergentes ou dispersantes (Sgarbieri, 1996).

Metabolismo das Proteínas Alimentares

No estado pós-absortivo, os aminoácidos provenientes da dieta são liberados no sangue para a utilização por todos os tecidos na síntese de proteínas. O excedente é desaminado e os esqueletos de carbono resultantes são degradados pelo fígado até piruvato, acetil-CoA ou outros intermediários do ciclo de Krebs. Estes metabólitos podem ser oxidados para obter energia ou usados na síntese de ácidos graxos.

Um homem normal com peso corporal de 70 kg contém, aproximadamente, 12 kg de proteína e 200-220g de aminoácidos livres, nos quais são, continuamente, cedidos para a síntese protéica e repostos pela degradação das proteínas do organismo (Benyon, 1998). A isso, denomina-se “turnover” protéico. Os aminoácidos de origem endógena são liberados pela degradação de certos tipos de proteínas, como as das fibras musculares e as das células epiteliais do intestino delgado, para novas proteínas serem sintetizadas ou serem convertidos em energia. Este *turnover* protéico, para um homem de 70kg, gira em torno de 300g por dia. O organismo dispõe de um estoque (*pool*) de aminoácidos mantido pela degradação de tecidos protéicos e pelas proteínas

provenientes da dieta. Alguns aminoácidos, ao não serem utilizados imediatamente, não podem ser estocados e devem ser desaminados e degradados (Benyon, 1998).

A musculatura esquelética perfaz 40 a 45% da massa corporal contendo cerca de 7kg de proteína, principalmente na forma de proteína contrátil (miofibrilar). Cerca de 120g de aminoácidos livres estão intramuscular, isto é, dentro do músculo esquelético, enquanto somente 5g de aminoácidos livres encontra-se na circulação sanguínea (Wagenmakers, 1998).

A degradação protéica leva a uma perda de nitrogênio, na forma de uréia, de 40-55g a cada dia, o que nos leva a crer que, para evitar um balanço nitrogenado negativo, uma dieta normal diária deve conter 40-55g de proteína de alto valor biológico. As recomendações quantitativas de proteínas nas dietas seguiram estes preceitos básicos.

A quantidade de proteína dietética recomendada pela maioria dos comitês especializados em nutrição tem variado entre 0,8 (Canadian Department of National Health and Welfare, 1983; Us Food and Nutrition Board, 1989; Food and Agricultural Organization, 1985), 1,0 (Australian National Health and Medical Research Council, 1987; Dutch Nutrition Board, 1988 – para mulheres) e 1,2 g·kg⁻¹ de peso corporal por dia (Dutch Nutrition Board, 1988 – para homens) para indivíduos adultos saudáveis.

O indivíduo em situações específicas (crescimento, gestação, atividade física e convalescença), necessita de uma quantidade maior de proteínas dietéticas para manter um balanço nitrogenado positivo (Lemon 1997; Benyon, 1998; Wagenmakers, 1998)

Principais Reações no Metabolismo de Aminoácidos

Existem duas reações genéricas no metabolismo dos aminoácidos: transaminação e desaminação oxidativa.

Transaminação: converte um aminoácido em outro, onde aminotransferases (ou transaminases) catalisam a transferência de um grupo amino(NH₃⁺) de um aminoácido para um α -cetoácido (piruvato, oxaloacetato) ou α -cetogluturato, resultando em um novo aminoácido e um novo cetoácido. Se o aceptor é o α -cetogluturato, o glutamato é

produzido. As reações de transaminação são reversíveis e ocorrem tanto no citosol como na mitocôndria e são dependentes do piridoxal fosfato derivado da vitamina B₆ (Murray *et al.*, 1996). As mais comuns são as reações catalisadas pela alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

Desaminação Oxidativa: tem a função de remover o amino grupo. Como exemplo podemos citar a glutamato desidrogenase que remove o grupo amino do glutamato levando-o a α -cetoglutarato mais NH_4^+ . Esta reação ocorre na mitocôndria e pode utilizar como cofator tanto o NAD^+ como NADP^+ .

O estímulo à captação de aminoácido e à síntese protéica ocorre logo após a atividade física ou jejum prolongado, o que torna as duas situações interessantes para o nosso estudo.

Jejum

Após jejum de 24h há uma degradação protéica líquida maior que a síntese (Cheng, 1987, Pacy 1994). Isso implica que aqueles aminoácidos, não metabolizados no músculo, são liberados na proporção em que ocorrem nas proteínas, enquanto há uma discrepância naqueles que são transaminados, oxidados ou sintetizados. Nos membros inferiores e superiores humanos há uma liberação maior de glutamina (48% do total de aminoácidos liberados) e alanina (38%) (Wagenmakers, 1998) do que a quantidade presente nas proteínas musculares (7 e 9%, respectivamente). Portanto, a glutamina com dois átomos de nitrogênio por molécula é o principal transportador atóxico de N para fora do músculo.

Por outro lado, os aminoácidos de cadeia ramificada, que constituem 19% das proteínas musculares, o glutamato (7%), aspartato e asparagina (juntos, 9%) são liberados pelo músculo em menor quantidade em relação a suas ocorrências respectivas no músculo. Já o glutamato é constantemente captado da corrente sangüínea para o músculo.

Em resumo, os aminoácidos de cadeia ramificada, o glutamato, o aspartato e a asparagina derivados da degradação protéica muscular e o glutamato sérico são

metabolizados no músculo e usados para a síntese *de novo* de glutamina e alanina após jejum de 12h ou mais, ou atividade física. Todos os outros aminoácidos são liberados para a circulação na proporção equivalente a ocorrência no músculo, implicando em uma pequena ou inexistente metabolização (Wagenmakers, 1998).

Como visto, durante os primeiros dias de jejum existe uma degradação rápida das proteínas musculares, fornecendo aminoácidos que são usados pelo fígado na gliconeogênese. O cérebro, então, continua a utilizar exclusivamente glicose como combustível. A medida em que o jejum vai se prolongando (2 ou 3 semanas), a velocidade de proteólise muscular diminui e os corpos cetônicos plasmáticos são usados como combustível para o cérebro. Essas alterações metabólicas que ocorrem durante o jejum permitem que todos os tecidos tenham um suprimento adequado de combustível molecular pelo maior tempo possível (Salway, 1999; Murray *et al.*, 1996).

Proteína e Atividade Física

Muitos estudos abordando o consumo de proteínas e sua relação com o exercício físico têm sido publicados nos últimos anos. Estes trabalhos demonstram, em tese, que a participação dos aminoácidos no metabolismo energético é mais importante do que se pensava. Parece clara a necessidade de um aporte protéico maior para os praticantes de atividade física de força ou resistência e, mesmo não havendo definição dos requerimentos em proteína para esportistas, um amplo segmento da população brasileira que pratica esporte ou fisiculturismo já consome dietas ricas em proteínas e outros suplementos (Araújo & Soares, 1999; Kaneshiro, *et al.* 1999).

Segundo Lemon (1997), evidências indicam que indivíduos envolvidos com exercícios de força/potência/velocidade necessitam de 1,7 a 1,8 g de proteína.kg⁻¹ de peso corpóreo.dia⁻¹, enquanto que aqueles que realizam atividade de resistência precisam de 1,2 a 1,4 g de proteína.kg⁻¹ de peso corpóreo.dia⁻¹. Isto corresponde, respectivamente, a ingestas 125% e 75% maiores do que as recomendações para indivíduos sedentários e normais (Lemon, 1997). O maior requerimento de proteína no exercício de resistência deve-se, em grande parte, à utilização de aminoácidos como fonte de energia (intermediários do ciclo de Krebs). Essa mobilização de aminoácidos

durante o exercício prolongado é similar à mobilização observada no jejum, durante o qual os aminoácidos servem como substrato para a gluconeogênese. No exercício, a gluconeogênese é também gerada pela presença aumentada de alanina, que se transforma em piruvato no fígado por transaminação. Biolo *et al.* (1999) demonstraram que a capacidade da insulina de estimular a captação de glicose, o transporte de alanina e suprimir a degradação protéica no músculo é aumentada com exercício de resistência. A diminuição na disponibilidade de aminoácidos pode limitar o efeito estimulatório da insulina sobre a síntese protéica (Biolo *et al.* 1999).

Entretanto, já se observa uma ingestão maior de proteínas pelos praticantes de atividade física que, normalmente, consomem mais alimentos devido ao dispêndio energético elevado. Esse maior aporte de alimentos pode já suprir os requerimentos protéicos aumentados. Se esses praticantes de atividade física consumissem uma dieta com cerca de 10% do valor energético em proteína já seria, na opinião de Lemon (1997), suficiente para atingir os requerimentos aumentados deste macronutriente. O receio de muitos, no que se refere à ingestão excessiva de proteínas, baseia-se na possibilidade de causar problemas hepáticos e renais. Mas a relação da dieta de alto teor protéico com efeitos indesejáveis para o fígado e os rins, apesar de constituir indícios, até hoje, é pouco evidenciada cientificamente. Há também relatos de que dietas de alto teor protéico podem aumentar as perdas de cálcio na urina. A razão mais provável para esse fenômeno, quando se trata de proteínas purificadas, pode ser o efeito do fosfato que estas contêm. Nesse sentido, Allen *et al.* (1979) mencionam a relação que existe entre o alto consumo de proteína e a hipercalcúria, enquanto Hegsted (1986) sugere que o excesso de cisteína na dieta é capaz de seqüestrar íons cálcio no sangue, resultando em maior eliminação do mineral.

Evidências indicam que há mudanças nas concentrações de alguns aminoácidos livres devido à utilização deles na manutenção do alto fluxo de ciclo do ácido cítrico (de Krebs) durante a atividade física. Nessas condições, ocorre um grande aumento na síntese de intermediários do ciclo de Krebs (anaplerose do ciclo), o que permite uma alta taxa de oxidação aeróbia durante a atividade prolongada. A manutenção da síntese de intermediários do ciclo retarda a fadiga no músculo com alta depleção de glicogênio (Wandermark, 1998). Os aminoácidos não possuem uma função direta de combustível

como os ácidos graxos, a glicose sérica e o glicogênio muscular, mas sim, funcionam como precursores dos intermediários do ciclo do ácido cítrico. O músculo é o principal sítio de conversão das cadeias carbônicas dos aminoácidos em glutamina, aminoácido este com importantes funções em vários tecidos do corpo. Diferentemente do fígado, onde a maioria dos aminoácidos é normalmente oxidada, na célula muscular esquelética do rato e dos humanos, somente seis aminoácidos podem ser metabolizados, que são os de cadeia lateral ramificada (leucina, isoleucina e valina) e o glutamato, aspartato e asparagina (Wagenmakers, 1998).

Suplementos Protéicos, Oligopeptídeos e Aminoácidos na Atividade Física

A proteína é de suma importância para o organismo submetido ao trabalho físico contínuo independente da intensidade da atividade, e os interesses com seu fornecimento não estão apenas focados na quantidade consumida pelos praticantes de atividade física. Estudos vêm sendo feitos para avaliar o tipo e a forma de proteína a ser administrada, bem como os supostos benefícios aos praticantes de atividade física que usam suplementação de aminoácidos cristalinos, aminoácidos específicos e isolados protéicos. Aminoácidos de cadeia ramificada, aminoácidos sulfurados, aspartato, asparagina são oferecidos no mercado de suplementos alimentares sugerindo benefícios no aporte de combustíveis metabólicos, na hipertrofia muscular e no desempenho físico. Pelo menos em teoria, vários aminoácidos podem ser benéficos quando administrados, isoladamente (Newsholme, E.A *et al.*, 1992, HASSM *et al.*, 1994; Joshua, *et al.*, 1999) ou não (Tassi, 1998; Lands, *et al.*, 1999), em suplementação da dieta de praticantes de atividade física.

Todavia, existem relatos de complicações tais como: problemas de absorção, desbalanço metabólico, alterações na atividade de neurotransmissores e até toxicidade (Lemon, 1997). Há também indícios de que a suplementação de certos aminoácidos pode prejudicar o transporte de glicose e provocar um aumento de resistência periférica à insulina (Lancha Jr. *et al.*, 1995a), alterar a estrutura miofibrilar do músculo esquelético (Lancha Jr. *et al.*, 1997) e a atividade enzimática induzida pela lesão

muscular do exercício agudo é aumentada com a ingestão de proteína (Hayward, 1999).

Já o consumo de proteína hidrolisada, além de ser menos estudado, pode preservar os teores séricos de glicose e albumina, bem como o teor de glicogênio muscular após esforço físico exaustivo. Estudo com ratos alimentados com proteína hidrolisada demonstraram exatamente isso, apesar de não terem demonstrado alterações no rendimento do esforço físico (Tassi, *et. al.*1998). O citado trabalho mostrou que animais alimentados com α -lactalbumina mantiveram a glicemia por mais tempo, apresentaram maior concentração de albumina sangüínea e maior reserva de glicogênio muscular ao final da atividade física até a exaustão. Isso nos leva a acreditar na possível maior capacidade de recuperação do indivíduo alimentado com oligopeptídeos, ao invés da proteína inteira. Contudo, esse trabalho, pela forma em que os animais foram submetidos a atividade e pelos valores finais de lactato após a exaustão, sugere que a atividade física foi muito intensa (acima do limiar anaeróbio). O que ocorreria na atividade sub-limiar não se sabe. E ainda, em contrapartida, a ingestão de α -lactalbumina aumenta os níveis de triptofano sérico e, por ser este aminoácido precursor da 5-hidroxitriptamina (serotonina), pode estimular a fadiga central e prejudicar a resistência à atividade física (Newsholme, 1992; Markus, 2000).

Proteínas de Rápida Absorção

A explicação para os efeitos fisiológicos ocorridos devido a ingestão de proteína hidrolisada provavelmente está na velocidade em que a proteína é digerida e absorvida pelo intestino. Em analogia aos carboidratos, pesquisadores elaboraram o conceito de “proteínas rápidas e lentas” (“*slow and fast proteins*”) (Frühbeck, 1998). Borie *et al.*(1997) encontraram que a ingestão de proteínas do soro de leite (“*fast*”) leva a um aumento rápido no nível de aminoácidos do plasma sangüíneo e um concomitante aumento na síntese de proteína. Esta síntese protéica é menor quando, ao invés de proteínas do soro, se ingere caseína (“*slow*”) que, por formar coágulos no estômago, leva mais tempo para entrar no duodeno. Quanto mais rápido é a absorção e o fornecimento de aminoácido para o *pool* de aminoácidos livres, há um provável

direcionamento para as vias anabólicas. A diminuição na disponibilidade de aminoácidos pode limitar o estímulo da insulina sobre a síntese protéica (Biolo *et al.* 1999).

A concentração de cada aminoácido na proteína também pode influenciar o *turnover* protéico. A insulina, que inibe a proteólise, pode ter sua concentração plasmática influenciada pela presença de certos aminoácidos. A caseína e as proteínas do soro, apesar de ambas serem derivadas do leite, possuem diferentes proporções de aminoácidos. A alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada nas proteínas do soro leva a um efeito sinérgico estimulando a secreção de insulina. Adicionalmente, a porcentagem de aminoácidos que estimulam a secreção de glucagon, que tem efeito catabólico, é menor nestas proteínas em comparação com a caseína (Frühbeck, 1998).

Proteínas Lácteas

O leite de vaca contém cerca de 3,25% de proteína, dos quais 80% são as caseínas e o restante (20%) são as do soro.

As caseínas são importantes proteínas funcionais do leite e servem de base para um amplo setor da produção de derivados lácteos, particularmente na indústria de queijo. A seqüência dos aminoácidos na estrutura primária das caseínas determinam uma hidrofobicidade superficial às suas estruturas secundárias.

As caseínas podem ser divididas em quatro grupos: α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, κ -caseína e β -caseína. De um modo geral, não sendo estas o principal foco de estudo para nós, é importante lembrar que a caseína é de difícil digestão para o homem por não ser solúvel e formar coágulos no estômago, resultando em uma absorção lenta. O leite humano possui 60% menos caseína em comparação ao leite de vaca.

Nos anos recentes, cientistas começaram a investigar a capacidade de certos tipos de proteínas de melhorar resposta do sistema imunológico, prevenir doenças e evitar o estresse oxidativo. Eles descobriram que essas proteínas podem gerar efeitos no metabolismo de animais e homens. Com este escopo, começaram a focar suas

atenções em produtos protéicos como a chamada “whey protein”, isto é, proteína de soro de leite.

Dentre as proteínas do soro do leite, encontram-se a β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina de soro bovino, imunoglobulinas, lactoferrina, γ -globulina, lactoperoxidase, etc.. Mas o concentrado protéico de soro de leite pode ser dividido em quatro frações que perfazem mais de 90% do conteúdo protéico do produto em epígrafe. Estas quatro porções protéicas são: β -lactoglobulina (45-57%), α -lactoalbumina (15-25%), albumina de soro bovino (10%) e imunoglobulinas (10%) (Whitney, 1988).

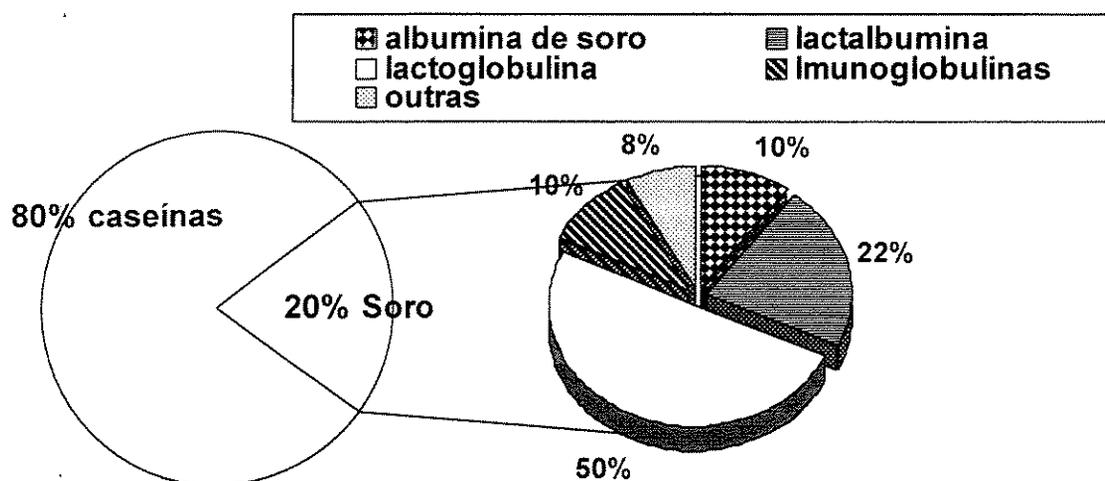


Figura 1: Proteínas do leite de vaca. 20% das proteínas constituem o soro que é dividido em globulinas albuminas e outras

O soro de leite líquido precisa passar por uma série de processos para a produção do Concentrado Protéico de Soro de leite (CPSL): ultrafiltração, diafiltração para separação da lactose e minerais, e secagem que pode ser por “spray-dried”.

Funcionalidade Fisiológica das Proteínas do Soro Lácteo

Cada uma dessas proteínas tem importantes funções na prevenção a doenças. Sem um suporte protéico adequado, nosso corpo não pode produzir as estruturas que

formam nossas células, tecidos e órgãos, nem gerar substâncias necessárias para as funções cardiovasculares, contração muscular, crescimento e recuperação.

Novas funções têm sido descobertas para as proteínas e já se pesquisa a possibilidade da utilização específica de algumas proteínas para aumentar a longevidade. Pesquisas demonstram que essas proteínas poderiam gerar outros efeitos no metabolismo de animais e humanos. Mais especificamente, estudos começaram a focar as proteínas do leite (caseína e proteínas do soro) e a funcionalidade dos peptídeos derivados de fontes alimentares animais (Hasler, 1998).

Ao se ingerir proteínas, numerosos peptídeos podem ser produzidos em vários estágios da digestão humana no estômago e no intestino delgado. Foram evidenciadas, em vários desses peptídeos, atividades biológicas importantes. Essas atividades biológicas são inúmeras podendo ser citadas funções opióide, antiipertensiva, imunorreguladora, antibacteriana, antiagregadora, antitrombótica etc. À esses peptídeos que possuem atividades biológicas, foi dado o nome de peptídeos bioativos (McIntosh, *et al.* 1998; Xu, 1998).

Desde 1979 vários peptídeos bioativos derivados do leite vêm sendo localizados, identificados e seqüenciados, mostrando possuir várias atividades “in vitro” e “in vivo”. As proteínas do leite, por possuírem importâncias fisiológicas extras, não são mais consideradas apenas como suporte de aminoácidos para mamíferos em crescimento.

Além do valor biológico, escore químico e da eficiência protéica como um todo, as proteínas do soro de leite podem causar mudanças fisiológicas e metabólicas no organismo que a ingere. O conhecimento dessas diferenças em relação à caseína e às outras fontes protéicas dietéticas pode ser de grande valia para várias situações. Além do fornecimento de peptídeos bioativos, das características estruturais citadas que resultam em uma maior velocidade de absorção e seus efeitos metabólicos/fisiológicos, a composição aminoacídica (sulfurados, aminoácidos de cadeia ramificadas, etc.) dos peptídeos derivados do Concentrado Protéico de Soro de leite (CPSL), entre outras propriedades, têm chamado a atenção de vários pesquisadores.

Composição Aminoacídica

Aminoácidos Sulfurados

CPSL e sistema imune

O CPSL possui alta concentração de aminoácidos sulfurados, principalmente cistina, que contém cisteína. Esse aminoácido semi-essencial é precursor indispensável da glutatona (GSH). A glutatona é molécula multifuncional encontrada nas células dos tecidos animais que auxilia na eliminação de compostos xenobióticos, alguns dos quais carcinogênicos. Outras funções são de ajudar na funcionalidade do sistema imunológico. A glutatona age como antioxidante destruidor de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), pelo que se considera também como agente protetor contra efeitos danosos de bactérias, vírus e poluentes (McIntosh, *et al.* 1998).

CPSL e câncer

Nos últimos anos, têm sido feitos estudos experimentais e epidemiológicos para avaliar o efeito da alimentação habitual no desenvolvimento de câncer. Esses testes focaram, principalmente, as fibras dietéticas e as gorduras. Mais recentemente, micronutrientes e outras substâncias “nutracêuticas” ou “funcionais” (nomes mais comuns) têm sido avaliadas. Enquanto isso, pouco conhecimento se adquiriu sobre as proteínas dietéticas e a carcinogênese. Alguns experimentos avaliaram a quantidade consumida de proteína e de aminoácidos (Visek, 1986). Os primeiros estudos a esse respeito sugeriram o efeito do consumo de produtos lácteos no desenvolvimento de tumor e, atualmente, são as proteínas do leite e seus fornecimentos de peptídeos o maior foco de pesquisa. É hoje de grande interesse o papel das proteínas do leite na prevenção do câncer (Fonseca, *et al.*, 1999, Parodi, 1998).

Mais especificamente, como dito, as proteínas do soro de leite, por serem ricas em substratos sulfurados, aumentam a concentração de glutathione (GSH) em vários tecidos. Isso sugere uma anulação da inibição da síntese de GSH e uma inibição da carcinogênese pelas proteínas de soro de leite (Bounous, *et al.*, 1991, Parodi, 1998).

CPSL e Imunodepressão

Seguindo a mesma linha de raciocínio, por serem as proteínas de soro estimuladoras do sistema imunológico, alguns pesquisadores já as sugerem no tratamento de pacientes imunodeprimidos (Bounous, *et al.* 1993).

CPSL e fadiga muscular na atividade física

O estresse oxidativo contribui para a fadiga muscular. Como o GSH é o principal antioxidante intracelular e sua síntese é dependente da biodisponibilidade de cisteína, o fato das proteínas de soro de leite serem uma boa fonte de cisteína pode aumentar o GSH intracelular e retardar a fadiga. A suplementação de outras formas de cisteína como N-acetilcisteína pode retardar a fadiga muscular (Reid, *et al.*, 1994). Porém, existem significativos efeitos adversos relacionados com a cisteína extracelular. A cisteína na forma de glutamincisteína entra na célula mais rapidamente. O concentrado protéico de soro de leite possui relativa abundância de glutamincisteína quando hidrolisado pelas enzimas digestivas humanas (Lands, *et al.*, 1999).

Aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina)

Vários trabalhos foram realizados com suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada para praticantes de atividade física. Podemos lembrar que a forma mais rapidamente biodisponível dessa suplementação não é na forma de aminoácidos cristalinos, e sim dos peptídeos que contém os resíduos de aminoácidos. As proteínas de soro de leite possuem boas quantidades destes aminoácidos, principalmente leucina (Regester, 1996). Esses também podem ser úteis na nutrição clínica hospitalar para recuperação de debilitados (Frühbeck, 1998, Borie, *et al.* 1997).

Triptofano

A serotonina, um neurotransmissor, pode melhorar a capacidade de superação do estresse e da depressão. A α -lactalbumina, proteína do soro de leite, é particularmente rica em triptofano podendo aumentar os níveis desse aminoácido no plasma sanguíneo de quem a consome. O triptofano plasmático é o precursor da serotonina no hipotálamo e sua captação pelo cérebro é diretamente proporcional a concentração sérica (Markus, et al., 2000). A relação entre triptofano e aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) na circulação é determinante para uma maior produção de serotonina, pois o triptofano compete com os ACR pelo sítio de entrada no hipotálamo (Newsholme, et al., 1992).

Possíveis desvantagens do CPSL

Mas como em nutrição tudo tende a um equilíbrio, é coerente aqui tentar amenizar a euforia a estes “superalimentos” e lembrar alguns possíveis riscos provenientes do consumo destas fontes protéicas.

É preciso esclarecer alterações indesejáveis possíveis de ocorrer no uso crônico e agudo do CPSL. Além dos efeitos alergênicos, principalmente da β -lactoglobulina, mesmo nos hidrolisados enzimáticos, é preciso observar outros efeitos adversos como resistência periférica a insulina e danos as células musculares provocados por altos níveis de aminoácidos plasmáticos (Lancha Jr., 1995), depleção de cálcio (Hegsted, 1987), entre outros.

A α -lactalbumina pode aumentar os níveis de triptofano no plasma sanguíneo, como descrito acima, isso pode ser indesejado pelos praticantes de atividade física que queiram retardar a fadiga (Newsholme, et al., 1992). Cabe esclarecer se o fato das

proteínas de soro conterem aminoácidos de cadeia ramificada compensa e mantém o balanço destes com o triptofano.

3. Artigos de pesquisa

3.1 Caracterização e avaliação da Qualidade Nutricional das Proteínas do Soro Lácteo, Intactas e com Alto Grau de Hidrólise.

André Godoy Ramos

Jaime Amaya-Farfan

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição - FEA/UNICAMP
R Monteiro Lobato, 80, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, CEP 13081-970, CP 6121

Resumo

As proteínas do soro de leite, além de possuírem um alto valor biológico e escore químico superior à de outras proteínas de origem animal, são consideradas proteínas de rápida absorção. O objetivo deste trabalho foi caracterizar um concentrado protéico de soro de leite comercial (CPSL), por meio da sua composição aminoacídica e do seu valor nutricional bem como de seu hidrolisado comercial. O grau de hidrólise deste último também foi determinado. Três grupos de ratos *Wistar*, machos (200g de peso) foram alimentados com dietas purificadas (AIN-93M), contendo como única fonte protéica o CPSL ou seu hidrolisado enzimático (CPSLH) ou caseína (controle). Ambas as formas da proteína de soro mostraram uma maior disgestibilidade *in vivo* em relação à caseína. Apesar do maior consumo de dieta pelo grupo com caseína, os três grupos de animais não apresentaram diferenças significativas no crescimento, nem nas concentrações de insulina plasmática e nem no glicogênio muscular ou hepático, que pudessem ser atribuídas ao tipo de proteína na dieta. Os resultados demonstraram que a qualidade nutricional das proteínas do soro de leite, independente de hidrólise prévia, é comparável à da caseína, com alta retenção de nitrogênio, alto valor biológico e bom coeficiente de eficiência protéica (PER). Concluimos, ainda, que o consumo de proteínas de rápida absorção, com ou sem hidrólise, pelo organismo sedentário, não aumentou o anabolismo e/ou a síntese de proteínas e carboidratos (glicogênio) quando comparado com a caseína. Estes possíveis efeitos da ingestão de proteínas de rápida absorção talvez só ocorram em animais que tenha um maior estímulo à captação de aminoácidos e glicose pela célula muscular (atividade física e jejum).

Palavras-chave: Proteína de soro; proteína hidrolisada; retenção de nitrogênio; metabolismo protéico

Abstract

Characterization and Evaluation of the Nutritive Quality of Milk-Whey Proteins in both the Intact and Highly Hydrolyzed States

Milk whey proteins, in addition to its high biological value and chemical score, as compared to other proteins of animal origin, are considered as *fast proteins* due to their high absorption rate. This work characterizes a commercial cow's milk whey protein concentrate (WPC) and a hydrolyzate (HWPC) with high degree of hydrolysis, with regard to their amino acid composition, degree of hydrolysis and classical nutritive value. For the nutritional study, three groups of rats (male Wistar, 200g) were fed diets (AIN 93-M) containing either WPC, HWPC or casein (control) as the only source of protein. Both of the whey proteins showed higher *in vivo* digestibility than casein. In spite of the fact that diet consumption by the casein group was significantly higher, this did not lead to a significant difference in growth. In addition, no differences were noticed in both plasma insulin and muscle or liver glycogen, that could be attributed to the type of dietary protein. Results show that the milk whey proteins, regardless of being or not hydrolyzed prior to ingestion, are of nutritive quality comparable to that of casein, exhibiting high nitrogen retention, biological value and protein efficiency ratio. It is concluded that short-term consumption of the fast proteins of milk whey by the sedentary rat did not increase anabolism or promoted the synthesis of proteins or carbohydrates (glycogen), as compared to casein. The possibility that metabolic alterations upon consumption of fast absorbing proteins do occur under activity or dietary conditions that stimulate a higher amino acid uptake, however, is not necessarily excluded.

Keywords: protein hydrolyzate; protein metabolism; whey protein; protein dietary

3.1.1 Introdução

O Concentrado Protéico de Soro de Leite é, hoje em dia, uma das principais fontes protéicas utilizadas em suplementos alimentares industrializados para consumo humano de forma terapêutica ou não. As proteínas lácteas presentes no soro possuem alto valor nutricional, alto valor biológico e boa digestibilidade (Regester, *et al.*, 1996).

Além dessas qualidades, outras propriedades das proteínas do soro têm chamado a atenção de pesquisadores, como são a grande facilidade com que liberam os seus aminoácidos à corrente sangüínea, gerando um maior estímulo às vias anabólicas, particularmente à síntese protéica (Frühbeck, 1998; Borie *et al.*, 1997), e também a característica potencializadora do sistema imunológico (Bounous, *et al.*, 1991; McIntosh, *et al.* 1998; Parodi, 1998; Fonseca, *et al.*, 1999). Essas proteínas, por serem solúveis, permanecem menos tempo no estômago, chegando, conseqüentemente, mais rápido no duodeno e fazendo com que seus peptídeos tenham uma maior velocidade de absorção. O bom escore químico das proteínas do soro lácteo pode, também, alterar a síntese protéica e de glicogênio muscular. Isso poderia ocorrer devido a um aumento na secreção de insulina estimulada pela concentração de aminoácidos de cadeia ramificada. A rápida disponibilidade de aminoácidos na corrente sangüínea também poderia estimular o anabolismo protéico em indivíduos submetidos à degradação de proteínas musculares (Biolo, *et al.* 1997). Porém, uma vez reduzida a disponibilidade de aminoácidos, o estímulo da insulina sobre a síntese protéica pode diminuir (Biolo *et al.* 1999)

Como início de uma série de trabalhos, este experimento visou avaliar a qualidade nutricional do concentrado protéico de soro de leite, sendo tanto na forma de proteínas intactas (CPSL), como na forma de proteínas hidrolisada (CPSLH). Além dos parâmetros clássicos acima mencionados, o trabalho objetivou avaliar os efeitos da alimentação com essas fontes protéicas na concentração sérica de insulina e nos estoques de glicogênio muscular e hepático do rato, durante um período de 10 dias.

3.1.2 Material e Métodos

Fontes Protéicas

As matérias-primas protéicas, derivadas do soro de leite, utilizadas neste experimento foram doadas pela empresa NZMP do Brasil Ltda., São Paulo. A empresa forneceu dois produtos: ALACEN™ 895, concentrado protéico de soro de leite (CPSL) e ALATÁL™ 821, concentrado protéico de soro de leite hidrolisado (CPSLH). Estes dois produtos foram fabricados pela New Zealand Milk Products, INC.

Determinação do perfil aminoacídico das fontes protéicas utilizadas

Para análise das proteínas do soro de leite e seu hidrolisado enzimático, amostras de CPSL e de CPSLH foram submetidas a hidrólise com solução 6 N de HCl, a 110°C, por vinte e duas horas. O ácido clorídrico foi evaporado em rota-evaporador após filtração em vidro poroso. O conteúdo foi diluído e transferido para um balão com tampão citrato de sódio (pH 2,2) com quinze por cento de polietilenoglicol-400.

A composição qualitativa e quantitativa dos aminoácidos do CPSL e os oligopeptídeos foi realizada no cromatógrafo Thermo-Separation Products (Riviera Beach, Fla, U.S.A.) com coluna de troca iônica de resina poliestirênica sulfonada e detecção pós-coluna com ninidrina (Pickering, Mountain View, U.S.A.; método de SPACKMAN *et al.*, 1958). A detecção foi feita nos comprimentos de onda 570 e 440 nm, na escala de 0,0 até 0,1 de absorvância. Foi usada uma solução padrão de aminoácido (Pierce Chemicals Company, Inc., Rockford, U.S.A.), como padrão externo.

Determinação do conteúdo de aminoácidos livres no proteolizado enzimático de soro de leite

Foram feitas duas técnicas de extração de aminoácidos livres, uma na qual usamos o ácido sulfosalicílico (SSA) como agente precipitante da proteína e outra em

que o agente precipitante foi o ácido tricloroacético (TCA). No primeiro caso, 4ml de SSA 3,5% foram adicionados a um grama de amostra, agitado-se e centrifugando a 8000 rpm durante 15 minutos. Uma alíquota de 0,4 ml foi retirada e diluída em 0,2ml de tampão citrato de lítio (0,15N) e estocado até a análise quantitativa, conforme descrito acima.

Para as amostras extraídas com TCA, 1g do hidrolisado foi suspenso em 100ml de água. Posteriormente, 10ml da alíquota formada foram misturados a 10ml de TCA a 20% e então centrifugado a 12100×g durante 15 minutos. Retiramos a porção precipitada e a parte solúvel foi injetada no analisador de aminoácido para a mesma análise quantitativa citada no parágrafo anterior.

Análise do grau de Hidrólise do CPSH

Primeiramente, 1g do hidrolisado foi suspenso em 100ml de água destilada. Retirou-se 1 ml da alíquota para análise quantitativa de nitrogênio pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1975). Então, 10ml da mesma alíquota foram misturados a 10ml de TCA a 20% e a mistura centrifugada a 12100×g durante 15 minutos. Foi quantificado o conteúdo de nitrogênio (micro-Kjeldahl) na porção sobrenadante do centrifugado. O percentual do grau de hidrólise foi determinado através da seguinte fórmula (KIM, 1990):

$$\%GH = \frac{N_{solúvelTCA_{10\%}}}{N_{total}} \times 100$$

Dietas

As dietas experimentais foram preparadas segundo a formulação preconizada pelo *American Institute of Nutrition* (Reeves, *et al.*, 1993) para a dieta AIN-93-M, utilizada para manutenção de roedores. A composição comum das dietas em 1000g foi: 132,000g de amido de milho dextrinizado, 100,000g de sacarose, 70,000g de óleo de soja, 35,000g da mistura de minerais, 10,000g da mistura de vitaminas, 3,500g de bitartarato de colina, 0,014g de tert-butilidroquinona.

Foram determinados os teores de proteína dos produtos protéicos CPSL (ALACEN™ 895) e CPSLH (ALATAL™ 821) pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1975). Feito isto, as dietas foram ajustadas nos seus conteúdos de carboidrato (amido de milho), com vistas a serem isoprotéicas (10%), isoenergéticas e isolipídicas.

Para o grupo controle foi elaborada uma dieta semelhante contendo, como única fonte protéica, caseína acrescida de 3g de L-cistina por kg.

Animais

Para os ensaio biológicos foram utilizados ratos (n=30) machos, de linhagem *Wistar*, de 200g de peso corpóreo aproximado, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP.

Ensaio Biológico

Os animais foram distribuídos em três grupos conforme as dietas isoprotéicas (10%) e isoenergéticas: Grupo 1 (n=10) – Dieta padrão de caseína ; Grupo 2 (n=10) – Dieta com CPSLH e Grupo 3 (n=10) – Dieta com CPSL. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, em uma sala de temperatura controlada (22°C) e com período dia/noite de 12h, com ração (dieta) e água *ad libitum*. O ensaio teve duração de doze dias, tendo sido feita a coleta de urina e fezes no período do sexto ao nono dia. No décimo dia, após jejum de 12 horas, retirou-se amostra de sangue pela cauda para análise de insulina, sendo alimentação retomada em seguida.

Vinte e quatro horas depois, no décimo segundo dia, os animais foram sacrificados com um jejum de quatro horas para diminuir as diferenças em relação ao tempo da última ingestão de alimentos. Para o sacrifício, foi injetado de forma subcutânea cerca de 0.31 ml de solução anestésica pentobarbital sódico (HYPNOL®) na concentração de 30mg/ml. Esta quantidade foi calculada para cada animal a fim de administrar 0,46mg do anestésico por grama de peso corpóreo. Amostras de fígado e

de músculo (sóleo e gastrocnêmio) foram extraídas para a determinação do teor de glicogênio.

O experimento passou por avaliação da Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

Coleta de material

Nos últimos quatro dias, foram coletadas as fezes e a urina dos animais para determinação de nitrogênio fecal e urinário. As fezes foram secas em estufa a 40°C até se manterem em um peso constante e, logo após, trituradas. A determinação de Nitrogênio das amostras de urina e fezes de cada rato foi feita pelo método de micro-Kjedahl (AOAC, 1975).

Determinações do ensaio biológico

Os cálculos da Digestibilidade Aparente (D_a), do Balanço de Nitrogênio (BN), Valor Biológico Aparente (VB_a) (Sgarbieri, 1996), seguiram as seguintes fórmulas:

$$D_a = \frac{NI - NF}{NI} \times 100 = \frac{NA}{NI} \times 100$$

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

$$VB_a = \frac{NI - (NF + NU)}{NI - NF} \times 100 = \frac{N_{\text{retido}}}{N_{\text{absorvido}}} \times 100$$

$$PER = \frac{\text{ganhodepes o(g)}}{\text{proteínain gerida (g)}}$$

$$NPU = \frac{NR}{NI} \times 100$$

onde: NI = nitrogênio ingerido, NR = nitrogênio retido, NF = nitrogênio fecal, NA = nitrogênio absorvido e NU = nitrogênio urinário.

Glicogênio muscular e hepático

Foi feita a determinação de glicogênio muscular em duas etapas: extração do glicogênio pelo método de Sjorgreen, *et al.* (1938) e colorimetria preconizado por Lo Siu & Taylor (1970).

A determinação de glicogênio nos tecidos musculares e hepáticos foi realizada conforme os seguintes passos:

- 1- Pesagem das amostras imediatamente após a extração do tecido. As frações obtidas do tecido hepático pesaram ao redor de 500mg; as amostras de músculo pesaram 100g (sóleo) e 200g (gastrocnêmio).
- 2- Acondicionamento imediato em tubo de ensaio com 2ml (fígado) ou 1mL (músculo) de solução de KOH a 30%.
- 3- Digestão em "banho-maria" a 100°C por 60 minutos.
- 4- Precipitação do glicogênio. Adição de 200 μ L(fígado) ou 100 μ L (músculo) de Na₂SO₄, agitação e acréscimo de 7mL (fígado) ou 3,5mL(músculo) de álcool etílico. Centrifugação a 4000 rpm por 10min. O sobrenadante foi descartado.
- 5- O precipitado foi suspenso em 25 mL (fígado) ou 5mL (músculo) de água desionizada.
- 6- Fase colorimétrica

Em tubo de ensaio, adicionamos 800 μ L (músculo) ou 950 μ L (fígado) de água destilada, 10 μ L de fenol e 200 μ L (músculo) ou 50 μ L (fígado) da amostra e mais 2,5mL de ácido sulfúrico. Os tubos foram colocados em "banho-maria" por 10 minutos. A curva padrão foi preparada a partir de 4 padrões com 25 μ L, 50 μ L, 100 μ L e 150 μ L de "solução mãe" de glicose a 0,2% mais 5ml de água destilada. Retirou-se 1mL de cada uma das soluções para 4 tubos de ensaio(triplicata) e adicionou-se 10 μ L de fenol e 2,5mL do ácido sulfúrico.

Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 490nm.

Insulina

A insulina sérica foi determinada por radioimunoensaio (Hebert *et al.*, 1965). As amostras do soro sangüíneo dos ratos foram retiradas em dois momentos, uma com o animal em jejum e outra após o sacrifício. Primeiramente, retirou-se 75 µl de sangue da extremidade da calda dos animais em jejum, através de capilares sem anticoagulante, que foram acondicionados em ependorfes com 200 µL de solução salina 0,9 % e centrifugado por 10 minutos a 2800 rpm e então retirado o soro. Já as amostra dos animais sacrificados o sangue retirado logo após o sacrifício foi imediatamente centrifugado e retirado o soro.

Foram retirados, em duplicatas, 100 µL destas amostras de soro sangüíneo nos quais receberam a seguir 0,2 ml de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com ¹²⁵I (traçador) em tampão fosfato pH 7,4 acrescido de NaCl 0,9% e albumina 0,5%. Após 48h de incubação, preparou-se carvão para RIE da seguinte forma: para 100 ml de tampão fosfato, albumina 0,5% (0,5g), Dextran T 70 0,25% (0,25g) e carvão 2,5% (2,5g). Após 20 minutos em geladeira agitando constantemente, pipetou-se 200µL desta solução carvão em todas as amostras, que por sua vez, foram agitadas e mantidas durante 20 minutos em geladeira. Os tubos foram centrifugados à 2600 rpm por 20 minutos a 4°C, desprezou-se o sobrenadante e a radiação gama do precipitado foi lida (Scott, *et al.*, 1981).

Análise Estatística dos Dados do ensaio biológico (n = 10x3)

As diferenças entre os grupos da Digestibilidade Aparente (D_a), do Balanço de Nitrogênio (BN), Valor Biológico Aparente (VB_a), Utilização Líquida da Proteína Aparente (NPU_a) e o Quociente de Eficiência Protéica (PER) foram avaliados e os dados numéricos submetidos à análise de variância e teste de Duncan e Tukey, considerando diferença significativa o valor de $P < 0,05$.

3.1.3 Resultados

Os perfis aminoacídicos das fontes protéicas utilizadas no experimento foram bastante coincidentes nas duas formas de concentrado protéico de soro de leite. Apenas o teor de cistina no CPSLH se mostrou menor do que no CPSL. Os aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina), a treonina e a lisina estão em maior quantidade no soro lácteo do que na caseína (Figura 1). Observa-se também que os sulfurados (cistina e metionina) estão em maior quantidade nas proteínas do soro de leite.

Ao compararmos outras proteínas de alto valor biológico (Tabela 1), observa-se que as proteínas do soro de leite possuem um excelente escore químico chegando a ser superior a outras proteínas de origem animal.

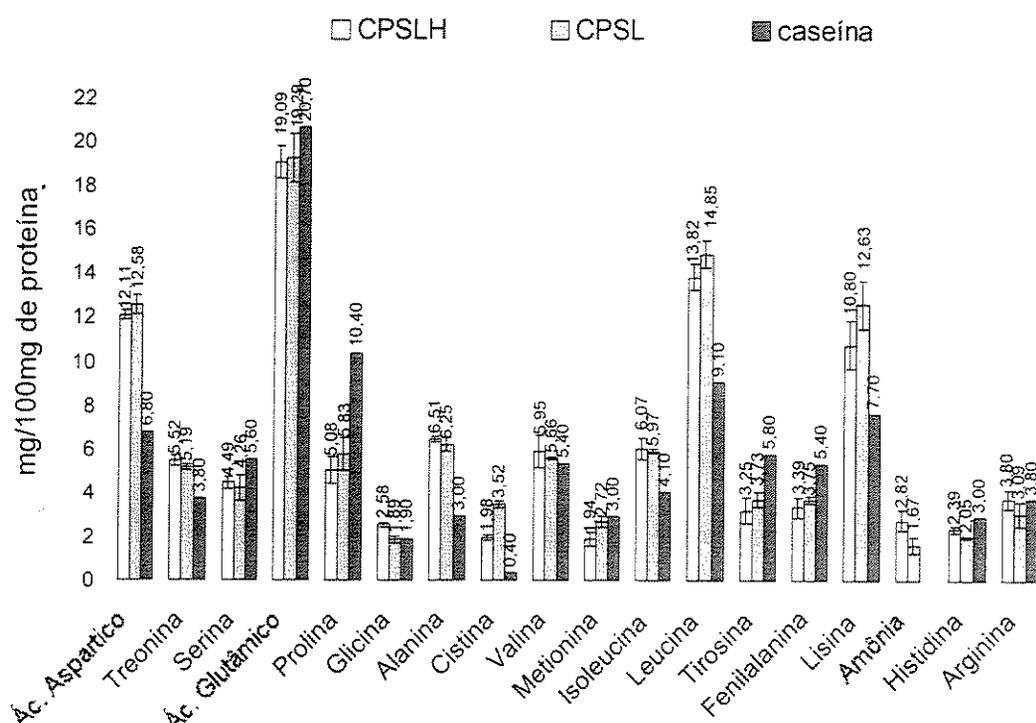


Figura 1. Comparação dos perfis de aminoácidos do CPSL, hidrolisado e intacto, com a caseína.

Tabela 1. Comparação dos perfis aminoacídicos do concentrado protéico de soro de leite, íntacto e hidrolisado, com outras proteínas de alto valor biológico.

Aminoácidos (mg/g de proteína bruta)	Composição Observada					
	Leite Humano*	Ovo*	Leite de Vaca*	Carne Bovina*	CPSL	CPSLH
Histidina	26	22	27	34	21	25
Isoleucina	46	54	47	48	60	61
Leucina	93	86	95	81	149	138
Lisina	66	70	78	89	126	108
Metionina+cistina	42	57	33	40	62	40
Fenilalanina+tirosina	72	93	102	80	75	67
Treonina	43	47	44	46	52	55
Triptofano	17	17	14	12	25	20
Valina ¹	55	66	64	50	57	60
Total incluída histidina	460	512	504	479	627	574
Total excluída histidina	434	490	477	445	606	549

*Fonte: FAO/WHO, 1985.

O grau de hidrólise (GH) do proteólisado usado neste experimento, pelo método acima descrito, resultou em 31,6%, o que demonstra concordância com o valor declarado pelo fabricante (29%). A Figura 2 e a Tabela 2 mostram que os aminoácidos livres do CPSLH são, basicamente: arginina, fenilalanina, tirosina, lisina e leucina, e se compararmos com um hidrolisado de alfa-lactalbumina de menor grau de hidrólise (GH = 14,4 %), observa-se uma quantidade bem menor de aminoácido na sua forma livre.

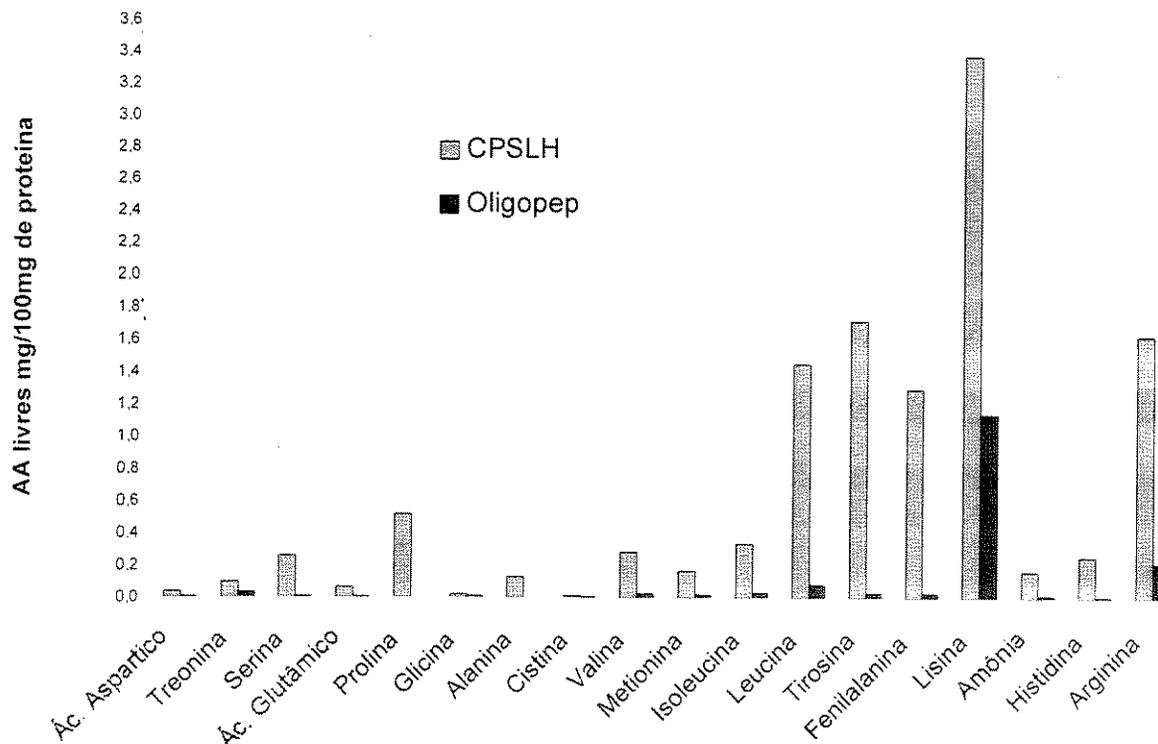


Figura 2. Quantidade aproximada de aminoácidos livre no CPSLH (ALATAL 821) e albumina hidrolisada (oligopep)

Tabela 2: Quantidade aproximada de aminoácidos livres no CPSLH(ALATAL821)

Aminoácidos (AA)	AA totais (mg/100mg)	AA livres (mg/100mg)	AA livres (% do total)
Serina	4,5	0,3	5
Prolina	5,1	0,5	10
Leucina	13,8	1,5	11
Isoleucina	6,1	0,3	4
Tirosina	3,2	1,7	42
Fenilalanina	3,4	1,3	36
Lisina	10,8	3,4	29
Arginina	3,8	1,6	37

A Figura 3 mostra que o crescimento dos animais, a partir do quinto dia de alimentação, foi semelhante nos três tratamentos. A diferença no crescimento dos ratos alimentados com caseína (não significativa) deve-se ao maior consumo de dieta. A Tabela 3 mostra que o consumo de dieta do grupo da caseína foi maior no período em

que foi feito o balanço de nitrogênio (sexto ao nono dia). Por este motivo, o coeficiente de eficiência protéica (PER), que leva em consideração o consumo de proteína, não diferiu, significativamente, entre os três grupos, mostrando até valores maiores para os grupos alimentados com proteínas de soro lácteo.

Tabela 3. Avaliação da Qualidade protéica em ratos adultos jovens (n=10).

Dieta	Parâmetros de Crescimento						
	Consumo Dieta (g)	NI (g)	BN	VB	Da	NPU	PER
CPSLH	57,18 (7,6) <i>a</i>	6,09 (0,9)	6,16 (0,8)	91,35 (1,2)	98,94 (0,1) <i>a</i>	90,29 (2,1)	2,59 (0,29)
CPSL	57,89 (8,5) <i>a</i>	6,25 (1,4)	5,83 (0,9)	91,69 (0,9)	99,08 (0,1) <i>a</i>	89,87 (2,1)	2,76 (0,86) <i>j</i>
Caseína	66,48 (6,6) <i>b</i>	7,26 (2,1)	6,59 (0,7)	90,84 (0,7)	97,69 (0,1) <i>b</i>	87,76 (3,9)	2,34 (0,36)

NI = nitrogênio ingerido. N = Balanço nitrogenado. VB = valor biológico e Da = digestibilidade aparente. Valores médios (\pm DP) com letras diferentes possuem diferença significativa (Duncan e Tukey). Os resultados que não apresentam letras são iguais

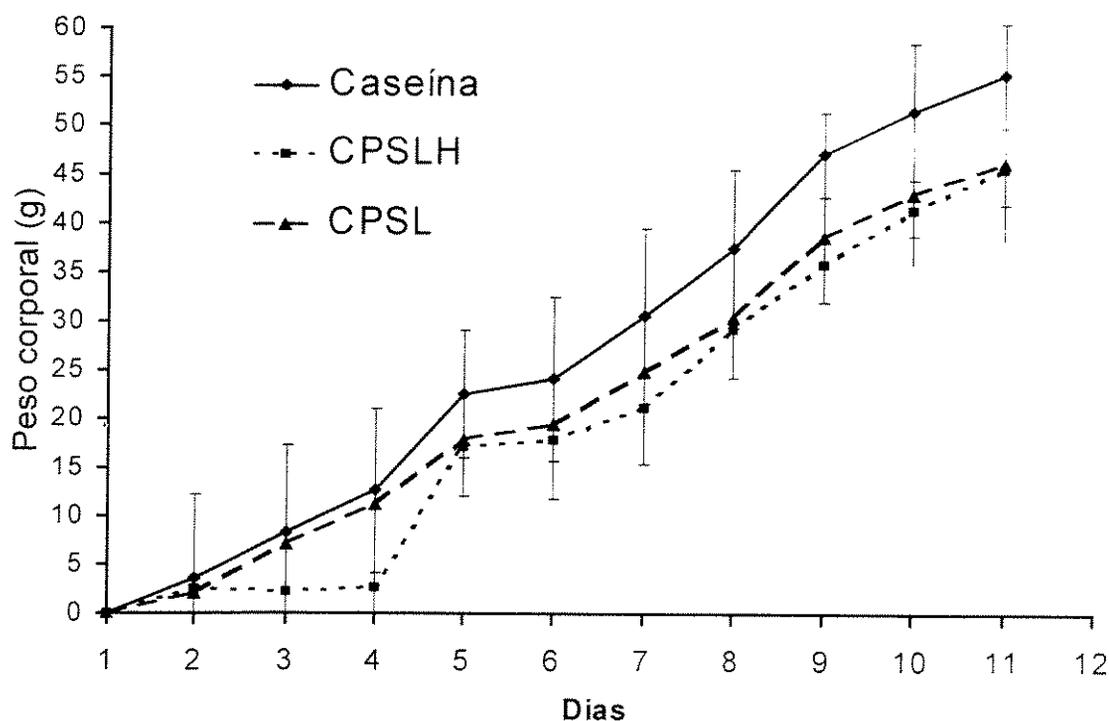


Figura 3. ganho de peso corporal de ratos durante 10 dias de alimentação com CPSL, hidrolisado e intacto, e caseína.

A insulina plasmática não diferiu nos três grupos, porém a figura 4 mostra que a concentração dos animais alimentados com CPSLH foi ligeiramente menor.

Como os animais que ingeriram a dieta com caseína (grupo controle) consumiram uma quantidade maior de alimentos e, conseqüentemente, uma quantidade maior de carboidratos, poderíamos esperar que este grupo obtivesse uma maior recuperação da reserva do glicogênio muscular gasto com o exercício. Entretanto, as reservas de glicogênio muscular não se diferenciaram em nenhum dos três tratamentos. O mesmo aconteceu com o glicogênio hepático que permaneceu inalterado com o consumo das três dietas (Tabela 4).

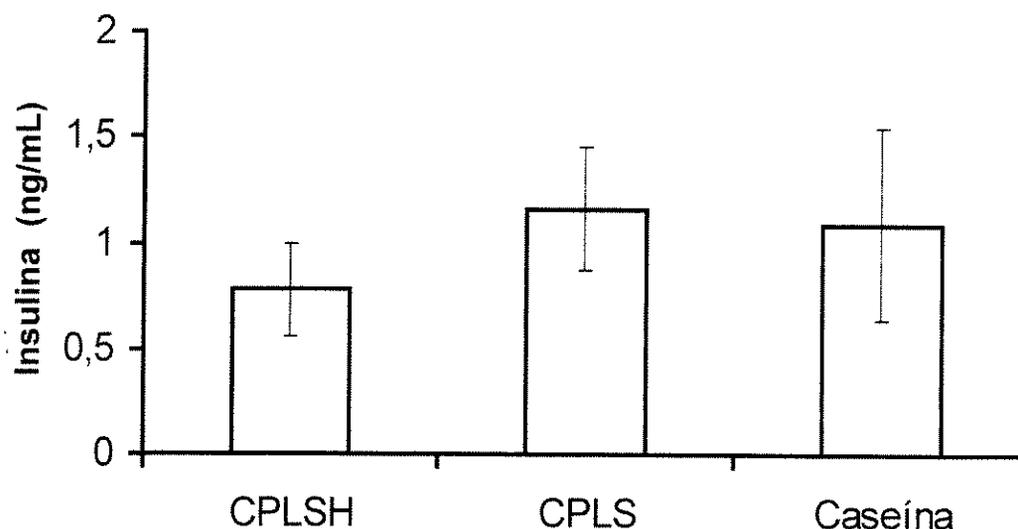


Figura 4. Efeito do tipo de proteína da dieta na concentração de insulina sérica de ratos (n=7) em jejum de 12 horas. Não contém diferença significativa. (Ducan e Tukey).

Tabela 4. Efeito do tipo de proteína na dieta na concentração de glicogênio hepático e muscular de ratos (n=7). Valores médios (\pm DP).

Dieta	GLICOGÊNIO MUSCULAR E HEPÁTICO (mg/100mg de tecido)		
	GASTROCNÊMIO	SÓLEO	FÍGADO
CPLSH	0,28 (0,03)	0,20 (0,03)	2,95 (0,43)
CPLS	0,29 (0,04)	0,21 (0,04)	3,08 (0,17)
Caseína	0,29 (0,02)	0,24 (0,01)	3,14 (0,03)

Não houve diferença significativa entre os tratamentos (Ducan e Tukey).

3.1.4 Discussão

Os resultados mostraram que, comparando as proteínas de soro de leite com a caseína, podemos observar que, como descrito por Regester, *et al.* (1996), quase todos os aminoácidos nutricionalmente essenciais apresentaram concentrações mais elevadas nas proteínas do soro.

Como os aminoácidos sulfurados (cistina e metionina) estão em maior quantidade nas proteínas do soro de leite (Figura 1) e os nossos ensaios requeriam proteínas de alto valor biológico, foi acrescentado L-cistina na dieta que tinha caseína como fonte protéica. É importante lembrar que, das várias formas que aparece a cistina, a glutamilsteína, bastante presente no soro lácteo, tem sido relatada como um peptídeo potencialmente bioativo.

Os produtos comerciais utilizados em nosso experimento, com hidrólise prévia ou não, apresentaram a boa composição de aminoácidos nutricionalmente essenciais conforme esperado para um produto a base de concentrados protéicos de soro de leite. Em relação à hidrólise prévia, o hidrolisado apresentou um bom escore químico apesar de inferior ao do intacto.

Tassi *et al.* (1998) verificaram alguns efeitos metabólicos no rato exercitado, quando alimentado com hidrolisado de alfa-lactalbumina comercial (oligopep). Eles observaram, entre outros efeitos, que estes animais treinados por cinco semanas preservaram glicogênio muscular durante atividade física prolongada. Usamos a mesma metodologia para verificar que o grau de hidrólise (GH) dessa fonte protéica hidrolisada foi de 14,4%, sendo inferior ao GH do hidrolisado (CPSL) usado no presente experimento que apresentou um GH perto dos 30%. O CPSLH apresentou cerca de 10% de aminoácidos livres enquanto a lactalbumina utilizada no experimento de Tassi *et al.* (1998), em que os animais apresentaram maiores reservas de glicogênio e concentrações de albumina plasmática no final do exercício exaustivo, mostrou uma concentração de aproximadamente 1% de aminoácidos livres (Figura 2).

Acreditamos que, além da concentração de cada tipo de proteína de soro lácteo, as diferenças metabólicas apresentadas nos estudos de Tassi *et al.*, em comparação

com o presente experimento, deram-se devido à forma em que a fonte protéica foi apresentada. Mais exatamente, podemos citar: o grau de hidrólise e o tipo de enzima utilizada na tecnologia de produção dos hidrolisados protéicos. Os resultados mostrados na Figura 2 confirmam que estes fatores influenciam na concentração de aminoácidos livres do produto hidrolisado. Provavelmente os efeitos fisiológicos inicialmente esperados para as proteínas de mais rápida absorção tenham sido reduzidos devido a uma alta concentração de aminoácidos livres. Os Aminoácidos livres são mais difíceis de atravessarem a mucosa intestinal em relação aos peptídeos e demonstram ter uma menor eficiência protéica (Zaloga 1991, Adib 1997). Há relatos na literatura (Boza *et al.*, 1995; Boza *et al.*, 2000) de que as proteínas hidrolisadas teriam melhor eficiência na síntese protéica e de substratos energéticos. Porém, é preciso mais esclarecimentos quanto ao limite de hidrólise para cada metodologia aplicada, isto é, para cada tipo de enzima ou grupo de enzimas utilizado.

As concentrações de glicogênio muscular e hepático dos animais sedentários não se alteraram, mostrando, neste caso, uma igualdade na eficiência protéico-energética das três formas das proteínas utilizadas independente do tipo e forma da fonte protéica.

O CPSLH em comparação ao CPSL apresenta cerca de 10% do total de aminoácidos na sua forma livre com a presença significativa de apenas cinco aminoácidos livres: leucina (11% do total na proteína intacta), tirosina (42%), fenilalanina (36%) lisina (29%) e arginina (37%). Ao contrário do que se pode pensar, a biodisponibilidade dos aminoácidos, quando ingeridos na forma de aminoácidos livres, é menor que os peptídeos, que são mais rapidamente absorvidos no lúmen intestinal (BORIE *et al.*, 1997, ADIB, 1997). Há produtos no mercado de suplementos alimentares para praticantes de atividade física vendidos como suplementos de aminoácidos, derivados de proteínas de soro de leite hidrolisados, com equivocado apelo mercadológico por não levar em consideração a quantidade de aminoácidos livres ou peptídeos de baixo peso molecular resultantes da tecnologia de fabricação (grau de hidrólise e enzimas proteolíticas).

Na ausência de estímulo físico (regime sedentário), os animais que se alimentaram com caseína tiveram um ganho de peso ligeiramente superior aos restantes, fato que não pode ser atribuído à proteína em si, uma vez que houve um maior consumo de dieta pelo grupo controle (caseína). Os animais que receberam a dieta com o hidrolisado (CPSLH) mostraram resposta represada, de tal forma que foram necessários quatro dias para começarem a consumir quantidades semelhantes às dos grupos com proteína intacta. Não dispomos de qualquer explicação para essa rejeição inicial, mas fatores como aroma ou gosto amargo da proteína hidrolisada não podem ser descartados. A partir do quinto dia de alimentação, a linha de crescimento do grupo alimentado com CPSLH alcançou a do alimentado com CPSL.

O valor nutritivo de uma proteína depende de vários fatores: composição; digestibilidade; biodisponibilidade dos aminoácidos; ausência de toxidade, intolerâncias ou alergias; ausência de propriedades antinutricionais. Para os animais em estudo (adultos jovens), a maior digestibilidade das proteínas do soro não contribuiu para uma maior eficiência protéica em relação à caseína. Todas as fontes protéicas utilizadas nas dietas (caseína, CPSL e CPSLH) mostraram um alto valor biológico. Os resultados na curva de crescimento (Figura 3) podem levar a crer em uma melhor eficiência da caseína em relação ao concentrado protéico de soro de leite. Entretanto, o fato do grupo alimentado com caseína ter tido um maior consumo de dieta (Tabela 3), mostra uma igual ou melhor eficiência das proteínas do soro lácteo em relação a caseína que mostrou o coeficiente de eficiência protéica (PER) tendendo a ser menor (sem diferença estatisticamente significativada).

Os valores plasmáticos de insulina mantiveram-se iguais o que mostrou que, agudamente, o suposto maior estímulo a secreção de insulina das proteínas do soro de leite, esperado por nós, pode não ter ocorrido. O fato é que o que houve foi uma tendência à diminuição, sem diferença significativa, na insulina plasmática do grupo alimentado com (CPSLH). O provável motivo para isso pode ser o fato do alto grau de hidrólise e o conseqüente alto teor de aminoácidos livres terem diminuído a velocidade de absorção de aminoácidos pelo intestino, tornando o fornecimento destes ao plasma mais demorado e, com isto, reduzido o estímulo à secreção de insulina. Já grupo

controle (caseína) compensou este estímulo à secreção de insulina com o maior consumo de dieta que proporcionou uma quantidade de carboidrato ingerida mais elevada durante o período em que a ração foi fornecida *ad libitum*.

Como não houve alterações na insulina plasmática e, provavelmente, na secreção de insulina neste período de dez dias de alimentação com as dietas, o acúmulo de glicogênio, tanto hepático quanto muscular (Tabela 4), foi semelhante para os três grupos de animais uma vez que a quantidade calórica, protéica e de carboidratos fornecidas em ambos os grupos foram iguais. A Tabela 4 mostra os valores de glicogênio muscular e hepático que não diferiram significativamente, apesar das diferentes proteínas ingeridas. De acordo com estes resultados, em recente pesquisa, Van Hall *et al.*, (2000) observaram que, quando a ingestão de carboidratos é em quantidade suficiente a captação de glicose e a síntese de glicogênio não se alteram com a ingestão de proteína.

3.1.5 Conclusões

A hidrólise enzimática prévia do concentrado protéico de soro de leite de vaca (CPSL) não alterou significativamente a composição aminoacídica da fonte protéica produzida comercialmente.

As proteínas do soro de leite de vaca possuem um bom escore químico, sendo superior ao padrão FAO-OMS. Em relação à caseína, evidenciou-se que o CPSL possui maior quantidade de aminoácidos nutricionalmente essenciais, como os de cadeia ramificada (leucina e isoleucina), bem como lisina e treonina. As concentrações de aspartato e asparagina e de cisteína (cistina) também foram superiores.

Quanto ao valor nutricional do CPSL, podemos concluir que, apesar da maior digestibilidade aparente das proteínas de soro de leite, quer hidrolisadas ou não, estas não apresentaram maior valor nutricional para o rato normal e sedentário em relação à caseína, quando administradas na sua forma pura. Entretanto, considerando o fato das proteínas do CPSL possuírem excessos de lisina, treonina e aminoácidos de cadeia

ramificada, além de aspartato e asparagina, as suas propriedades nutricionais poderiam mostrar vantagens sobre a caseína no caso de serem administradas a indivíduos fisicamente debilitados ou submetidos a esforços físicos, ou no caso das mesmas serem misturadas com proteínas de origem vegetal.

Baseado nos resultados da concentração de insulina plasmática e de glicogênio muscular, concluímos que a ingestão de concentrado protéico de soro de leite, tanto o intacto quanto o hidrolisado, pelo animal sedentário, não influenciou significativamente nem a concentração de insulina plasmática e nem a captação de glicose pela célula muscular.

O concentrado de soro lácteo, com ou sem hidrólise, apresentou um coeficiente de eficiência protéica (PER) igual ao da caseína tendendo até a ser maior. Isto nos leva a concluir que o consumo de proteínas de rápida absorção, com ou sem hidrólise, pelo organismo sedentário não aumentou o anabolismo e/ou a síntese de proteínas e carboidratos (glicogênio). Possíveis efeitos da ingestão de proteínas de rápida absorção por animais que tenha um maior estímulo à captação de aminoácidos e glicose pela célula muscular (atividade física, jejum), devem ser investigados.

3.1.6 Referências Bibliográficas

- ADIB, S.A. The oligopeptide transporter (pept-1) in human Intestine: biology and function. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 113, jul., p.332-340, 1997.
- Association of Official Analytical chemists.. *In: Official Methods of Analysis*, 12 ed. Washington. D.C., Horwitz, W. ed., p 927-928, 1975.
- BENYON, S. **Metabolism and Nutrition**, 1. ed. London. Mosby 244p., 1998.
- BIOLO, G.; TIPTON K.D.; KLEIN, S.; WOLFE R.R. An abundance supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [s.l.], v.36, n.1, p. E122-E129, 1997.
- BOIRIE Y., DANGIN M., GACHON P., VASSON M.P., MAUBOIS J.L. AND BEAUFRERE B. Slow and fast dietary proteins differentily modulate posprandial protein accretion. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA** [s.l.], v.94, p.14930, 1997.
- BOZA J. J., MARTINEZ-AUGUTIN O., BARÓ L., SUAREZ M.D., GIL A.. Protein v. enzymic Protein hidrolisates. Nitrogen utilization in starved rats. **British Journal of Nutrition**, [s.l.], v.73, p.65-71, 1995.
- BOZA J. J., MOENNOZ D; VUICHOUD J; JARRET A.R.; GALDARD-DE-WECK. Protein hidrolisate vs free amino acid-based diets on the nutritional recoveryof the starved rat. **European Journal of Nutrition**. Darmstadt , germany, v.39, n.6, p.237-243, 2000.
- CHENG, T.W.; PACY P.J.; DWORZAK, F.; FORD G.C.; HALLIDAY, D. Influence of fastingon leucine and muscle protein metabolism across the human forearm determined using L-(l-¹³C, ¹⁵N)leucine as the tracer. **Clinical Scientists**. Middlebury, v.73, p.241-246, 1987.
- DOLE, V.P. & MEINERTZ, H. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. **Journal Biological Chemistry**. Baltimore v.235, n.9, p.2595-2599, 1960.
- DUNCOMBE, W.G. Colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 9, n.2, p.122, 1964.
- DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A.; BIGGS, H.G. Albumin standards and the mesasurements of serum albumin with bromocresol green. **Clinical Chimica Acta**, Amsterdam, v.31, p.87-96, 1971.
- DRAGAN, C.I. *et al.* Studies regarding the efficiency of Supro isolated soy protein in Olympic athletes. **Ver. Roum. Physiol.**, [s.l.], v.29, n.2-4, p. 63-70, 1992.

- ELPHICK, M.D. Modified colorimetric ultramicro method for estimating NEFA in serum **Journal of Clinical Pathology**, [s.l.], v.21, p. 567, 1968.
- FAO/WHO/ ONU Expert Consultation. Energy & Protein Requirements. **WHO Tech. Rept. Ser. N° 724**, World Health Organization, Geneva, Switzerland. (1985).
- FARFÁN, J.A. Química de proteínas. 2 ed. Campinas. Editora UNICAMP, 134p. 1994.
- FRÜHBECK G.. Slow and fast dietary proteins. **Nature**, London v.391, n. 2, p.843, 1998.
- HERBERT, V.; LAU, K.S.; GOTTLIEB C.W.; BLEICHER, S.J. Coated charcoal immunoassay of insulin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s.l.], v.25, n.10, p.1375-1384, 1965.
- KANESIRO, M.A.B., OLIVEIRA, A.L., VENEAIANO, L.R.P. Consumo de suplementos nutricionais por usuários de academias em Ribeirão Preto. **In: Livro de programas e resumos do III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas -SP, FEA-UNICAMP, p.119-120, 1999.**
- KIM, S.Y.; PARK, P.S.W.; RHEE, K.C. Functional of properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 3, 1990.
- KITABATAKE, N. & KINEKAWA, Y.I. Digestibility of bovine milk whey protein and beta lactoglobulin in vitro and in vivo. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 12, p. 4917-4923, 1998.
- LOTSPEICH, W.D.; SHELTON B.J. The role of insulin in metabolism of amino acids. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore v.179, p. 175-180, 1949.
- LOWRY, O.H.; ROSERBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore v.293, p.265-275, 1951.
- MCINTOSH, G. H.; ROYLE, P.J.; LE LEU, R.K.; REGESTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L.. KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey Protein as funcional food ingredients. **International dairy journal**, [s.l.], v.8, p. 425-434, 1998.
- PACY P.J.; PRICE G.M.; HALLIDAY, D.; QUEVEDO M.R.; MILLWARD D.J. Nitrogen homeostasis in man: the diurnal responses protein syntesis and degradation and amino acid oxidation to diets with increasing protein intakes. **Clinical Science**, Middlebury v.86, p.103-118, 1994.
- POULLAIN, M.; CEZARD P.; ROGER L. MENDY F. Effect of whey protein, their oligopeptide hydrolysates and free amino acid mixtures on growth and nitrogen retention in fed and starved rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, [s.l.], v.13, n.4, p.382-386, 1989.

- REGESTER, G.O.; MCINTOSH, G.H.; LEE V.W.K.; SMITHERS G.W. Whey proteins as nutritional and functional food ingredients. **Food Australia**, [s.l.], v.48, n.3, p.123-128, março 1996.
- REEVES, P.G.; NIELSEN F.H.; FAHEY J.R. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda 123:1939-1951, 1993.
- SCOTT, A. M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and β -cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. **Diabetologia**, [s.l.], v.21, p.407-475, 1981.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of Amino Acids. **Analytical Chemistry**, Washington v.30, n.7, p.1190-1206, Julho, 1958.
- SGARBIERI V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**: Propriedades nutricionais das proteínas. São Paulo, SP. Ed. Livraria Varela, 1996.
- VAN BERESTEIJN, E.C.H.; PEETERS R.A.; KAPER J.; MEIJER R.J.G.M.; ROBBEN, A.J.P.M.; SCHMIDT D.G. Molecular mass distribution properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. **Journal of Food Protection**, [s.l.], v.57, n.7, p.619-625, 1994.
- VAN HALL, G. ; SHIRREFFS S.M.; CALBET, J.A.L. Muscle glycogen recovery from cycle exercise: no effect of additional protein ingestion. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda V.88, n.5, p.1631-1636 maio, 2000.
- ZALOGA G. P.; WARD K. A.; PRIELIPP, R.C. Effect of enteral diets on whole body and gut growth in unstressed rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, [s.l.], v.15, n.1, p.42-47, 1991.
- WHITNEY, R. McL. **Fundamentals of dairy chemistry**: Proteins of milk. 3 ed., 767p., Van Nostrand Reinhold, New York. 1988.

3.2. Vantagem do Proteolizado de Alto Grau de Hidrólise na Recuperação de Ratos Sedentários Submetidos a Jejum Prolongado

André Godoy Ramos

Dr. Jaime Amaya-Farfan

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição - FEA/UNICAMP

Rua Monteiro Lobato, 80, Campinas, São Paulo, Brasil, CEP 13081-970, Caixa Postal 6121

Resumo

As proteínas do soro de leite, além de possuírem um alto valor biológico e escore químico superior a outras proteínas de origem animal, são consideradas proteínas de rápida absorção. As proteínas rápidas são mais eficientes na recuperação de organismos debilitados com uma degradação acentuada e um grande estímulo à síntese protéica. Trinta ratos *Wistar*, machos, mantidos com ração comercial até atingirem cerca de 180g, foram submetidos a jejum de sessenta horas. Estes animais foram divididos em três grupos e realimentados com dietas purificadas (AIN 93-G) contendo como única fonte protéica o Concentrado Protéico de Soro de Leite (CPSL), o hidrolisado enzimático do CPSL (CPSLH) ou a caseína (Controle). Observou-se que a velocidade de crescimento do grupo alimentado com CPSLH foi significativamente superior do que para o grupo alimentado com a proteína intacta (CPSL). A capacidade das duas proteínas do soro de leite de promover o crescimento do animal, entretanto, foi maior do que o da caseína, como mostrado pelos valores de PER, determinados após 96 horas da realimentação.

Palavras-chave: jejum; crescimento; ratos; proteína hidrolisada; proteína de soro

Abstract

Advantage of Milk-Whey Proteins with High Degree of Hydrolysis to recovery of the Fasting Rat

Milk whey proteins, in addition to its high biological value and chemical score, as compared to other proteins of animal origin, are considered as *fast proteins* due to their high absorption rate. Fast proteins are more efficient in the recovery of physically or nutritionally debilitated individuals who exhibit facilitated shifts between protein breakdown and synthesis. Thirty male Wistar rats (180g) grown with commercial chow, were initially fasted for 60 hours, divided into three groups and then re-fed standard AIN 93-M diets, that differed only in the type of protein. Two diets contained a commercial cow's milk whey protein concentrate (WPC), another a hydrolyzate of the former (HWPC) with high degree of hydrolysis, and lastly, a third group with casein, as control. It was observed that enzymatic hydrolysis of the WPC resulted in a higher growth recovery rate of the animal, with respect to the intact WPC. Meanwhile, either form of the whey protein (HWPC or WPC) was more efficient as a growth promoter than was casein, as determined by their PER values 96 hours after re-feeding

Keywords: fasting; protein hydrolyzate; protein metabolism; whey protein. nutritonal recovery

3.2.1 Introdução

As proteínas de soro de leite podem ser mais eficientes na recuperação de organismos debilitados. Espera-se que animais que tenham sido submetidos a uma degradação protéica/energética prévia se recuperem mais rapidamente quando alimentados com proteínas de rápida absorção em relação a outras proteínas de alto valor biológico. Em analogia aos carboidratos, pesquisadores elaboraram o conceito de “proteínas rápidas e lentas” (Frühbeck, 1998). Borie *et al.*(1997) encontraram que a ingestão de proteínas do soro de leite (“*fast protein*”) leva a um aumento rápido no nível de aminoácidos do plasma sanguíneo e um concomitante aumento na síntese de proteína. Esta síntese protéica é menor quando, ao invés de proteínas do soro, se ingere caseína (“*slow protein*”) que, por formar coágulos no estômago, leva mais tempo para entrar no duodeno. Quanto mais rápido é a absorção e o fornecimento de aminoácido para o *pool* de aminoácidos livres, há um provável direcionamento para as vias anabólicas. Alguns tratamentos como a degradação térmica (Kitabatake, 1998) e a hidrólise enzimática (Zaloga, 1991) influenciam na velocidade de recuperação de animais submetidos a jejum. Este experimento visou analisar a velocidade de recuperação de três grupos de animais submetidos a jejum prolongado e realimentados com dietas contendo, como única fonte protéica, Concentrado Protéico de Soro de Leite, Hidrolisado ou Intacto, e caseína.

3.2.2 Material e Método

Fontes Protéicas

Foram utilizados neste experimento dois produtos da New Zealand Milk Products, INC., doados pela empresa NZMP do Brasil Ltda., São Paulo: ALACEN™ 895, concentrado protéico de soro de leite (CPSL) e ALATAL™ 821, concentrado protéico de soro de leite hidrolisado enzimaticamente (CPSLH).

Dietas

As dietas experimentais foram preparadas segundo a formulação preconizada pelo *American Institute of Nutrition* (Reeves, *et al.*, 1993) sendo a dieta AIN 93-G utilizada para crescimento de roedores. A composição comum das dietas em 1000g foi: 132,000g de amido de milho dextrinizado, 100,000g de sacarose, 70,000g de óleo de soja, 35,000g da mistura de minerais, 10,000g da mistura de vitaminas, 3,500g de bitartarato de colina, 0,014g de tert-butildidroquinona. O restante variou de acordo com a fonte protéica. Após determinação do teor de proteína (AOAC, 1975) das fontes protéicas de soro lácteo (ALACEN™ 895 e ALATAL™ 821), as dietas foram ajustadas nos seus conteúdos de carboidrato (amido de milho), com vistas a serem isoprotéicas (17%) e isoenergética.

A dieta para o grupo controle foi elaborada com a exata composição da AIN 93-G recomendada pelo *American Institute of Nutrition* (Reeves, *et al.*, 1993), contendo, como fonte protéica, caseína adicionada de 3g de L-cistina por kg de dieta.

Animais

Para os ensaio biológicos foram utilizados ratos (n=30) machos, de linhagem *Wistar*, de 180g de peso corpóreo aproximado, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP.

Ensaio Biológico

Os animais foram divididos em três grupos conforme as dietas administradas: Grupo 1 (n=10) – Dieta padrão de caseína; Grupo 2 (n=10) – Dieta com CPSLH e Grupo 3 (n=10) – Dieta com CPSL. Estas dietas foram isoprotéicas (17% de proteína) e isoenergéticas, conforme modelo AIN-93-G (Reeves, *et al.* 1993). Os animais passaram por restrição dietética durante 60 horas, mas sem restrição de acesso a água. Após este jejum, os ratos foram realimentados com as dietas para cada grupo por 96 horas, com acompanhamento do ganho de peso corporal. O experimento passou por avaliação da Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

3.2.3 Resultados

A Figura 1 mostra que as curvas de crescimento dos três grupos de animais, em percentual de peso corpóreo, foram coincidentes até as primeiras 48 horas e, após esse período, os animais realimentados com proteína hidrolisada se recuperaram mais

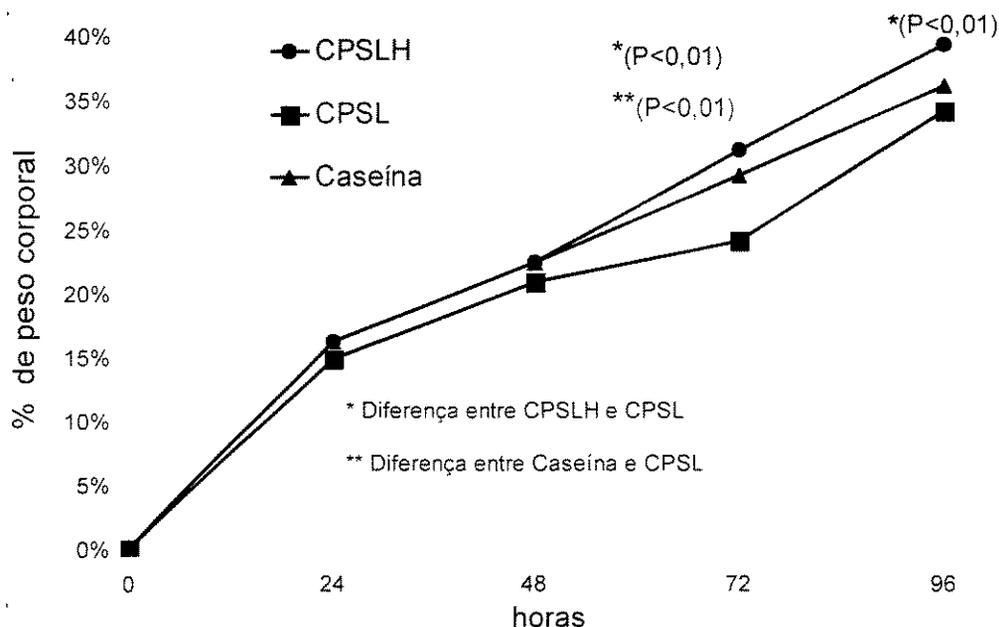


Figura 1. ganho de peso corporal de ratos (n=10) durante 96 horas de realimentação com CPSL, hidrolisado e intacto, e caseína após jejum prolongado de 60 horas.

rapidamente. Os ratos do grupo do CPSLH ganharam mais peso no final de 96 horas de realimentação. O CPSLH mostrou, ainda, um Coeficiente de Eficiência Protéica (PER) superior ao PER da caseína (Figura 2).

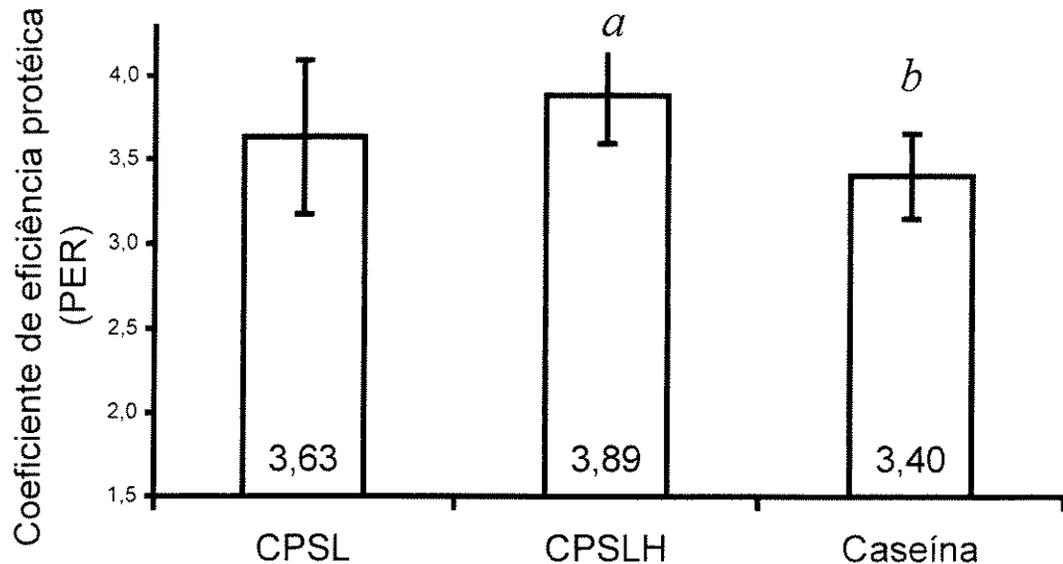


Figura 2. Efeito do tipo de proteína na dieta na velocidade de recuperação de ratos ($n=3 \times 10$) durante 96 horas de realimentação com CPSL, hidrolisado e intacto, e caseína após jejum prolongado de 60 horas

*a e b possuem diferença significativa (Tukey, e Duncan)

3.2.4 Discussão

O jejum prolongado provocou uma alta degradação protéica refletindo em uma perda acentuada de peso corporal dos animais. Estudos mostraram que a hidrólise prévia da proteína da dieta pode influenciar na capacidade de recuperação dos animais realimentados (Poullain, 1989). Além disso, o simples fato de se administrar proteínas de mais rápida absorção também aceleraria a síntese protéica (Frühbeck, 1998). No nosso experimento, o primeiro fator, a hidrólise prévia, influenciou positivamente na síntese protéica, demonstrada pela curva de crescimento (Figura 1) e pelos valores dos coeficientes de eficiência protéica (Figura 2).

Contudo, esta influência provavelmente poderia ter sido maior se o grau de hidrólise da fonte protéica utilizada fosse menor. A quantidade de aminoácidos livres no produto hidrolisado pode ter influenciado no sentido de diminuir a velocidade de

absorção desta fonte protéica. O CPSLH utilizado neste experimento mostrou ter um alto grau de hidrólise (GH = 30%) e conter cerca de 10% de aminoácidos livres. Não só o GH mas tipo de enzima proteolítica utilizada na tecnologia de fabricação influenciam no teor de aminoácidos livres. Esta concentração de aminoácidos livres do CPSLH poderia ter diminuído a capacidade de recuperação dos animais em jejum prolongado prévio, conforme indicou estudos conduzidos por Boza (2000). Porém o teor de aminoácidos livres no produto com alto grau hidrólise não interferiu, diminuindo a absorção, quando os animais estavam mais estimulados a captação de aminoácido para a síntese protéica devido ao jejum.

São necessários mais estudos sobre os efeitos do grau de hidrólise e a metodologia de hidrólise sobre a absorção intestinal e sobre as possíveis mudanças no metabolismo do organismo que ingere proteínas hidrolisadas.

Já em relação à proteína de rápida absorção (soro) e proteína lenta (caseína), durante 96 horas de realimentação após jejum prolongado, não foi encontrada, em nosso experimento, diferença significativa no ganho de peso dos ratos. Este fato contrário a outros resultados (Borie, *et al.* 1997) que sugerem um estímulo a síntese protéica maior em animais alimentados com proteínas de soro em relação a animais alimentados com caseína.

3.2.5 Conclusão

As proteínas do soro lácteo hidrolisadas enzimaticamente, até um GH de aproximadamente 30%, mostraram vantagem quando utilizadas pelo rato sedentário que foi previamente submetido a jejum prolongado (60h). Houve ligeira vantagem na velocidade de recuperação com um maior ganho de peso corporal no final de um período de 96 horas e com uma maior eficiência da proteína, em relação à proteína do soro lácteo intacto e caseína respectivamente. Demonstrando que o CPSLH pode ser útil no tratamento de recuperação de indivíduos que sofreram alta degradação protéica/energética prévia (jejum, exercício, etc.).

Quando consideramos o fato de que o consumo da dieta com caseína foi maior do que nas outras duas dietas, pode-se concluir também que o CPSLH possui uma eficiência consideravelmente maior do que a caseína. Estas conclusões restringem-se ao estado sedentário, sendo que a condição de exercício físico poderia alterar ainda o desempenho da proteína nos parâmetros ponderais do animal.

3.2.6 Referências Bibliográficas

- ADIB, S.A. The oligopeptide transporter (pept-1) in human Intestine: biology and function. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 113, jul., p.332-340, 1997.
- Association of Official Analytical chemists.. *In: Official Methods of Analysis*, 12 ed. Washington. D.C., Horwitz, W. ed., p 927-928, 1975.
- BENYON, S. **Metabolism and Nutrition**, 1. ed. London. Mosby 244p., 1998.
- BOIRIE Y., DANGIN M., GACHON P., VASSON M.P., MAUBOIS J.L. AND BEAUFRERE B. Slow and fast dietary proteins differentily modulate posprandial protein accretion. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA** [s.l.], v.94, p.14930, 1997.
- BOZA J. J., MARTINEZ-AUGUTIN O., BARÓ L., SUAREZ M.D., GIL A.. Protein v. enzymic Protein hidrolisates. Nitrogen utilization in starved rats. **British Journal of Nutrition**, [s.l.], v.73, p.65-71, 1995.
- BOZA J. J., MOENNOZ D; VUICHOUD J; JARRET A.R.; GALDARD-DE-WECK. Protein hidrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recoveryof the starved rat. **European Journal of Nutrition**. Darmstadt , germany, v.39, n.6, p.237-243, 2000.
- FAO/WHO/ ONU Expert Consultation. Energy & Protein Requirements. **WHO Tech. Rept. Ser. N° 724**, World Health Organization, Geneva, Switzerland. (1985).
- FRÜHBECK G.. Slow and fast dietary proteins. **Nature**, London v.391, n. 2, p.843, 1998.
- KITABATAKE, N. & KINEKAWA, Y.I. Digestibility of bovine milk whey protein and beta lactoglobulin in vitro and in vivo. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 12, p. 4917-4923, 1998.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A; RODWELL, V.W. **Harper's biochemistry**, 2ed. Stamford. Appleton & Lange. 1996.
- PACY P.J.; PRICE G.M.; HALLIDAY, D.; QUEVEDO M.R.; MILLWARD D.J. Nitrogen homeostasis in man: the diurnal responses protein syntesis and degradation and amino acid oxidation to diets with increasing protein intakes. **Clinical Science**, Middlebury v.86, p.103-118, 1994.
- POULLAIN, M.; CEZARD P.; ROGER L. MENDY F. Effect of whey protein, their oligopeptide hydrolysates and free amino acid mixtures on growth and nitrogen retention in fed and starved rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, [s.l.], v.13, n.4, p.382-386, 1989.

- REGESTER, G.O.; MCINTOSH, G.H.; LEE V.W.K.; SMITHERS G.W. Whey proteins as nutritional and functional food ingredients. **Food Australia**, [s.l.], v.48, n.3, p.123-128, março 1996.
- REEVES, P.G.; NIELSEN F.H.; FAHEY J.R. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda 123:1939-1951, 1993.
- VAN BERESTEIJN, E.C.H.; PEETERS R.A.; KAPER J.; MEIJER R.J.G.M.; ROBBERN, A.J.P.M.; SCHMIDT D.G. Molecular mass distribution properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. **Journal of Food Protection**, [s.l.], v.57, n.7, p.619-625, 1994.
- ZALOGA G. P.; WARD K. A.; PRIELIPP, R.C. Effect of enteral diets on whole body and gut growth in unstressed rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, [s.l.], v.15, n.1, p.42-47, 1991.
- WHITNEY, R. McL. **Fundamentals of dairy chemistry: Proteins of milk**. 3 ed., 767p., Van Nostrand Reinhold, New York. 1988.

3.3 Utilização das Proteínas do Soro Lácteo Intactas e com Alto Grau de Hidrólise pelo Rato Submetido ao Exercício Agudo de Natação

André Godoy Ramos

Dr. Jaime Amaya-Farfan

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição - FEA/UNICAMP

Rua Monteiro Lobato, 80, Campinas, São Paulo, Brasil, CEP 13081-970, Caixa Postal 6121

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da hidrólise prévia nas proteínas do soro lácteo, utilizadas como única fonte protéica na dieta de ratos submetidos ao exercício agudo de natação, com intensidade supra-limiar anaeróbio metabólico. Vinte e quatro ratos *Wistar*, machos, pesando aproximadamente 250g, foram testados em sua capacidade física para determinar o limiar anaeróbio (LAN). Estes animais foram então submetidos a exercício agudo de natação durante dez dias (sessões de 15 min). Neste período de treinamento, os ratos foram divididos em três grupos e alimentados com dietas purificadas contendo, concentrado protéico de soro de leite (CPSL), CPSL hidrolisado enzimaticamente (CPSLH) ou caseína, como única fonte protéica. Os resultados mostraram igualdade nas concentrações séricas de ácidos graxos livres, proteínas totais, albumina, glicose, triacilgliceróis e colesterol. Também não houve diferença significativa nas concentrações de insulina plasmática entre os três grupos. Apesar de não se apresentar diferenças significativas dos indicadores do metabolismo protéico-energético, a hidrólise do CPSL teve como efeito retardar a recuperação das reservas de glicogênio muscular. Conclui-se que para um alto grau de hidrólise, como o utilizado na proteína deste trabalho, nenhum efeito positivo na performance foi observado, antes pelo contrário, é possível que a alta concentração de aminoácidos livres na dieta com o CPSLH tenha ocasionado uma absorção de aminoácidos ineficiente, levando à re-síntese inferior do glicogênio muscular.

Palavras-chave: exercício; proteína hidrolisada; metabolismo protéico; glicogênio muscular

Abstract

Short-term Utilization of Milk-Whey Proteins with High Degree of Hydrolysis By the Swimming Rat

This work evaluates the possible metabolic effects of short-term feeding with whole whey protein (WPC) of normal young rats as compared to the extensively hydrolyzed whey protein (HWPC), and as a result of acute physical stimulation. Serum free fatty acids (SFFA), total protein (STP), albumin (SA), glucose (SG), insulin (SI), cholesterol (SC) and triacylglycerides (STAG) were determined as blood biochemical parameters. Muscle and hepatic glycogen concentrations were also determined. The protein sources compared were a commercial cow's milk whey protein concentrate (WPC) and an enzymatic hydrolyzate (HWPC) of the above with high degree of hydrolysis. The animals were first tested in an attempt to determine their metabolic anaerobic thresholds. The experiment consisted of three assays in which male Wistar (250g) rats, were fed the basal AIN-93-M diet during a 10-day training period (15min-metabolic supra-threshold swimming sessions). The diets were modified by substituting either intact or hydrolyzed whey protein for the normal protein source casein. The results showed that while no effects on the physical performance of the exercising animal were detected, the animals fed the HWPC exhibited lower concentrations of muscle glycogen 24 hours after the exercise bout. Since all other biochemical parameters were indistinguishable from those produced by the WPC, it was concluded that the extensively hydrolyzed whey protein, when administered for a relatively short period of time, causes a mild disadvantage to the exercising animal due to a delay in replenishing the post-exercise muscle glycogen levels. This could be due to a somewhat inefficient intestinal uptake of amino acids from the low molecular weight peptides.

Keywords: exercise; protein hydrolyzate; protein metabolism; glicogenesis; muscular glycogen

3.3.1 Introdução

Parece clara a necessidade de um aporte protéico maior para os praticantes de atividade física de força ou resistência e, mesmo não havendo definição dos requerimentos em proteína para esportistas (Lemon, 1997), um amplo segmento da população brasileira que pratica esporte ou fisiculturismo já consome dietas ricas em proteínas e outros suplementos (Araújo & Soares, 1999, Kaneshiro, *et al.* 1999).

O consumo de proteína de soro de leite hidrolisada pode preservar os teores séricos de glicose e albumina, bem como o teor de glicogênio muscular após esforço físico exaustivo. Estudo com ratos alimentados com proteína hidrolisada demonstraram exatamente isso, apesar de não ter sido encontradas alterações no rendimento do esforço físico (Tassi *et. al.*, 1998). Isso nos leva a acreditar na possível maior capacidade de recuperação do indivíduo alimentado com oligopeptídeos, ao invés da proteína inteira.

A explicação para os efeitos fisiológicos ocorridos devido à ingestão destas proteínas provavelmente está na velocidade em que a proteína é digerida e absorvida pelo intestino. Pesquisadores elaboraram o conceito de “proteínas rápidas e lentas” (“*slow and fast proteins*”) (Frühbeck, 1998). Borie *et al.* (1997) encontraram que a ingestão de proteínas do soro de leite (“*fast*”) leva a um aumento rápido no nível de aminoácidos do plasma sanguíneo e um concomitante aumento na síntese de proteína (Rasmussen, 2000; Biolo, 1997). Esta síntese protéica é menor quando, ao invés de proteínas do soro, se ingere caseína (“*slow*”) que, por formar coágulos no estômago, leva mais tempo para entrar no duodeno. Quanto mais rápido é a absorção e o fornecimento de aminoácido para o *pool* de aminoácidos livres, há um provável direcionamento para as vias anabólicas.

Já a hidrólise prévia, pode não ser favorável aos praticantes de atividade física. Quando o grau de hidrólise for alto, obtém-se um produto com alta concentração de aminoácidos livres e de mais lenta absorção em relação a produtos com menor grau de hidrólise. Este limite para o grau de hidrólise ainda não está esclarecido.

Este experimento visou analisar parâmetros bioquímicos e fazer uma avaliação comparativa da velocidade de recuperação e manutenção dos substratos

protéico/energéticos de três grupos de animais submetidos a exercício agudo de natação e alimentados com dietas contendo, como única fonte protéica, concentrado protéico de soro de leite, hidrolisado ou intacto, e caseína.

3.3.2 Material e Método

Fontes Protéicas

As matérias-primas protéicas, derivadas do soro lácteo, utilizadas neste experimento foram doadas pela empresa NZMP do Brasil Ltda., São Paulo. A empresa forneceu dois produtos: ALACEN™ 895, concentrado protéico de soro de leite (CPSL) e ALATAL™ 821, concentrado protéico de soro de leite hidrolisado (CPSLH). Estes dois produtos foram fabricados pela New Zealand Milk Products, INC.

Dietas

As dietas experimentais foram preparadas segundo a formulação preconizada pelo *American Institute of Nutrition* (Reeves, *et al.*, 1993) para a dieta AIN 93-G utilizada para crescimento de roedores. A composição comum das dietas em 1000g foi: 132,000g de amido de milho dextrinizado, 100,000g de sacarose, 70,000g de óleo de soja, 35,000g da mistura de minerais, 10,000g da mistura de vitaminas, 3,500g de bitartarato de colina, 0,014g de tert-butilidroquinona. Na dieta controle (caseína) foram adicionados 3g de L-cisteína por kg.

Após determinação do teor de proteína (AOAC, 1975) das fontes protéicas, CPSL e CPSLH, as dietas foram ajustadas nos seus conteúdos de carboidrato (amido de milho), com vistas a serem isoprotéicas (17%), isoenergéticas. Como controle, foi utilizada uma dieta semelhante contendo caseína como fonte protéica.

Animais

Para os ensaios biológicos foram utilizados ratos (n=24) machos, de linhagem *Wistar*, de 250g de peso corpóreo aproximado, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP.

Ensaio biológico

Os animais foram divididos em três grupos conforme dietas administradas: Grupo 1, dieta padrão de caseína (n=8); Grupo 2, dieta com CPSL hidrolisada enzimaticamente (n=8); Grupo 3 (n=8) dieta com CPSL intacto. Estas dietas foram isoprotéicas (17% de proteína) e isocalóricas conforme modelo AIN-93-G (Reeves, *et al.*,1993) e, juntamente com água, foram fornecidos *ad libitum*. O consumo de cada dieta e o ganho de peso corporal dos animais (g) foram monitorados rotineiramente.

Todos os animais foram submetidos a período de adaptação de uma semana (natação) para diminuir o estresse causado pela estranheza ao meio líquido. Conforme Marquezi (1999), determinamos a intensidade do exercício (limiar anaeróbio) para cada rato após o período de treinamento (descrito a seguir). Então, cada grupo (n=8) foi submetido a exercício supra-limiar. Os animais foram, após repouso de 24 horas, os animais foram sacrificados, por meio de decapitação, com um jejum de quatro horas para evitar maiores diferenças em relação ao tempo da última ingestão de alimentos.

Coletou-se sangue e amostras de fígado e músculo para análise de metabólitos segundo a Tabela 1, levando em conta a capacidade estrutural do laboratório.

O experimento passou por avaliação da Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP e teve a colaboração do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Biodinâmica da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo – USP.

Tabela 1. Parâmetros que foram estudados no protocolo experimental nos ensaios biológicos visando comparar os efeitos da fonte protéica na capacidade recuperativa.

PARÂMETROS	JUSTIFICATIVA	Método de determinação
AMOSTRA DE SANGUE		
Proteínas totais	Estado nutricional protéico	Colorimétrico (Reagente de biureto)
Albumina	Estado nutricional protéico/prot. Transp. De ác. Graxos livres/nível de hidratação	Colorimétrico (bromocresol)
Glicose	Homeostase energética/a manutenção dos níveis séricos é fundamental p/ o rendimento físico	Dosagem enzimática
Lactato	Indicador do metabolismo anaeróbico glicolítico/ quanto mais ácido menor a capacidade física	Analizador eletroquímico
colesterol		Enzimático
Triglicerídeos		Enzimático
Insulina	a relação insulina/glucagon indica uma tendência anabólica ou catabólica	Radioimunoensaio
AMOSTRA DE FÍGADO, GASTROCNÊMIO (FIBRAS I) E SÓLEO (FIBRAS IIB)		
Glicogênio	Verificar se a ingestão de proteólisado altera a síntese de glicogênio após o exercício.	Extração (SJORGREEN, <i>et al.</i> 1938) Colorim. (LOSIU & TAYLOR, 1970)

Determinação da intensidade do exercício

Os animais foram submetidos a atividade física com cargas adicionais gradativas e foi determinado o lactato sérico em cada momento. Este teste para determinação do limiar ocorreu da seguinte forma: Inicialmente, 20 minutos de natação sem carga adicional, seguido de 3 minutos de natação com um colar de carga que variou de 4 a 8% do peso corporal de cada rato. Houve um intervalo para descanso de 1 minuto entre cada mudança de carga. Foram coletadas amostras de sangue pela calda do animal em oito momentos: repouso, após 10 minutos sem carga, após 20 minutos sem carga, nos intervalos após natação, por três minutos, com cargas adicionais de 4, 5, 6, 7 e 8% do peso corporal. Foi feito um gráfico relacionando a intensidade com a concentração de lactato sanguíneo e, o ponto em que a concentração de lactato aumenta repentinamente (inflexão da curva), foi considerado o limiar anaeróbico (Marquezi, 1999). O valor de uma carga logo acima do limiar foi utilizado no protocolo de atividade dos animais considerando atividade supra-limiar.

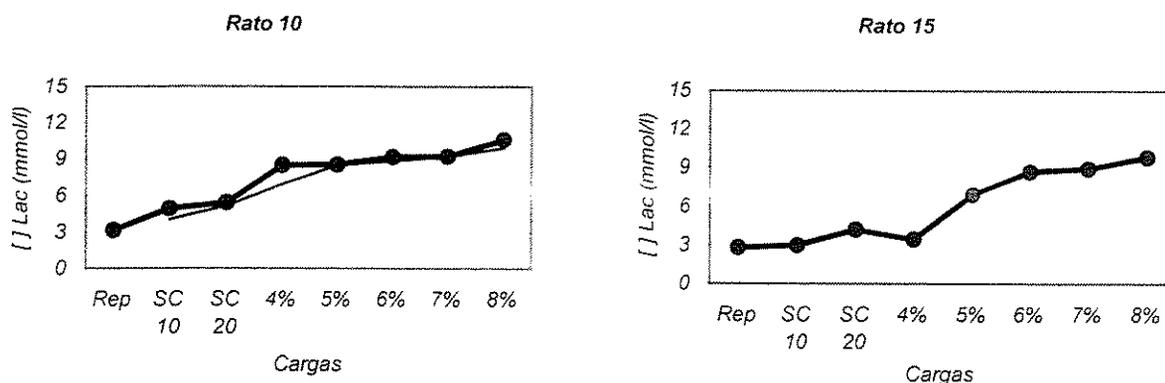


Figura 1: Determinação dos limiares anaeróbios metabólicos para os animais 10 e 15. No primeiro exemplo foi traçada uma linha de tendência para melhor visualizar o ponto de inflexão da curva. Os limiares foram encontrados em 3 e 4% de sobrecarga, respectivamente.

Glicose sérica

Determinou-se a concentração de glicose através de método enzimático utilizando kits comerciais, Glicose Gold (Laborlab S/A Produtos para laboratórios, Guarulhos -SP, Brasil).

Lactato

Determinou-se a concentração de lactato através de um analisador eletroquímico de lactato. (YSI SPORT™ Yellow Springs, Ohio, EUA, modelo YSI Sport 1500 Portable Lactate Analyzer).

Proteínas séricas totais

A determinação da concentração sérica de proteína foi realizada através do método do reagente de biureto (sulfato de cobre a 10%), que utiliza a presença de Cu^{++}

em meio alcalino reagindo com as ligações peptídicas das proteínas, dando origem a um complexo de cor violeta, cuja intensidade de coloração é proporcional à concentração de proteínas. Os valores das amostras foram conseguidos adicionando 0,1 ml de soro a 5,0 ml de reagente biureto. As absorvâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 545 nm, e as concentrações obtidas contra a curva de calibração de proteínas totais (Henry, 1974).

Albumina sérica

Foi determinada a concentração de albumina sérica através do método colorimétrico do verde de bromocresol, que consiste em: adicionar a 0,02 ml de soro 5,0 ml de reagente de cor, contendo solução de verde de bromocresol 0,60 mM, tampão succinato 0,1 M, surfactante não iônico 30%, em pH 4,0. As absorvâncias foram lidas a 630 nm e as concentrações determinadas contra a curva de calibração de albumina, linear até a concentração de 6g/L (Doumas *et al.*, 1971).

Ácidos Graxos livres (AGL)

Para determinação de AGL foi utilizado *kit* o comercial fornecido pela Wako Chemicals, GmbH (Neuss, Alemanha). O método consiste na determinação colorimétrica de ácidos graxos não esterificados no soro. Adicionando-se Acyl-Coa sintetase, ocorre uma acilação da coenzima A (CoA) e os ácidos graxos livres formando Acil-CoA. O acil-CoA produzido então é oxidado na presença da Acil-CoA oxidase para produzir peróxido de hidrogênio no qual na presença de peroxidase permite a condensação oxidativa do 3-metil-N-etil-N-(β -hidroxietil)-anilina com 4-aminoantipirina apresentando uma coloração rosa podendo ser mensurada colorimetricamente à 550nm (Duncombe, 1964, Elphick, 1968, Dole; Meinertz, 1960).

Colesterol

Determinou-se a concentração de colesterol através de método enzimático utilizando kits comerciais (Laborlab S/A Produtos para laboratórios, Guarulhos -SP, Brasil)

Glicogênio muscular e hepático

Foi feita a determinação de glicogênio muscular em duas etapas: extração do glicogênio pelo método de Sjorgreen, *et al.* (1938) e colorimetria preconizado por Losiu & Taylor (1970).

A determinação de glicogênio nos tecidos muscular e hepático foi realizada conforme os seguintes passos:

- 7- Pesagem das amostras imediatamente após a extração do tecido. As frações obtidas do tecido hepático pesaram ao redor de 500mg; as amostras de músculo pesaram 100g (sóleo) e 200g (gastrocnêmio).
- 8- Acondicionamento imediato em tubo de ensaio com 2mL (fígado) ou 1mL (músculo) de solução de KOH a 30%.
- 9- Digestão em “banho-maria” a 100°C por 60 minutos.
- 10- Precipitação do glicogênio. Adição de 200 μ L (fígado) ou 100 μ L (músculo) de Na_2SO_4 , agitação e acréscimo de 7 mL (fígado) ou 3,5 mL (músculo) de álcool etílico. Centrifugação a 4000 rpm por 10min. O sobrenadante foi descartado.
- 11- O precipitado foi suspenso em 25 mL (fígado) ou 5mL (músculo) de água desionizada.

12- Fase colorimétrica

Em tubo de ensaio, adicionamos 800 μ L (músculo) ou 950 μ L (fígado) de água destilada, 10 μ L de fenol e 200 μ L (músculo) ou 50 μ L (fígado) da amostra e mais 2,5 mL de ácido sulfúrico. Os tubos foram colocados em “banho-maria” por 10 minutos. A curva padrão foi preparada a partir de 4 padrões com 25 μ L, 50 μ L, 100 μ L e 150 μ L de

“solução mãe” de glicose a 0,2% mais 5 ml de água destilada. Retirou-se 1 mL de cada uma das soluções para 4 tubos de ensaio(triplicata) e adicionou-se 10 µL de fenol e 2,5 mL do ácido sulfúrico.

Por fim, após mais dez minutos de banho-maria a 100° C, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

Insulina

A insulina sérica foi determinada por radioimunoensaio (Hebert *et al.*, 1965). As amostras do soro sangüíneo dos ratos foram retiradas em dois momentos, uma com o animal em jejum e outra após o sacrifício. Primeiramente, retirou-se 75 µl de sangue da extremidade da calda dos animais em jejum, através de capilares sem anticoagulante, que foram acondicionados em ependorfes com 200 µL de solução salina 0,9 % e centrifugado por 10 minutos a 2800 rpm e então retirado o soro. Já as amostra dos animais sacrificados o sangue retirado logo após o sacrifício foi imediatamente centrifugado e retirado o soro.

Foram retirados, em duplicatas, 100 µL destas amostras de soro sangüíneo nos quais receberam a seguir 0,2 ml de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com ¹²⁵I (traçador) em tampão fosfato pH 7,4 acrescido de NaCl 0,9% e albumina 0,5%. Após 48h de incubação, preparou-se carvão para RIE da seguinte forma: para 100 ml de tampão fosfato, albumina 0,5% (0,5g), Dextran T 70 0,25% (0,25g) e carvão 2,5% (2,5g). Após 20 minutos em geladeira agitando constantemente, pipetou-se 200µL desta solução carvão em todas as amostras, agitou-se e mantiveram-se durante 20 minutos em geladeira. Os tubos foram centrifugados à 2600 rpm por 20 minutos a 4°C, desprezou-se o sobrenadante e a radiação gama do precipitado foi lida (Scott, *et al.*, 1981).

Análise Estatística

Foram avaliadas as diferenças entre os grupos das reservas de glicogênio (muscular e hepático), das concentrações de insulina e demais parâmetros bioquímicos. Os dados numéricos foram submetidos à análise de variância e teste de Duncan e Tukey, considerando diferença significativa o valor de $P \leq 0,05$.

3.3.3 Resultados

Observa-se na Tabela 2 que as concentrações plasmáticas de ácido graxo livre (AGL), proteínas totais, albumina, glicose, triglicérides e colesterol não diferiram com a ingestão das três formas protéicas (CPSLH, CPSL e caseína). Da mesma forma, as concentrações de insulina plasmática permaneceram praticamente inalteradas nos três grupos de ratos (Figura 2).

Tabela 2: Efeito do tipo de proteína na dieta em 6 parâmetros bioquímicos sérico de ratos em repouso de 24 horas após dez dias de exercício intenso de curta duração. Valores médios (\pm DP).

Dieta	Parâmetros Séricos					
	AGL (mmol/L)	Proteínas Totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	Glicose (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
CPLSH	0,83 (0,28)	6,10 (0,51)	3,36 (0,41)	138,0 (23,2)	130,3 (23,3)	54,2 (16,6)
CPLS	0,68 (0,27)	6,31 (0,25)	3,66 (0,62)	149,9 (8,9)	91,3 (58,6)	51,1 (9,4)
Caseína	0,80 (0,21)	6,47 (0,44)	3,88 (0,71)	144,5 (29,3)	120,7 (81,4)	55,8 (11,1)

Não houve diferenças significativas entre nenhum dos 3 tratamentos (n=8) de dietas.

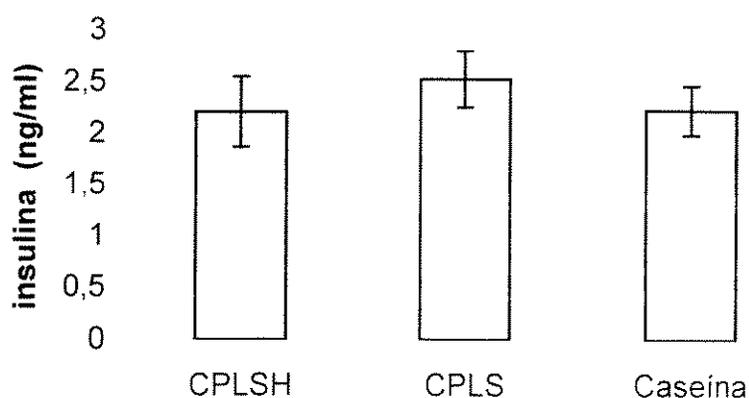


Figura 2. Efeito do tipo de proteína na dieta na concentração de insulina sérica de ratos ($n=8$) em repouso de 24 horas após dez dias de exercício intenso de curta duração. Não houve diferenças significativas (DUCAN e TUKEY).

Quanto às concentrações de glicogênio observa-se, na Tabela 3, que os animais alimentados com CPLSH apresentaram uma reserva menor de glicogênio muscular. A figura 3 mostra que houve uma menor recuperação de glicogênio muscular no período de 24 horas após a última sessão de atividade física. As amostras de gastrocnêmio do grupo que ingeriu proteína hidrolisada (CPLSH) apresentaram uma concentração de glicogênio ($0,18 \pm 0,06$ mg/100mg) significativamente menor em relação a concentrações dos dois grupos alimentados com dietas contendo proteínas intactas (CPLS = $0,26 \pm 0,03$ e caseína = $0,26 \pm 0,04$). As concentrações de glicogênio hepático não se alteraram (Figura 4).

Tabela 3. Efeito do tipo de proteína na dieta na concentração de glicogênio hepático e muscular de ratos ($n=8$) em repouso de 24 horas após dez dias de exercício intenso de curta duração.

Dieta	GLICOGÊNIO MUSCULAR E HEPÁTICO (mg/100mg de tecido)		
	GASTROCNÊMIO	SÓLEO	FÍGADO
CPLSH	0,18 (0,06) <i>a</i>	0,12 (0,01)	0,96 (0,25)
CPLS	0,26 (0,03) <i>b</i>	0,15 (0,05)	1,16 (0,30)
Caseína	0,26 (0,04) <i>b</i>	0,17 (0,08)	1,25 (0,43)

Valores médios (\pm DP) com letras diferentes possuem diferença significativa $P < 0,05$ (DUCAN e TUKEY). Valores sem letras não possuem diferença significativa.

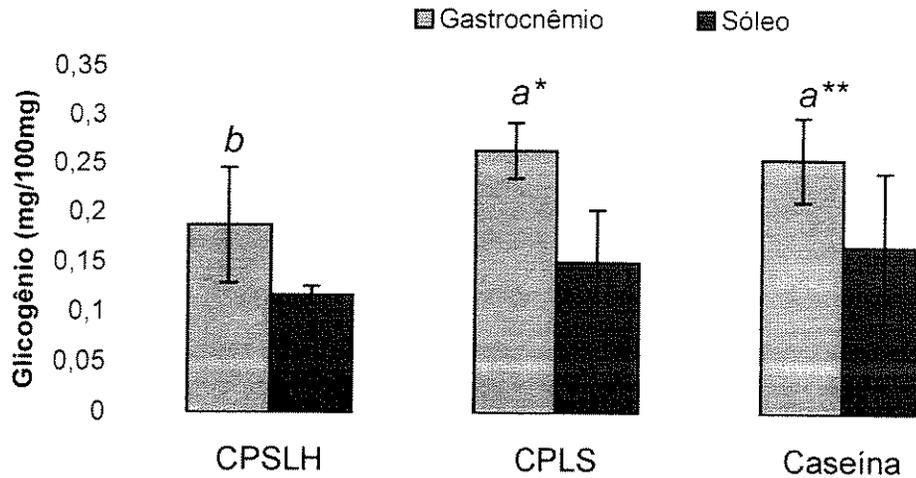


Figura 3. Efeito do tipo da proteína na concentração de glicogênio muscular (Gastrocnêmio e Sóleo) de ratos ($n=8$) após dez dias de exercícios intenso de curta duração, seguido de repouso de 24 horas. * diferença significativa com *b* valor de $P = 0,0128$ (DUNCAN) e $P = 0,0254$ (TUKEY) ** diferença significativa com *b* valor de $P = 0,0198$ (DUNCAN) e $P = 0,0489$ (TUKEY)

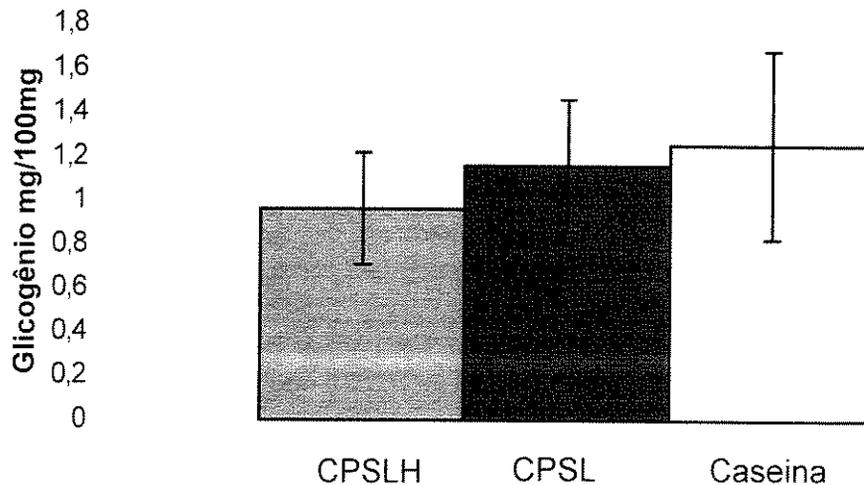


Figura 4. Efeito do tipo da proteína na concentração de glicogênio hepático de ratos ($n=8$), após dez dias de exercícios intenso de curta duração, seguido de repouso de 24 horas.

No final dos dez dias de experimento, os animais que ingeriram proteína hidrolisada apresentaram um crescimento ligeiramente menor (Figura 5).

Como mostra a Tabela 4, a hidrólise prévia da proteína reduziu o coeficiente de eficiência protéica (PER) de 2,69 (CPSL) para 2,47 (CPSLH).

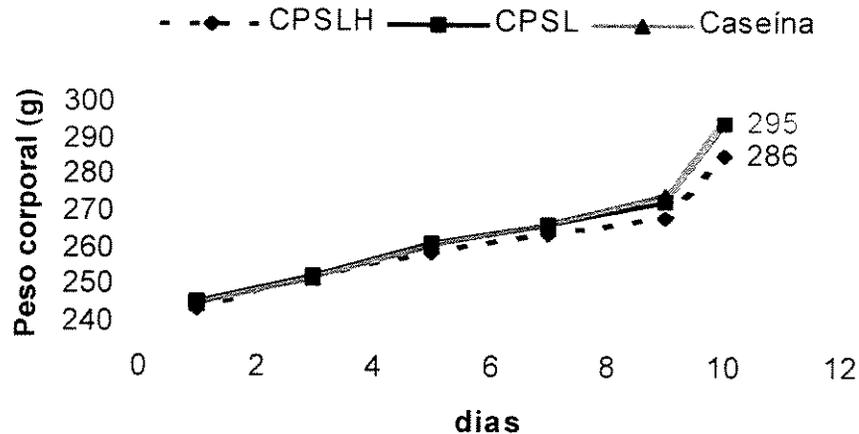


Figura 5. ganho de peso corporal de ratos (n=8x3) durante dez dias de exercícios de natação intenso e de curta duração, alimentados com CPSL, hidrolisado ou intacto, ou caseína.

Tabela 4. coeficiente de eficiência protéica (PER) de ratos (n=8x3) durante dez dias de exercícios de natação intenso e de curta duração, alimentados com CPSL, hidrolisado ou intacto, ou caseína

	CPSLH	CPSL	Caseína
PER*	2,470588	2,689352	2,304147

*PER absoluto de cada grupo, sem análise estatística e sem valores individuais

3.3.4 Discussão

A hipótese de que a proteína logo após a atividade física pode ser mais anabólica que quando ingerida mais tarde, conforme mostra a literatura (Biolo *et al.*, 1997; Rasmussen *et al.*, 2000), contudo não foi demonstrada com os resultados encontrados. Neste experimento, apesar de não ter havido diferença significativa nos parâmetros plasmáticos avaliados (Tabela 2), alguns valores chamam a atenção.

Os animais que ingeriram a fonte protéica de maior velocidade de absorção (CPSL) apresentaram concentração de insulina plasmática ligeiramente mais elevadas e quantidades inferiores de AGL. Há evidências de que, "*in vitro*", o AGL estimula a gliconeogênese devido a ativação da piruvato carboxilase pelo acetil-Coa proveniente da β -oxidação (Morand *et al.*, 1993). O excesso do AGL poderia também induzir a resistência periférica à insulina e queda da secreção de insulina (Boden & Gaissmaier, 1997). Os valores de glicose mostraram que efeitos indesejáveis como estes não ocorreram em nosso experimento de período curto, porém cabe avaliação crônica a respeito. O exercício físico pode ter compensado possíveis danos ao transporte de glicose para a célula muscular.

A composição de aminoácidos das proteínas do soro lácteo, bem como sua rápida absorção poderia justificar um maior estímulo à secreção de insulina o que, agudamente, não foi observado. Como não houve alteração significativa na concentração de insulina plasmática a síntese protéica também não se alterou significativamente. Desde os anos 40, sabe-se que o aumento da insulina plasmática diminui as concentrações séricas de aminoácidos e aumenta a síntese protéica (Lotspeich, 1949).

Os resultados apresentados são coerentes ao mostrar (Tabela 2) que não houve alteração das concentrações plasmáticas de proteínas e lipídios e nem diferença nos valores de insulina sérica para ambos os grupos de animais (Figura 2).

O consumo de CPSL poderia reduzir o colesterol, segundo Nicodemo (1999) e alterar o metabolismo de lipídios (Minehira, 2000), mas os dados deste experimento também não demonstraram isso. Para poder inferir alterações outras no metabolismo lipídico, seria necessário avaliar o efeito do consumo crônico.

Nas três dietas, ou a proteína não influenciou no teor de glicogênio como relatado em outros experimentos (Van Hall, 2000), ou o alto teor de proteína pode ter prejudicado o acúmulo de carboidrato no músculo esquelético (Luczakszczurek, 1997) nos três casos de forma semelhante. Neste ensaio, as reservas de glicogênio muscular (Tabela 3 e Figura 3), mais exatamente as fibras brancas do gastrocnêmio, apresentaram valores inferiores quando os animais foram alimentados com a proteína hidrolisada. Concomitantemente, a concentração de glicogênio hepático não diferiu entre os tratamentos (Figura 4), o que demonstra que a oferta de glicose na corrente sangüínea não estava restrita em nenhum dos casos. Se assim fosse, haveria um maior estímulo a glicogenólise hepática para liberação de glicose do fígado para a corrente sangüínea a fim de manter os níveis glicêmicos normais.

O alto grau de hidrólise do CPSLH; ou melhor, a maior concentração de aminoácidos livres no intestino, pode ter retardado a absorção de aminoácidos, e, conseqüentemente, diminuído o estímulo à captação de glicose pela célula muscular.

Outra hipótese, poderia estar relacionada com a relação inversa de aminoácidos livres na corrente sangüínea e a sensibilidade a glicose pela célula muscular. Há relatos de que a suplementação dos aminoácidos aspartato e asparagina, por exemplo, pode prejudicar o transporte de glicose para o interior da célula muscular (Lancha Jr, 1995a). A síntese de hexosaminas (McClain & Crook, 1996), particularmente a glicosamina, estimulada pela presença do aminoácido glutamina, que por sua vez é derivado de outros aminoácidos e de intermediários do ciclo de Krebs, pode acarretar em um aumento da resistência periférica a insulina. A glicosamina poderia proporcionar uma glicosilação do receptor de insulina o que modularia então a cascata de eventos pós-receptor de insulina, impedindo a translocação dos GLUT4 (Robson *et al.* 1993).

O ganho de peso corporal durante o período de treinamento de natação e alimentação diferenciada foi semelhante nos três grupos (Figura 5), porém mostrou uma tendência, sem diferença significativa, de menor crescimento dos animais que foram alimentados com CPSL hidrolisado.

Estes resultados de glicogênio e ganho de peso mostram a necessidade de se determinar qual a extensão da hidrólise prévia que seria mais bem aceita em

suplementos protéicos e de aminoácidos. Lembrando ainda, que o tipo de enzima utilizada na tecnologia de fabricação é importante para se estabelecer limites para o grau de hidrólise.

3.3.5 Conclusão

Durante o período de atividade física, a ingestão aguda de dieta com concentrado protéico de soro de leite hidrolisado enzimaticamente (GH de 30%), como única fonte protéica, por ratos adultos jovens, submetidos ao exercício agudo de intensidade supra-limiar anaeróbia, promove igual velocidade de recuperação dos substratos protéico-energéticos sangüíneos em relação a ingestão de concentrado protéico de soro de leite intacto e/ou caseína.

A ingestão aguda (dez dias) de dieta com concentrado protéico de soro de leite hidrolisado enzimaticamente (GH de 30%) promoveu uma diminuição na capacidade de recuperação das reservas de glicogênio muscular, em ratos submetidos a exercício intenso, seguido de repouso de 24 horas, quando comparado com as proteínas intactas. Isto sugere que o alto grau de hidrólise da proteína pode prejudicar a re-síntese de glicogênio muscular.

O presente estudo não demonstrou quaisquer danos aos animais alimentados com proteína de soro de leite concentrada, independente de ter sido hidrolisada previamente ou não. Porém, concluímos que ainda são necessários estudos complementares sobre os efeitos fisiológicos e bioquímicos de sua ingestão em atividade crônica (período prolongado de treinamento), ou de intensidade no sub-limiar anaeróbio.

3.3.6 Referências Bibliográficas

- ADIB, S.A. The oligopeptide transporter (pept-1) in human Intestine: biology and function. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 113, jul., p.332-340, 1997.
- ANTHONY, J.C., ANTHONY, T.G., LAYMAN D.K. Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. **Journal of Nutrition**, Bethesda v.129, p.1102-1106, 1999.
- ARAÚJO A.C.M. DE & SOARES Y.N.G.. Perfil de Utilização de Repositores Protéicos nas Academias de Belém, Pará. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.1, p.81, 1999.
- Association of Official Analytical chemists.. *In*: **Official Methods of Analysis**, 12 ed. Washington. D.C., Horwitz, W. ed., p 927-928, 1975.
- BIOLO, G.; TIPTON K.D.; KLEIN, S.; WOLFE R.R. An abundance supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [s.l.], v.36, n.1, p. E122-E129, 1997.
- BOIRIE Y., DANGIN M., GACHON P., VASSON M.P., MAUBOIS J.L. AND BEAUFRERE B. Slow and fast dietary proteins differentily modulate posprandial protein accretion. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA** [s.l.], v.94, p.14930, 1997.
- BOZA J. J., MARTINEZ-AUGUTIN O., BARÓ L., SUAREZ M.D., GIL A.. Protein v. enzymic Protein hidrolisates. Nitrogen utilization in starved rats. **British Journal of Nutrition**, [s.l.], v.73, p.65-71, 1995.
- BOZA J. J., MOENNOZ D; VUICHOUD J; JARRET A.R.; GALDARD-DE-WECK. Protein hidrolisate vs free amino acid-based diets on the nutritional recoveryof the starved rat. **European Journal of Nutrition**. Darmstadt , germany, v.39, n.6, p.237-243, 2000.
- CHENG, T.W.; PACY P.J.; DWORZAK, F.; FORD G.C.; HALLIDAY, D. Influence of fastingon leucine and muscle protein metabolism across the human forearm determined using L-(I-¹³C, ¹⁵N)leucine as the tracer. **Clinical Scientists**. Middlebury. v.73, p.241-246, 1987.
- DOLE, V.P. & MEINERTZ, H. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. **Journal Biological Chemistry**. Baltimore v.235, n.9, p.2595-2599, 1960.

- DUNCOMBE, W.G. Colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 9, n.2, p.122, 1964.
- DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A.; BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinical Chimica Acta**, Amsterdam, v.31, p.87-96, 1971.
- ELPHICK, M.D. Modified colorimetric ultramicro method for estimating NEFA in serum **Journal of Clinical Pathology**, [s.l.], v.21, p. 567, 1968.
- FRÜHBECK G.. Slow and fast dietary proteins. **Nature**, London v.391, n. 2, p.843, 1998.
- HASSID, D.A. ABRAHAN, S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. **Methods of Enzymology**, New York, v.3, p.34-36, 1957.
- HENRY, R.J. **Clinical Chemistry Principles and Techniques**, [s.l.], 2. Ed. Hargeston:Harper & How, 1974.
- HERBERT, V.; LAU, K.S.; GOTTLIEB C.W.; BLEICHER, S.J. Coated charcoal immunoassay of insulin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s.l.], v.25, n.10, p.1375-1384, 1965.
- KANESIRO, M.A.B., OLIVEIRA, A.L., VENEAIANO, L.R.P. Consumo de suplementos nutricionais por usuários de academias em Ribeirão Preto. **In: Livro de programas e resumos do III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas -SP, FEA-UNICAMP, p.119-120, 1999.
- LANDS, L.C., GREY V.L., SMOUNTAS, A.A. Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. **Journal Applied Physiology**, Bethesda, v.87, n.4, p.1381-1385, 1999.
- LANCHA JR., A.H.; SANTOS M.F.; PALANCH, A.C.; CURI, R. Supplementation of aspartate, asparagine and carnitine in the diet causes marked changes in the ultrastructure of soleus muscle. **Journal of Submicroscopy Cytology Pathology**, Bologna, v.29, n.3, p.405-408, 1997.
- LANCHA JR., A.H.; HAN, D.H.; HANSEN, P.A.; HOLLOSZY, J.O. Effect of aspartate and asparagine supplementation in the glucose transport activity in epitrochlearis muscle. **Medicine Science Sports Exercise**, [s.l.], 27:S146, 1995a.
- LANCHA JR. A.H., RECCO M.B., ABADALLA D.S.P. AND CURI R. Effect of aspartate, asparagine, and carnitine supplementation in the diet on metabolism of skeletal muscle during a Moderate Exercise. **Physiol. Behav**, [s.l.], v.57, n.2, p.367-71, 1995b.
- LEMON, P.W.R.. Dietary protein requirements in athletes. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, New York, v.8, p.52, 1997.

- LOTSPEICH, W.D.; SHELTON B.J. The role of insulin in metabolism of amino acids. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore v.179, p. 175-180, 1949.
- LUCZAKSZCZUREK, A & FLISINSKABOJANOWSKA, A. Effect of high-protein diet on glycolytic processes in skeletal muscles of exercising rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.119-126, 1997.
- MARQUEZI M.L. Efeito da suplementação de aspartato e asparagina sobre os determinantes de fadiga em ratos submetidos a exercício agudo de natação de intensidade supra-limiar anaeróbio metabólico até a exaustão. São Paulo, 1999, 47p. Dissertação de Mestrado Universidade Estadual de São Paulo-USP
- MCCLAIN, D.A. & CROOK, E.D. Hexosamines and insulin resistance. **Diabetes**, [s.l.], v.45, n.7, p. 1003-1009, Agosto, 1996.
- MCINTOSH, G. H.; ROYLE, P.J.; LE LEU, R.K.; REGESTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L. KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey Protein as functional food ingredients. **International dairy journal**, [s.l.], v.8, p. 425-434, 1998.
- MATTAR, R. Limiar anaeróbio - uma abordagem crítica. **J. Biomolec. Med. Free Radic.**, [s.l.], v.3, n.2, p.58-62, 1997.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A; RODWELL, V.W. **Harper's biochemistry**, 2ed. Stamford. Appleton & Lange. 1996.
- NEWSHOLME, E.A. *et al.* Physical and mental fatigue: metabolic mechanisms and importance of plasma amino acids. **Br. Med. Bull.**, [s.l.], v.48, n.3, p.477-95, 1992.
- NICODEMO A, KUBOW S, ISMAIL AA. Whey protein isolates lower plasma cholesterol levels and oxidative stress in Syrian hamsters. **FASEB JOURNAL**, Bethesda v.13, n.4, p. A546-A546, Part 1, Suppl., MAR, 1999.
- PACY P.J.; PRICE G.M.; HALLIDAY, D.; QUEVEDO M.R.; MILLWARD D.J. Nitrogen homeostasis in man: the diurnal responses protein syntesis and degradation and amino acid oxidation to diets with increasing protein intakes. **Clinical Science**, Middlebury v.86, p.103-118, 1994.
- POULLAIN, M.; CEZARD P.; ROGER L. MENDY F. Effect of whey protein, their oligopeptide hydrolysates and free amino acid mixtures on growth and nitrogen retention in fed and starved rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, [s.l.], v.13, n.4, p.382-386, 1989.
- REGOUW, B.J.M.; CONELISSEM, P.J.H.; HELDER, R.A.P.; SPIJKERS, J.B.F.; WEEBER, Y.M.M.. Specific determination of free fatty acid in plasma, **Clinical Chimica Acta**, Amsterdam, v.3, p.87-95, 1972.
- REEVES, P.G.; NIELSEN F.H.; FAHEY J.R. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on

- the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda 123:1939-1951, 1993.
- ROBINSON, K.A.; SENS, D.A.; BUSE, M.G. Pré-exposure to glucosamine induces insulin resistance of glucose transport and glycogen synthesis in isolated rat skeletal muscles. **Diabetes**, [s.l.], v. 42, p. 1333-1346, 1993.
- SCHREZEMNEIR J. & JAGLA A. Milk and diabetes, **Journal of American College of Nutrition**, [s.l.], v. 19, p. 176S-190S, 2000.
- SCOTT, A. M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and β -cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. **Diabetologia**, [s.l.], v.21, p.407-475, 1981.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of Amino Acids. **Analytical Chemistry**, Washington v.30, n.7, p.1190-1206, Julho, 1958.
- RASMUSSEN, B.B.; TIPTON, K.D.; MILLER S.L.; WOLF, S.E.; WOLFE, R.R. An oral essential amino acid-carbohydrate supplement enhances muscle protein anabolism after resistance exercise. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda v. 88, n.2, p.386-392, 2000.
- TASSI E.M.M., AMAYA-FARFAN J., AZEVEDO R.M.. Hydrolyzed α -lactalbumin as a source of protein to the exercising rat. **Nutrition Research**, [s.l.], v.5, p.875, 1998.
- VAN HALL, G. ; SHIRREFFS S.M.; CALBET, J.A.L. Muscle glycogen recovery from cycle exercise: no effect of additional protein ingestion. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda V.88, n.5, p.1631-1636 maio, 2000.
- ZALOGA G. P.; WARD K. A.; PRIELIPP, R.C. Effect of enteral diets on whole body and gut growth in unstressed rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, [s.l.], v.15, n.1, p.42-47, 1991.
- WAGENMAKERS, A.J.M. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism **Exercise and Sport Sciences Reviews**, [s.l.], v.28, n.26, p.287-314, 1998.
- WHITNEY, R. McL. **Fundamentals of dairy chemistry: Proteins of milk**. 3 ed., 767p., Van Nostrand Reinhold, New York. 1988.

4. CONCLUSÃO GERAL

Analisando os resultados aqui apresentados e a literatura internacional, parece haver um limite para o grau de hidrólise com que uma proteína é apresentada ao animal exercitado, acima do qual o concentrado protéico de soro de leite não influencia positivamente a performance do organismo. O alto grau de hidrólise poderia influenciar negativamente a velocidade de absorção e a manutenção dos estoques de glicogênio muscular. Este limite provavelmente se encontra bem abaixo de 30% de grau de hidrólise e não exclui a possibilidade de que o tipo de enzima utilizado para a sua obtenção também tenha relevância.

Nas condições do presente estudo não foram demonstrados quaisquer danos aos animais alimentados, em quantidades normais, com proteína de soro de leite concentrada, hidrolisada previamente ou não.

Dadas as observações não claramente conclusivas em favor dos hidrolisados, a eficácia do consumo de suplementos protéicos a base de proteínas de soro de leite, hidrolisada ou não, por praticantes de atividade física, não fica constatada. Portanto, não podemos também excluir a possibilidade que a suplementação com os proteolizados tragam vantagem ao usuário. O acompanhamento profissional quanto ao tipo, frequência e intensidade da atividade física é então recomendável em cada caso a fim de se determinar quaisquer vantagens associadas à suplementação.

Os resultados também sugerem que as proteínas de alto valor biológico e de mais rápida absorção, como as do soro lácteo, podem acelerar o processo de recuperação de indivíduos debilitados nutricionalmente. As proteínas de soro de leite com alto grau de hidrólise demonstraram melhora na velocidade de recuperação (ganho de peso corporal) apenas em indivíduos debilitados com uma alta taxa de degradação protéica.

São necessárias futuras avaliações sobre um consumo de suplementos de aminoácidos a base de proteína de soro de leite com alto grau de hidrólise por períodos mais prolongados, bem como, estudos com humanos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIB, S.A. The oligopeptide transporter (pept-1) in human Intestine: biology and function. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 113, jul., p.332-340, 1997.
- ALLEN L.H., ODDOYE E.A., MARGEN S.. Protein-induced hypercalciuria. A longer term study. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda v.32, p.741, 1979.
- ANTHONY, J.C., ANTHONY, T.G., LAYMAN D.K. Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. **Journal of Nutrition**, Bethesda v.129, p.1102-1106, 1999.
- ARAÚJO A.C.M. DE & SOARES Y.N.G.. Perfil de Utilização de Repositores Protéicos nas Academias de Belém, Pará. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.1, p.81, 1999.
- Association of Official Analytical chemists.. *In: Official Methods of Analysis*, 12 ed. Washington. D.C., Horwitz, W. ed., p 927-928, 1975.
- BENYON, S. **Metabolism and Nutrition**, 1. ed. London. Mosby 244p., 1998.
- BIOLO, G.; TIPTON K.D.; KLEIN, S.; WOLFE R.R. An abundance supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [s.l.], v.36, n.1, p. E122-E129, 1997.
- BOIRIE Y., DANGIN M., GACHON P., VASSON M.P., MAUBOIS J.L. AND BEAUFRERE B. Slow and fast dietary proteins differentily modulate posprandial protein accretion. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA** [s.l.], v.94, p.14930, 1997.
- BOUNOUS, G.; BATIST, G.; GOLD P. Protein in cancer prevention. **Cancer letter**, Washington DC, v.57, p.91-94, 1991.
- BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.; GOLD P. Whey protein as a food supplement in HIV-seropositive individuals. **Clin. Invest. Med.**, [s.l.], v.16, n.3, p.204-209, 1993.
- BOZA J. J., MARTINEZ-AUGUTIN O., BARÓ L., SUAREZ M.D., GIL A.. Protein v. enzymic Protein hidrolisates. Nitrogen utilization in starved rats. **British Journal of Nutrition**, [s.l.], v.73, p.65-71, 1995.
- BOZA J. J., MOENNOZ D; VUICHOUD J; JARRET A.R.; GALDARD-DE-WECK. Protein hidrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved

- rat. European Journal of Nutrition*. Darmstadt , germany, v.39, n.6, p.237-243, 2000.
- CHENG, T.W.; PACY P.J.; DWORZAK, F.; FORD G.C.; HALLIDAY, D. Influence of fasting on leucine and muscle protein metabolism across the human forearm determined using L-(^{13}C , ^{15}N)leucine as the tracer. **Clinical Scientists**. Middlebury, v.73, p.241-246, 1987.
- DOLE, V.P. & MEINERTZ, H. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. **Journal Biological Chemistry**. Baltimore v.235, n.9, p.2595-2599, 1960.
- DUNCOMBE, W.G. Colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 9, n.2, p.122, 1964.
- DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A.; BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurements of serum albumin with bromocresol green. **Clinical Chimica Acta**, Amsterdam, v.31, p.87-96, 1971.
- DRAGAN, C.I. *et al.* Studies regarding the efficiency of Supro isolated soy protein in Olympic athletes. **Ver. Roum. Physiol.**, [s.l.], v.29, n.2-4, p. 63-70, 1992.
- ELPHICK, M.D. Modified colorimetric ultramicro method for estimating NEFA in serum **Journal of Clinical Pathology**, [s.l.], v.21, p. 567, 1968.
- FAO/WHO/ ONU Expert Consultation. Energy & Protein Requirements. **WHO Tech. Rept. Ser. Nº 724**, World Health Organization, Geneva, Switzerland. (1985).
- FARFÁN, J.A. Química de proteínas. 2 ed. Campinas. Editora UNICAMP, 134p. 1994.
- FONSECA, M.F; FONSECA, C.S.P; BRANDÃO S.C.C. Propriedades anticarcinogênicas de componentes do leite. *Indústria de Laticínios*, [s.l.], v. 21, n.4, p. 50-56, mai/jun 1999
- FRÜHBECK G.. Slow and fast dietary proteins. **Nature**, London v.391, n. 2, p.843, 1998.
- HASSID, D.A. ABRAHAN, S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. **Methods of Enzymology**, New York, v.3, p.34-36, 1957.
- HEGSTED D.M.. Calcium and osteoporosis. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.116, p.2316, 1986.
- HENRY, R.J. **Clinical Chemistry Principles and Techniques**, [s.l.], 2. Ed. Hargeston:Harper & How, 1974.

- HERBERT, V.; LAU, K.S.; GOTTLIEB C.W.; BLEICHER, S.J. Coated charcoal immunoassay of insulin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s.l.], v.25, n.10, p.1375-1384, 1965.
- KANESIRO, M.A.B., OLIVEIRA, A.L., VENEAIANO, L.R.P. Consumo de suplementos nutricionais por usuários de academias em Ribeirão Preto. In: Livro de programas e resumos do III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas -SP, FEA-UNICAMP, p.119-120, 1999.
- KARJALAINEN, J.; MARTIN, J.M.; KNIP, M.; ILONEN, J.; ROBISON, B.H.; SAVILAHTI, E.; AKERBLOM, H.K.; DOSCH, H.M. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes-mellitus. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 327, n.5, p. 302-307, jul. 1992.
- KIM, S.Y.; PARK, P.S.W.; RHEE, K.C. Functional of properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 3, 1990.
- KITABATAKE, N. & KINEKAWA, Y.I. Digestibility of bovine milk whey protein and beta lactoglobulin in vitro and in vivo. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 12, p. 4917-4923, 1998.
- LANDS, L.C., GREY V.L., SMOUNTAS, A.A. Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. **Journal Applied Physiology**, Bethesda, v.87, n.4, p.1381-1385, 1999.
- LANCHA JR., A.H.; SANTOS M.F.; PALANCH, A.C.; CURI, R. Supplementation of aspartate, asparagine and carnitine in the diet causes marked changes in the ultrastructure of soleus muscle. **Journal of Submicroscopy Cytology Pathology**, Bologna, v.29, n.3, p.405-408, 1997.
- LANCHA JR., A.H.; HAN, D.H.; HANSEN, P.A.; HOLLOSZY, J.O. Effect of aspartate and asparagine supplementation in the glucose transport activity in epitrochlearis muscle. **Medicine Science Sports Exercise**, [s.l.], 27:S146, 1995a.
- LANCHA JR. A.H., RECCO M.B., ABADALLA D.S.P. AND CURI R. Effect of aspartate, asparagine, and carnitine supplementation in the diet on metabolism of skeletal muscle during a Moderate Exercise. **Physiol. Behav**, [s.l.], v.57, n.2, p.367-71, 1995b.
- LEMON, P.W.R.. Dietary protein requirements in athletes. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, New York, v.8, p.52, 1997.
- LEHNINGER, A.L. Princípios de bioquímica Trad. De Lodi, W.R. e Simões, A.A. 5 ed. São Paulo. Sarvier, 725p. 1989.
- LOTSPEICH, W.D.; SHELTON B.J. The role of insulin in metabolism of amino acids. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore v.179, p. 175-180, 1949.

- LOWRY, O.H.; ROSERBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore v.293, p.265-275, 1951.
- LUCZAKSZCZUREK, A & FLISINSKABOJANOWSKA, A. Effect of high-protein diet on glycolytic processes in skeletal muscles of exercising rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.119-126, 1997.
- MARKUS, C.R.; OLIVER B.; PANHUYSEN G.E.M.; VAN DER GUGTEN J.; ALLES M.S.; TUITEN A.; WESTENBERG H.G.M.; FEKKES D.; KOPESCHAAR H.F.; DE HAAN E.E.H.F. The bovine protein alfa-lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other neutral amino acids, and vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda v.71, n.6, p. 1536, 2000.
- MARQUEZI M.L. Efeito da suplementação de aspartato e asparagina sobre os determinantes de fadiga em ratos submetidos a exercício agudo de natação de intensidade supra-limiar anaeróbio metabólico até a exaustão. São Paulo, 1999, 47p. Dissertação de Mestrado Universidade Estadual de São Paulo-USP
- MCCLAIN, D.A. & CROOK, E.D. Hexosamines and insulin resistance. **Diabetes**, [s.l.], v.45, n.7, p. 1003-1009, Agosto, 1996.
- MCINTOSH, G. H.; ROYLE, P.J.; LE LEU, R.K.; REGESTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L.. KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey Protein as functional food ingredients. **International dairy journal**, [s.l.], v.8, p. 425-434, 1998.
- MATTAR, R. Limiar anaeróbio - uma abordagem crítica. **J. Biomolec. Med. Free Radic.**, [s.l.], v.3, n.2, p.58-62, 1997.
- MINEHIRA K, INOUE S, NONAKA M, OSADA K, YAMADA K, SUGANO M. Effects of dietary protein type on oxidized cholesterol-induced alteration in age-related modulation of lipid metabolism and indices of immune function in rats. **Biochimica et biophysica acta-molecular and cell biology of lipids**, [s.l.], v. 1483, n.1, p.141-153, JAN, 2000.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A; RODWELL, V.W. **Harper's biochemistry**, 2ed. Stamford. Appleton & Lange. 1996.
- NEWSHOLME, E.A. *et al.* Physical and mental fatigue: metabolic mechanisms and importance of plasma amino acids. **Br. Med. Bull.**, [s.l.], v.48, n.3, p.477-95, 1992.
- NICODEMO A, KUBOW S, ISMAIL AA. Whey protein isolates lower plasma cholesterol levels and oxidative stress in Syrian hamsters. **FASEB JOURNAL**, Bethesda v.13, n.4, p. A546-A546, Part 1, Suppl., MAR, 1999.
- PACY P.J.; PRICE G.M.; HALLIDAY, D.; QUEVEDO M.R.; MILLWARD D.J. Nitrogen homeostasis in man: the diurnal responses protein syntesis and degradation and

- amino acid oxidation to diets with increasing protein intakes. **Clinical Science**, Middlebury v.86, p.103-118, 1994.
- PARODI, W.P. A role for milk protein in cancer prevention. **The Australian Journal of Dairy Technology**, [s.l.], v.53, p. 37-47, abril 1998.
- POULLAIN, M.; CEZARD P.; ROGER L. MENDY F. Effect of whey protein, their oligopeptide hydrolysates and free amino acid mixtures on growth and nitrogen retention in fed and starved rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, [s.l.], v.13, n.4, p.382-386, 1989.
- REGESTER, G.O.; MCINTOSH, G.H.; LEE V.W.K.; SMITHERS G.W. Whey proteins as nutritional and functional food ingredients. **Food Australia**, [s.l.], v.48, n.3, p.123-128, março 1996.
- REGOUW, B.J.M.; CONELISSEM, P.J.H.; HELDER, R.A.P.; SPIJKERS, J.B.F.; WEEBER, Y.M.M.. Specific determination of free fatty acid in plasma, **Clinical Chimica Acta**, Amsterdam, v.3, p.87-95, 1972.
- REEVES, P.G.; NIELSEN F.H.; FAHEY J.R. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda 123:1939-1951, 1993.
- ROBINSON, K.A.; SENS, D.A.; BUSE, M.G. Pré-exposure to glucosamine induces insulin resistance of glucose transport and glycogen synthesis in isolated rat skeletal muscles. **Diabetes**, [s.l.], v. 42, p. 1333-1346, 1993.
- SALWAY, J.G. **Metabolism at a glance**, 2ed. London. Blackwell Science Ltd, 1999 111p.
- SCHREZEMNEIR J. & JAGLA A. Milk and diabetes, **Journal of American College of Nutrition**, [s.l.], v. 19, p. 176S-190S, 2000.
- SCOTT, A. M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and β -cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. **Diabetologia**, [s.l.], v.21, p.407-475, 1981.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of Amino Acids. **Analytical Chemistry**, Washington v.30, n.7, p.1190-1206, Julho, 1958.
- RASMUSSEN, B.B.; TIPTON, K.D.; MILLER S.L.; WOLF, S.E.; WOLFE, R.R. An oral essential amino acid-carbohydrate supplement enhances muscle protein anabolism after resistance exercise. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda v. 88, n.2, p.386-392, 2000.

- SGARBIERI V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**: Propriedades nutricionais das proteínas. São Paulo, SP. Ed. Livraria Varela, 1996.
- SGARBIERI V.C. Food protein and peptides presenting specific protection to human health (a review). 3rd International food science and technology conference p. 335-353, 1998.
- SJORGREEN, N. B.; NORDENSKJOLD, T.; HOLMGREN, H.; WOLLERSTROM, J. **Beertrag zur ketnis des le berrhythmik Pfluges Arch**, Gesante Physiology. Meenschen tiere. v. 240, p. 247, 1938.
- TASSI E.M.M., AMAYA-FARFAN J., AZEVEDO R.M.. Hydrolyzed β -lactalbumin as a source of protein to the exercising rat. **Nutrition Research**, [s.l.], v.5, p.875, 1998.
- VAN BERESTEIJN, E.C.H.; PEETERS R.A.; KAPER J.; MEIJER R.J.G.M.; ROBBEN, A.J.P.M.; SCHMIDT D.G. Molecular mass distribution properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. **Journal of Food Protection**, [s.l.], v.57, n.7, p.619-625, 1994.
- VAN HALL, G. ; SHIRREFFS S.M.; CALBET, J.A.L. Muscle glycogen recovery from cycle exercise: no effect of additional protein ingestion. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda V.88, n.5, p.1631-1636 maio, 2000.
- VISEK, W.J. Dietary protein and experimental carcinogenesis. **Adv. Exp. Biol.**, [s.l.], v. 206, p.163-186.
- XU, R.J. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. **Food Reviews Internationa**, New York, v.14, n.1, p.1-16, 1998.
- ZALOGA G. P.; WARD K. A.; PRIELIPP, R.C. Effect of enteral diets on whole body and gut growth in unstressed rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, [s.l.], v.15, n.1, p.42-47, 1991.
- WAGENMAKERS, A.J.M. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human psysiology and metabolism **Exercise and Sport Sciences Reviews**, [s.l.], v.28, n.26, p.287-314, 1998.
- WHITNEY, R. McL. **Fundamentals of dairy chemistry**: Proteins of milk. 3 ed., 767p., Van Nostrand Reinhold, New York. 1988.