



UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

USO DO AUTOLISADO DE LEVEDURA (*Saccharomyces cerevisiae*) E DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE BOVINO COMO INGREDIENTES NA RECUPERAÇÃO DE RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTÉICA OU RESTRIÇÃO ALIMENTAR

Denise Aparecida Gonçalves de Oliveira
Economista Doméstico

Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Denise Aparecida Gonçalves de Oliveira**, aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de fevereiro de 2004.

Campinas, 03 de fevereiro de 2004.

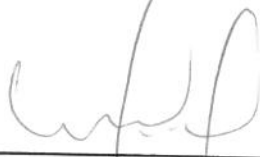

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Campinas, 2003



BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(Orientador)



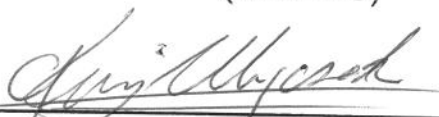
Prof.ª Dra. Marília Oetterer
(Membro)



Prof.ª Dra. Maria Teresa B. Pacheco
(Membro)



Prof.ª Dra. Solange Guidolin Canniatti Brazaca
(Membro)



Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka
(Membro)

Prof.ª Dra. Silvia M.F. Cozzolino
(Membro)

Prof. Dr Miguel Arcanjo Arraes
(Membro)

“Nossa paz e felicidade dependem do uso que fizermos, onde nos encontramos hoje, aqui e agora, das oportunidades e dons, situações e favores recebidos do Altíssimo.”

Francisco Cândido Xavier pelo espírito Emmanuel

Ofereço

À minha mãe Clarice que nos criou sozinha e vive em função de nos proteger e mimar,

Ao meu ^{pai} Clovis (in memoriam) que possibilitou minha vida e educação.

À Eliana, Marisa, Roberto, Marinho, Paula, Marcos Vinícius, Victor, Robertinho, Mário, Marcos, Adriana, minha família que me apoia, me dá carinho e amor.

À Deus, pela minha vida e pela oportunidade de trabalho e de crescimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, pela sua paciência, apoio e orientação segura e precisa;

Ao meus cunhados Mário Benassi Jr e Marcos Antonio Fabiano de Camargo, amigos e cunhados pelo apoio e sugestões;

À pesquisadora Prof^a. Dra. Maria Teresa B. Pacheco, pela amizade, apoio e atenção;

Aos professores da banca examinadora, pelo carinho com que receberam o convite para participação da banca;

Ao Programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP;

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição da FEA, Aparecida, Susana e Fátima pela colaboração e atenção;

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), especialmente ao Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, setor de Bioquímica por permitir a utilização dos seus laboratórios;

Aos funcionários do Centro de Química - ITAL, Sandra, Beth Gomes, Beth Lima, Ercília, Luzimara, Renato, Dona Ivete e Dra. Vera Lúcia Baldini pela colaboração e companheirismo nos bons e maus momentos;

À Cristina Tanikawa pela valiosa ajuda nos ensaios biológicos;

Às minhas amigas e pesquisadoras Marjorie, Leonídia, Margareth, Eunice, Isabela, Yara, Janesca, e Ana Silvia participantes dos projetos de Levedura, Soro de Leite e Sangue, muito obrigada pelos bons momentos que vivenciamos juntas durante o árduo trabalho que desenvolvemos durante esses últimos três anos;

Às minhas amigas Renata, Wânia e meu amigo Ricardo pelo companheirismo, carinho e amizade;

Ao programa de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

À Cooperativa dos Produtores de Açúcar e Alcool (Copersucar) pelo apoio financeiro por meio do projeto de Inovação Tecnológica ITAL/FAPESP/Copersucar

Enfim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho. Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Desnutrição protéica e energética.....	03
2.2. Ingredientes protéicos.....	05
2.2.1. Composição e propriedades nutricionais das proteínas de soro de leite bovino.....	05
2.2.2. Propriedades funcionais fisiológicas das proteínas de soro de leite.....	08
2.2.3. Composição e propriedades nutricionais dos derivados de leveduras.....	12
2.2.4. Propriedades funcionais fisiológicas dos derivados de levedura.....	14
2.2.5. Efeitos dos nucleotídeos e nucleosídeos sobre os tecidos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Matéria-prima.....	19
3.1.1. Autolisado.....	19
3.1.2. Concentrado protéico de soro de leite bovino.....	19
3.1.3. Caseína comercial.....	20
3.2. Análises químicas.....	20
3.2.1. Composição centesimal.....	20
3.2.2. Determinação de aminoácidos totais.....	20
3.2.3. Preparo das dietas experimentais.....	21
3.3. Primeiro ensaio biológico - restrição protéica.....	23
3.3.1. Animais utilizados.....	23
3.3.2. Protocolo experimental de restrição protéica.....	23
3.3.3. Coleta de sangue e análises bioquímicas.....	25
3.3.4. Coleta de fígado e análises bioquímicas.....	25
3.3.4.1. Ácido ribonucleico (RNA).....	25
3.3.4.2. Ácido desoxirribonucleico (DNA).....	25
3.3.4.3. Proteína total.....	26
3.3.4.4. Número de núcleos e peso dos hepatócitos.....	26
3.4. Análises nutricionais.....	26
3.5. Segundo ensaio biológico - restrição alimentar.....	27
3.5.1. Protocolo experimental de restrição e restauração alimentar.....	27
3.5.2. Preparo das dietas e análise nutricional.....	29
3.5.3. Coleta de sangue, fígado e análises bioquímicas.....	29
3.6. Análise estatística.....	29

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Composição química.....	30
4.2. Composição de aminoácidos, escore químico e PDCAAS.....	31
4.3. Avaliação nutricional do primeiro ensaio biológico - restrição protéica.....	33
4.3.1. Consumo de dieta, consumo de proteína e ganho de peso.....	33
4.3.2. Quociente de eficiência protéica operacional (PERop) e Quociente de eficiência alimentar (QEA).....	37
4.3.3. Nitrogênio excretado (NE), nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio absorvido (NA) e digestibilidade aparente (Da).....	41
4.4. Análises bioquímicas do primeiro ensaio biológico - restrição protéica.....	43
4.4.1. Análises sorológicas.....	43
4.4.1.1. Albumina total, proteína total e relação Albumina/globulina (A/G).....	43
4.4.2. Análises hepáticas.....	46
4.4.2.1. Peso do fígado.....	46
4.4.2.2. Determinação de RNA, DNA, Proteína total e relações RNA/DNA e PT/DNA.....	47
4.4.2.3. Número de núcleos e peso dos hepatócitos (peso/núcleo).....	51
4.5. Avaliação nutricional do segundo ensaio biológico - restrição alimentar.....	53
4.5.1. Consumo de dieta, consumo de proteína e ganho de peso.....	53
4.5.2. Quociente de eficiência protéica operacional (PERop), Quociente de eficiência alimentar (QEA) e Quociente de utilização líquida da proteína (NPR).....	57
4.5.3. Nitrogênio excretado (NE), nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio absorvido (NA) e digestibilidade aparente da proteína (Da).....	61
4.6. Análises bioquímicas do segundo ensaio - restrição alimentar.....	63
4.6.1. Análises sorológicas.....	63
4.6.1.1. Proteína total, albumina total sérica e relação A/G.....	63
4.6.2. Análises hepáticas.....	65
4.6.2.1. Peso do fígado.....	65
4.6.2.2. Determinação de RNA, DNA, Proteína total e relações RNA/DNA e PT/DNA.....	67
4.6.2.3. Número de núcleos e peso dos hepatócitos (peso/núcleo).....	69
5. CONCLUSÕES.....	72
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	74

LISTA DE TABELAS

TABELAS Nº.		Página
01	Dieta formulada para a fase de crescimento de roedores - AIN-93G	21
02	Mistura mineral (AIN 93G-MX)	22
03	Composição da mistura vitamínica (AIN 93 VX)	28
04	Composição centesimal aproximada para caseína comercial (CC), concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL), autolisado de levedura (AT) e mistura composta por concentrado protéico de soro de leite + autolisado de levedura(CSL ₆₄ :AT ₃₆).....	30
05	Aminoácidos dos tratamentos de caseína comercial (CC), concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL), autolisado de levedura (AT) e mistura (CSL ₆₄ :AT ₃₆).....	31
06	Aminoácidos essenciais, escore de aminoácidos essenciais (EAE) e escore de aminoácidos essenciais corrigido pela digestibilidade verdadeira (PDCAAS) para as diferentes fontes protéicas estudadas (FAO/WHO,1991).....	32
07	Consumo de dieta (CD), consumo de proteína (CP) e ganho de peso (GP) de ratos submetidos a períodos de restrição, repleção protéica e período total (restrição e repleção protéica) com diferentes fontes de proteínas.....	34
08	Nitrogênio excretado (NE), nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio absorvido (NA) e digestibilidade da proteína (Da) de ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas.....	42
09	Concentração de proteína total (PT), albumina total sérica (ATS) e relação albumina/globulina (A/G) de ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas.....	44
10	Peso do fígado (PFig) e percentagem do fígado (%Fig) em relação ao peso corporal para ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas.....	46
11	Conteúdo de RNA, DNA, Proteína total (PT), relação RNA/DNA e PT/DNA por grama de fígado de ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes de fontes proteínas..	49

12	Determinação de número de núcleos (n° , células em milhões) e peso dos hepatócitos núcleo (peso celular em $m\mu g$) em fígado de ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas.....	51
13	Consumo de dieta (CD), consumo de proteína (CP) e ganho de peso (GP) de ratos submetidos a períodos de restrição, restauração alimentar e período total (restrição + restauração) com diferentes fontes de proteínas.....	54
14	Nitrogênio excretado (NE), nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio absorvido (NA) e digestibilidade aparente da proteína (Da) de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar diferentes fontes de proteínas.....	62
15	Concentração de proteína total (PT), índice de albumina total sérica (ATS) e relação albumina/globulina (A/G) de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas.....	64
16	Peso do fígado (PFig) e percentagem do fígado (%Fig) em relação ao peso corporal de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas.....	66
17	Conteúdo de RNA, DNA e Proteína total (PT), relação DNA/RNA e PT/DNA por grama de fígado de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas.....	68
18	Determinação de número de núcleos (número células em milhões) e peso dos hepatócitos (peso celular em $m\mu g$) de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas.....	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA N°.		Página
01	Esquema experimental do primeiro ensaio biológico.....	24
02	Esquema experimental do segundo ensaio biológico.....	28
03	Curvas de crescimento de ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas....	36
04	Quociente de eficiência protéica operacional (PERop) para ratos submetidos a períodos de restrição, repleção protéica e período total (restrição + repleção protéica) com diferentes fontes de proteínas.....	38
05	Consumo protéico total de ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas.....	39
06	Quociente de Eficiência Alimentar (QEA) de ratos submetidos a períodos de restrição, repleção protéica e período total (restrição + repleção protéica) com diferentes fontes de proteínas.....	40
07	Ganho de peso semanal de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas	55
08	Crescimento total de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas.....	56

09	Quociente de eficiência protéica operacional (PERop) de ratos submetidos a períodos de restrição, restauração alimentar e período total (restrição + restauração alimentar) com diferentes fontes de proteínas.....	58
10	Quociente de utilização líquida da proteína (NPR) de ratos submetidos a períodos de restrição, restauração alimentar e período total (restrição + restauração alimentar) com diferentes fontes de proteínas.....	58
11	Quociente de eficiência alimentar (QEA) de ratos submetidos a períodos de restrição, restauração alimentar e período total (restrição + restauração alimentar) com diferentes fontes de proteínas.....	59
12	Consumo de dieta total de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar e com diferentes fontes de proteínas.....	60

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as diferentes fontes de proteínas obtidas a partir de concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL), autolisado de levedura (AT), mistura contendo CSL + AT (64:36 g/100g em base protéica) e uso da caseína comercial utilizada como tratamento experimental (CCE) e como padrão (CCP). A seguinte composição foi determinada para essas fontes protéicas: proteínas (NxF); CCP 83,0%, CSL 81,3%, AT 39,5% e a mistura (CSL₆₄:AT₃₆) 66,2%. Autolisado de levedura apresentou teores elevados de fibras totais (32,4%), cinzas (6,6%) e carboidratos (20%) e o mais baixo teor de proteína.

Nos ensaios biológicos foram usados ratos machos da linhagem "Wistar", livres de patógenos específicos (SPF), com idade entre 21 e 23 dias. As dietas preparadas de acordo com AIN-93G foram: caseína comercial como padrão (CCP), caseína experimental (CCE), concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL), autolisado de levedura (AT) e mistura de concentrado protéico de soro de leite bovino e autolisado de levedura (CSL₆₄:AT₃₆ p/p).

O primeiro ensaio biológico foi de restrição protéica (6% de proteína) por 30 dias, seguido por um período de restauração protéica (17%) por mais 30 dias. Os resultados demonstraram que os ratos com ingestão de AT apresentaram uma baixa capacidade de recuperação, considerando os seguintes índices: Quociente de Eficiência Protéica (PER), Quociente de Eficiência Alimentar (QEA) e Digestibilidade Aparente (Da), quando comparado com a caseína padrão que apresentou elevados índices de crescimento. A capacidade de síntese de DNA no fígado foi menor para o tratamento com AT quando comparado com outros tratamentos experimentais. Nenhuma diferença foi encontrada entre os tratamentos protéicos (CSL, CCE e CSL₆₄:AT₃₆) em relação a síntese de proteína sérica (proteína total, albumina total) e a relação albumina/globulina e síntese protéica no fígado (número e peso celular), exceto para a dieta com CSL a qual apresentou uma elevada capacidade entre os tratamentos para síntese de DNA. Durante o período de restrição uma redução no crescimento corporal e no fígado ocorreu principalmente devido a redução na divisão celular e na síntese de DNA. O crescimento foi principalmente devido a hipertrofia

celular ou crescimento por tamanho celular. Por outro lado, durante o período de repleção protéica foi detectado o crescimento por hipertrofia (crescimento celular) e hiperplasia (proliferação celular).

No segundo ensaio biológico foi adotado o modelo de restrição alimentar no qual a ingestão dos grupos experimental era 50% da ingestão dos ratos controles (*ad libitum*). Para cada fase do experimento (restrição e repleção) tiveram a duração de 21 dias. Os resultados deste experimento considerando os mesmos índices medidos no primeiro ensaio biológico, indicaram que os grupos alimentados com dieta de AT diferem dos demais grupos experimentais, quando comparado com o grupo controle (CCP). Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre dieta controle e as dietas experimentais, considerando os níveis de proteína sérica. O crescimento do fígado durante a dieta restritiva foi, principalmente devido a hiperplasia celular, exceto para o grupo de AT no qual o crescimento por hipertrofia celular foi o fator de crescimento predominante. Mais uma vez, durante o período de restauração alimentar o crescimento de células e do órgão ocorreu por hiperplasia e hipertrofia.

No geral, os resultados desta pesquisa indicaram que os grupos com CSL, mistura (CSL₆₄:AT₃₆) e a caseína comercial apresentaram capacidades similares para recuperação de ratos à partir de restrição protéica e restrição alimentar total. Autolisado de levedura (AT) como única fonte de proteína foi inferior às demais fonte protéica utilizada. É importante observar que os ratos submetidos a restrição alimentar ou protéica, no início da vida parecem não recuperar completamente o retardo no crescimento corporal e celular mesmo quando alimentados com dietas de alto valor nutritivo durante o período de restauração.

SUMMARY

The main purpose of this research was to evaluate different source of dietary protein such as: whey protein concentrate (WPC), an yeast autolysate (YA), and a mixture of WPC + YA (64:36 g/100g on protein basis), using commercial casein (CC) as control. The following composition was determined for the protein sources: protein (NxF); CC 83%, WPC 81.3%, YA 39.5% and the mixture (WPC+YA) 66.2%. Yeast autolysate presented high content, 32.4% of total fiber, 6.6%ashes, and 20% carbohydrate.

The biological assays were performed using male rats of the Wistar strains specific pathogens-free (SPF), with 21-23 days of age. The following diets, prepared according to AIN-93 were used: a control with commercial casein (CC), an experimental casein diet (EC), whey protein concentrate (WPC), an yeast autolysate containing diet (YA) and the mixture of WPC and YA 64:36 (w/w).

The first bioassay adopted the protein depletion (6% dietary protein) for 30 days, followed a protein restoration period (17% protein) for another 30 days. The results showed that rats with YA ingestion presented the lowest recovering ability, considering the following indexes: protein efficiency ratio (PER), food efficiency ratio (FER) and protein digestibility apparent (pDa), while rats on standard casein diet showed the highest indexes. Liver DNA synthesis was lowest in YA treatment compared with the other experimental treatments. No difference was found between the dietary protein treatments (WPC, CCE and WPC64:YA36) regarding serum protein synthesis (total protein, total albumin) and the ratio albumin/globulin and liver protein synthesis (cell number and weight), except for the WPC diet which showed the highest ability among treatments for DNA synthesis. During the protein depletion period a reduction in body and liver growth was occurred mainly due to reduced DNA synthesis and cells division. Growth was mainly due to cells hypertrophy or growth in cells size. On the other hand during the protein repletion period growth was detected by both cell growth (hypertrophy) and cells proliferation (hyperplasia).

In the second bioassay a food restriction model was adopted in which 50% of ingestion of rats fed the control diet (*ad libitum*) was offered to the rats on the experimental groups. Each phase of the experimental (restriction and repletion) had

the duration of 21 days. The results of this experiment indicated: considering the same indexes measured in the first assay, the group fed on YA diet showed the lowest recovering compared to the casein control group. No statistical differences were found between the control diet and the experimental diets, regarding serum protein levels. Liver growth during diet restriction was mainly due to cell hyperplasia except for YA group for which cell hypertrophy was the predominating growth factor. Again, during the food restoration period cells and organ growth occurred by both hyperplasia and hypertrophy.

Overall, the results of this research showed that WPC, WPC64:YA36 mixture and commercial casein presented similar ability to recover rats from both dietary protein restriction and total diet restriction. Yeast autolysate (YA) as the sole source of dietary protein was inferior to the other sources used. It is important to notice that rats submitted to either protein or whole diet restriction, early in life, seem not to recover completely from cellular and body growth retardation even by the use of highly nutritive dietary protein, in the restoration period.

1. INTRODUÇÃO

A alimentação adequada é um direito humano básico, já o estado nutricional é um fator importante na vida de um indivíduo, desde o momento de sua concepção até a sua morte. Entre os principais nutrientes para a manutenção física, as proteínas têm um papel de destaque, por serem necessárias para o crescimento, manutenção e recuperação tecidual (Valente, 1997).

A desnutrição protéico-energética refere-se à deficiência de proteína e energia, normalmente acompanhadas por lesões fisiológicas. Estes distúrbios são freqüentemente agravados por processos infecciosos e pela diarreia ou muitas vezes pela associação entre ambos, os quais afetam a absorção dos principais nutrientes (proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais). O estado de desnutrição protéica é caracterizado pela redução das reservas protéicas do organismo e pela alteração do ritmo metabólico dos aminoácidos, acompanhado ou não de sinais e sintomas (Dichi & Burini, 1992).

Com o aumento da população mundial e o prognóstico da falta de alimentos no mundo, aumentou o interesse dos pesquisadores pelas fontes não convencionais de proteína para a nutrição humana. Entre as fontes não convencionais temos as proteínas de microrganismos, como bactérias, algas, fungos e leveduras que intensificaram seu interesse, pois elas são boas fontes de nutrientes de baixo custo (Caballero-Córdoba et al., 1997 ; Rosales, 1984).

O autolisado de levedura é um subproduto da biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, contendo um teor de proteína na faixa de 40-46%, lipídios totais ao redor de 3,5%, cinzas entre 7-8%, fibra alimentar total de 24-25% com predominância de componentes solúveis. Os aminoácidos mais abundantes na proteína de levedura são o ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, alanina, serina e treonina. Os aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína) e por vezes a leucina, encontram-se limitantes, quando comparados com padrões internacionais da FAO/WHO (Vilela et al., 2000).

Os nucleotídeos e nucleosídeos extraídos por hidrólise de RNA da biomassa de leveduras podem ser utilizados com propósitos terapêuticos por estarem envolvidos em quase todos os processos celulares e por desempenharem papel importante na função estrutural, energética e na regulação de vários processos metabólicos (Sommer, 1998 ; Walker, 1994).

Os concentrados de proteína do soro de leite contêm elevado teor de proteína (30 a 90%) com teores de aminoácidos superior ao da caseína em relação à digestão, absorção e disponibilidade de aminoácidos, similar ao leite humano. Além das suas propriedades nutricionais, as proteínas do leite apresentam importantes propriedades funcionais fisiológicas como: desenvolvimento e proteção do sistema imunológico, proteção contra carcinógeno, atuam como alimentos prebióticos por promoverem o crescimento de populações de bactérias benéficas à flora intestinal e melhoram as condições de saúde de indivíduos sob estresse nutricional e doenças neuro-degenerativas (Sgarbieri et al., 2000 ; McIntosh et al., 1995).

A proposta deste trabalho foi estudar o efeito da restrição protéica ou alimentar no desenvolvimento de ratos recém-desmamados alimentados com diferentes fontes protéicas sob certos parâmetros: índices de desenvolvimento corporal e nutricional (PERop, QEA e digestibilidade aparente, entre outros); índices de desenvolvimento celular do fígado (RNA, DNA, proteína total, peso dos hepatócitos e número de núcleos) e índices bioquímicos (proteína total, albumina e relação albumina/globulina), comparando-os com uma dieta padrão. No período de repleção protéica ou restauração alimentar foram, também, estudados os mesmos parâmetros acima citados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Desnutrição protéica e energética

A desnutrição protéica e energética é um problema que atinge principalmente países em desenvolvimento, tornando-se um obstáculo importante para o seu desenvolvimento. Em nível de comunidade, a desnutrição protéica e energética é uma desordem típica das classes populacionais de baixa renda. A desnutrição protéica é vista com maior frequência em crianças, devido às suas maiores exigências de proteínas e energia por quilograma de peso corpóreo. Adicionalmente apresenta maior suscetibilidade a fatores, tais como infecções (que aumentam as exigências protéicas) e sua incapacidade de obter alimentos por meios próprios (Martínez, 2001 ; Dichi & Burini, 1992).

A desnutrição protéica e energética caracteriza-se por duas síndromes: kwashiorkor e marasmo. O kwashiorkor é encontrado usualmente em crianças entre 1 e 5 anos de idade, e é causado pela deficiência da proteína dietética. A criança com kwashiorkor apresenta diminuição aguda da velocidade de crescimento, irritabilidade, perda de massa muscular, edemas, alterações da cor e textura dos cabelos, com despigmentação da pele e dermatose, entre outros sintomas (Cardoso, et al., 1991).

O marasmo resulta de restrição crônica e grave, tanto de energia como de proteína, sendo que, as deficiências de energia ocorrem simultaneamente com as deficiências de aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais. O marasmo é normalmente encontrado em crianças de todas as idades, devido a vários fatores como: pobreza, escassez de alimentos, condutas inadequadas com a criança, separação da criança amamentada do peito de sua mãe, alimentação com mamadeiras muito diluídas, entre outros. Uma criança marasmática caracteriza-se por baixo peso, com perda acentuada de gordura subcutânea, atrofia muscular, diarreia e anemia, geralmente não há edema e os níveis de proteínas plasmáticas podem ser normais ou discretamente baixos (Martorell, 2001 ; Rossouw, 1989).

A utilização de proteínas pelo organismo, envolve uma série de eventos, que vão desde a digestão, absorção intestinal, até a utilização periférica dos aminoácidos.

Os nutrientes não atuam de modo isolado no organismo. Suas funções são coordenadas e inter-relacionadas no metabolismo, envolvendo as células hepáticas, os hormônios, e os níveis plasmáticos de aminoácidos (Marchini et al., 1993).

O processo de síntese e degradação protéica exige uma oferta de energia alimentar adequada, sendo sensível à deficiência de energia. A inadequação calórica determina a utilização das proteínas para fins energéticos, ocorrendo muitas alterações como redução na taxa metabólica e redução na velocidade de crescimento dos animais. Em ratos, dietas hipoprotéicas levam à anorexia, diminuição da taxa de metabolismo basal, diminuição da velocidade de crescimento, redução da síntese e elevação da degradação de proteína muscular e redução na relação de aminoácidos essenciais e não-essenciais (Cardoso, et al., 1991; Young & Marchini, 1990).

As principais conseqüências da desnutrição protéicas energéticas sobre o metabolismo em humanos ou animais são: a redução na taxa de metabolismo basal devido ao mecanismo adaptativo para conservação de energia, o que conduz à diminuição, da multiplicação e crescimento celular, levando à perda de peso e uma diminuição da massa intestinal e do fígado, em conseqüência da redução na síntese de DNA , RNA e proteína (Davies et al., 1989).

De acordo com Beck et al. (1989), a restrição calórica e protéica durante a fase inicial da vida animal, reduz substancialmente os componentes químicos DNA, RNA e proteína total, que desempenham função importante na estabilidade e rendimento funcional das células. Os resultados de Enesco & Leblond (1962) mostram em relação à síntese de DNA hepático, um acentuado aumento durante a vida fetal; após o nascimento, esta atividade de síntese diminui progressivamente até atingir um nível de estabilização aos 95 dias de vida.

Masanés et al. (1999), avaliaram o efeito de diferentes teores de proteína sobre taxa de síntese protéica em animais alimentados com dieta comercial, contendo diferentes teores de proteína: 20% proteína (controle), 36% (alto teor protéico) e 9,5% (baixo teor protéico) durante 30 dias. Foram avaliados os ganhos de peso e a taxa de síntese protéica em diferentes órgãos (músculo esquelético, pele, fígado, intestino delgado, rim e pulmão). Os autores concluíram que o grupo de animais com ingestão de 9,5% de proteína, apresentaram menor ganho de peso corporal, menor

taxa de crescimento (50% menor que o controle), menor taxa de síntese protéica, menor relação de massa muscular e elevação na síntese de lipídios.

2.2. Ingredientes protéicos

2.2.1. Composição e propriedades nutricionais das proteínas de soro de leite bovino

O leite bovino é um fluido biológico complexo cuja composição média apresenta 87% de água, 3,5 a 3,7 % de lipídeos, 4,9% de lactose, 0,7% de cinzas e 3,5% de proteína (2,9% caseína e 0,6% de proteína de soro). O leite é uma dispersão natural de gordura em uma fase aquosa, cujas propriedades físicas são similares às da água, mas são modificadas pela concentração de solutos e pelo estado de dispersão dos outros componentes. É um sistema de duas fases em equilíbrio, consistindo de uma fase micelar e de uma fase líquida representada pelo soro (Lourenço, 2000).

As proteínas do leite são classificadas em: caseína e proteínas do soro. As caseínas constituem a classe quantitativa principal, de 76 a 86% da proteína total, e são química e estruturalmente mais complexas que as proteínas do soro que representam cerca de 20% da proteína do leite. Caseínas são um grupo heterogêneo de fosfoproteínas ricas em lisina, porém com menor concentração dos aminoácidos sulfurados, quando comparado com as proteínas do soro (Sgarbieri, 1996) .

O soro de leite é uma mistura de proteínas, lactose, vitaminas, minerais e uma parte de gordura. Todos estes componentes podem ser modificados e utilizados conforme as necessidades específicas do produto em que será utilizado. Isto aplica-se sobretudo ao teor de proteína, o qual pode ser ajustado de 12% a valores superiores a 90% de proteína. Nenhum outro ingrediente apresenta esta flexibilidade, e isto explica a razão pela qual, o soro de leite e seus derivados são considerados ingredientes principais de tantos outros produtos alimentícios (Dallas, 1999).

As proteínas do soro de leite são estudadas com base em três fatores: 1) propriedade nutricional; 2) propriedade funcional tecnológica 3) propriedades

biológicas e fisiológicas como efeitos terapêuticos ou profiláticos (Regester et al., 1996). As proteínas totais do soro de leite são uma fonte protéica de qualidade que estão disponíveis na forma de concentrados, isolados e outros. As propriedades do soro de leite realçam a qualidade nutricional, como suplementação direta de dietas ou como um ingrediente em uma variedade de formulações de alimentos e bebidas. A indústria alimentícia vem explorando este aspecto da proteína do soro em produtos, tendo como principais alvos os vegetarianos, os atletas, os halterofilistas, os indivíduos sob condição de estresse nutricional, em recuperação de saúde, os idosos e todas as pessoas ativas em geral (Wit, 1998).

As propriedades funcionais tecnológicas das proteínas do soro de leite bovino incluem as propriedades físicas como textura, estrutura e aparência global do alimento, capacidade de formar gel, espuma ou ligação de água. Oferecem ainda uma gama de possibilidades e opções para formulação e desenvolvimento de produtos alimentícios, apresentando flexibilidade e adaptabilidade própria, possuindo numerosas vantagens funcionais como boa solubilidade, viscosidade, geleificação, emulsificação, retenção e incorporação de gordura, além de realce de cor, sabor e textura (Lagrange & Dallas, 1997 ; Barford et al., 1986).

A principal propriedade nutricional das proteínas do soro de leite é fornecer energia e os aminoácidos essenciais e não essenciais, necessários para o desenvolvimento e crescimento. Fornecem as proteínas e peptídios específicos durante o processo de digestão, que irão facilitar a assimilação de nutrientes; as vitaminas (riboflavina, tiamina e ácido pantotênico) e minerais (cálcio e fósforo), os quais são importantes para o crescimento celular e o restabelecimento tecidual (Walzem et al., 2002).

O alto valor nutritivo e biológico das proteínas do leite é devido ao seu teor aminoacídico e do tipo de processamento envolvido para sua obtenção. De acordo com Bounous & Gold (1991) a atividade biológica das proteínas de soro de leite só é mantida, quando não ocorre nenhum tipo de desnaturação, seja durante o processamento ou por adição de substâncias ou agentes desnaturantes, que podem acarretar a perda da função biológica (Smithers et al., 1996).

As proteínas do soro de leite diferem das caseínas quanto às suas propriedades estruturais físico-químicas e composição de aminoácidos, principalmente em relação ao elevado teor dos aminoácidos de cadeias ramificadas (isoleucina, leucina e valina) e sulfurados (metionina + cisteína). O teor de aminoácidos essenciais das proteínas do soro de leite é muito equilibrado, tornando-o um alimento de alto valor nutritivo e de fácil digestibilidade, principalmente em relação aos aminoácidos sulfurados metionina/cisteína. Raras são as proteínas, mesmo de origem animal que tenha uma relação tão equilibrada. Somente o leite humano apresenta uma relação dos aminoácidos sulfurados superior à do soro de leite bovino (Guzman, 1995).

Alguns aminoácidos apresentam desempenho importante nos processos bioquímicos e fisiológicos, entre elas podemos citar os aminoácidos sulfurados, que influenciam o estado de metilação das moléculas de DNA durante a divisão celular. O aminoácido triptofano é um precursor da serotonina (responsável pela regulação do sono) e o aminoácido cisteína, que é um componente da glutathione, a qual está envolvida com a proteção do organismo contra a peroxidação lipídica, contra as formas de oxigênio reativo e a formação de radicais livres que danificam as moléculas de DNA (Heine et al., 1991).

A fração protéica do soro de leite bovino contém alta concentração dos aminoácidos isoleucina, treonina, metionina, lisina e cisteína, quando comparado com o leite humano. O conteúdo de aminoácido lisina presente nas proteínas do soro de leite, pode ser utilizado como complemento para proteínas dos cereais ou como alimentos dietéticos, devido ao seu baixo teor de calorias, portanto, as características funcionais e nutritivas dessas proteínas, representam vantagens na elaboração de ampla faixa de produtos (Amiot, 1991).

As proteínas do concentrado protéico, por apresentarem baixo conteúdo dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, podem ser usados em formulações alimentícias destinadas às crianças que têm capacidade limitada em metabolizar esses aminoácidos, como também para pacientes com fenilcetonúria, tirosinemia e hiper fenilalaninemia (Guzman, 1995).

2.2.2. Propriedades funcionais fisiológicas das proteínas de soro de leite

Alimentos funcionais ou também conhecidos como alimentos fisiologicamente funcionais ou nutracêuticos são definidos como: “qualquer alimento ou ingrediente que tenha impacto positivo na saúde individual, desempenho físico ou estado mental em adição ao seu valor nutritivo” (Hardy, 2001).

Os alimentos funcionais ou nutracêuticos fazem parte de uma nova concepção de alimento, que evoluiu no Japão, na década de 80, através de um programa de governo para desenvolver alimentos saudáveis, com propriedades medicinais, em virtude do envelhecimento da população, diante do aumento de sua expectativa de vida (Arabbi, 2001).

De acordo com Sgarbieri & Pacheco (1999), os alimentos funcionais fisiológicos podem ser aqueles que desempenham funções, que vão além das funções nutricionais conhecidas, por conterem substâncias que atuam no organismo, modulando funções bioquímicas e/ou fisiológicas, que resultam em maior proteção à saúde, retardando, inclusive, processos patológicos que conduzem a doenças crônicas e degenerativas. Para que os efeitos funcionais fisiológicos sejam efetivos, as substâncias funcionais devem estar presentes nos alimentos em concentrações adequadas.

As proteínas presentes no concentrado protéico do soro de leite são: β -lactoglobulina, α -lactalbumina, lactoferrina, lactoperoxidase, imunoglobulinas, glicomacropeptídeos, a soralbumina bovina (BSA), imunoglobulinas, proteose-peptonas, transferrina e enzimas, que têm sido estudadas em animais e humanos. (Fonseca et al., 1999).

Essas proteínas possuem diversas propriedades fisiológicas funcionais que atuam em diversos sistemas biológicos presentes no organismo animal e humano. Entre suas principais propriedades estão: atividade antibacteriana, antiviral, anticarcinogênica, imuno-estimulatória e também propriedade prebiótica. Proteínas como α -lactalbumina e lactoferrina, podem tornar-se essenciais na preparação de uma nova geração de fórmulas infantis, pois são compostos protéicos que mais se

assemelham ao teor de aminoácidos do leite humano (Tomé & Debabbi, 1998 ; Wit, 1998).

De acordo com Brennan et al., (1986), estudando os benefícios da ingestão de formulações enriquecidas com aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina e valina) no controle do estímulo de síntese e degradação de proteínas "in vitro", "in vivo" e sob estresse nutricional (maior necessidade de nutrientes), os resultados sugerem ocorrer um aumento no estímulo de síntese protéica em cerca de 50% e uma redução na degradação protéica em cerca de 25% no estudo "in vitro". Estudos "in vivo" apresentaram uma menor necessidade calórica para a manutenção do balanço de nitrogênio. Os dados clínicos dos pacientes sob estresse nutricional (grandes cirurgias ou desnutrição protéica e calórica) mostram um efeito positivo sobre o metabolismo das proteínas com um aumento no conteúdo de nitrogênio (balanço positivo).

Boza et al. (1996), estudando ratos alimentados com proteína do soro e proteína hidrolisada de soro, observaram que ambas as dietas conseguiram recuperar ratos desmamados e desnutridos, entretanto, as dietas com proteínas hidrolisadas, sugerem ser melhor fonte de nitrogênio, por apresentar melhor absorção dos peptídios no intestino, melhor conteúdo de proteína e baixa antigenicidade.

Regeister et al., (1996), realizaram um estudo comparativo entre diferentes fontes protéicas como soro de leite bovino integral, ovos, leite integral, carne vermelha, soja, caseína e trigo, observando os seguintes parâmetros: valor biológico, conteúdo de aminoácidos essenciais e conteúdo de aminoácidos sulfurados, tendo o rato como modelo experimental. Os resultados indicaram que o soro de leite apresentou o melhor índice para valor biológico, o qual mostrou ser mais eficaz na concentração de energia no organismo do que as demais dietas; o teor de aminoácidos essenciais e o conteúdo dos aminoácidos sulfurados do soro de leite bovino foram superior às demais dietas, particularmente quando comparado com a proteína de soja.

As proteínas do concentrado protéico de soro de leite bovino possuem propriedade prebiótica, que promovem o crescimento de populações microbianas com função de proteção, como as bifidobactérias que atuam na prevenção de doenças, como o câncer (Walzem et al., 2002 ; Chala et al., 1997).

Outros papéis fisiológicos importantes das proteínas do leite são as substâncias chamadas de peptídeos bioativos, que favorecem as atividades fisiológicas como: hipocolesterolêmica, antimicrobiana, antibacteriana e anti-inflamatória. Estes peptídeos bioativos são produzidos através da proteólise da caseína ou proteínas de soro, durante a digestão gastrointestinal ou durante o processamento do alimento. Uma vez liberados no organismo, esses peptídeos podem agir como compostos reguladores, com atividade hormonal ou ainda exercer uma ou mais atividades biológicas diferentes. Entre as biotividades do leite podemos citar: imunoregulação e regulação da microflora intestinal, regulação da digestão e das funções gastrointestinais e hormonais, transporte de íons e fatores de crescimento, que são capazes de influenciar o desenvolvimento e crescimento do trato gastrointestinal no recém-nascido (Meisel, 1998).

Entre os principais peptídeos derivados da digestão da caseína podemos citar as casocininas (correspondente aos fragmentos de α_{s1} e β - caseínas) e casomorfina. As casocininas têm um efeito anti-hipertensivo e as casomorfina têm a capacidade de ligar-se a receptores opióides no epitélio intestinal ou em outras células. Em relação ao sistema imunológico ambos peptídeos apresentaram a capacidade de elevar a resposta imune e a atividade fagocitária (Schanbacher et al., 1998 ; Takano, 1998;).

Segundo Meisel (1998), os peptídeos opióides derivados das proteínas de leite prolongam o tempo de trânsito gastrointestinal, exercem uma ação antidiarréica e influenciam no transporte regular dos aminoácidos e no metabolismo posprandial por estimular a secreção de insulina. A caseína e a proteína de soro de leite possuem diferentes níveis de aminoácidos. A composição distinta de aminoácidos entre caseína e soro de leite pode influenciar diferentemente a síntese e o catabolismo das proteínas (Frühbeck, 1998).

As diferenças metabólicas existentes entre as proteínas da caseína e soro de leite foram estudadas por Boirie et al. (1997) que notaram diferença na velocidade de digestão e absorção dos aminoácidos no intestino, variável de acordo com o tipo de proteína ingerida. Essas diferenças afetaram a síntese protéica posprandial, digestão, absorção e a reserva dos aminoácidos. De acordo com a velocidade que os amino-

ácidos apareceram na corrente sangüínea, elas foram classificadas como proteína de rápida absorção ("fast protein") e proteína de absorção lenta ("slow protein"). Após a ingestão de caseína, o teor de aminoácidos no sangue foi baixo e a velocidade de absorção lenta, isto, porque ocorre maior demora no esvaziamento gástrico. Provavelmente, a caseína sofre processo de coagulação em meio ácido, dificultando a ação das enzimas proteolíticas no estômago ou talvez pela presença de peptídios opióides que são liberados durante sua digestão, os quais reduzem a motilidade gastrointestinal e retardam o esvaziamento gástrico, por interagirem diretamente com os receptores opióides do intestino. A caseína parece favorecer a conservação das proteínas no organismo, retardando o catabolismo. No concentrado protéico de soro de leite foi observadas uma digestão e absorção rápida pelo intestino e uma rápida elevação no teor de aminoácidos na corrente sangüínea; isto ocorre, porque as proteínas do soro permanecem solúveis no estômago e passam rapidamente para o intestino delgado.

As proteínas do soro parecem favorecer e estimular a síntese protéica no organismo. A importância do conceito de proteínas de absorção e metabolização rápida ou lenta é que elas poderão ser aplicadas em certas circunstâncias, nas quais o fornecimento de proteína pode ser fundamental, como por exemplo, na desnutrição protéico-calórica, onde a recuperação do indivíduo será mais rápida pela maior disponibilidade de aminoácidos plasmáticos e maior síntese protéica ou quando o excesso de aminoácidos na corrente sangüínea deve ser evitado, como por exemplo, nas doenças renais (McIntosh et al., 1998 ; Tomé & Debabbi, 1998)

Sgarbieri et al., (2000), realizaram um estudo comparativo da digestão e absorção dos aminoácidos das proteínas do concentrado protéico de soro de leite bovino, caseína comercial e caseinato de sódio em ratos "Wistar". Os ratos com peso corporal próximo a 300g foram submetidos ao jejum de 24 horas e em seguida intubados com igual quantidade de caseinato de sódio ou concentrado de proteína de soro (estômago) via veia porta foi retirado sangue nos tempos 10, 20, 40 e 60 minutos, observando-se a velocidade de aparecimento dos aminoácidos livres no soro sangüíneo. Os resultados indicaram que a velocidade relativa da digestão e absorção de aminoácidos das proteínas do concentrado do soro de leite foi mais rápida do que

da caseína e do caseinato de sódio, permitindo o aparecimento de um pico de proteína no soro sangüíneo aos vinte minutos após a intubação gástrica, com proteínas de soro.

De acordo com Bounous et al. (1988), dados clínicos e experimentais demonstraram que a desnutrição protéico-energética afeta desfavoravelmente vários componentes do sistema imune; uma plausível explicação para este fato é que uma ingestão inadequada de aminoácidos essenciais, principalmente, os aminoácidos sulfurados que não são armazenados no organismo, dificulta a síntese de proteína corporal. Todos os aminoácidos essenciais são necessários para o "pool" extracelular, portanto, a resposta imunológica humoral, expansão clonal dos linfócitos e a produção de anticorpos necessitam rápida síntese de proteína. Deste modo, a restrição de aminoácidos irá inevitavelmente interferir nesta função.

2.2.3. Composição e propriedades nutricionais dos derivados de leveduras

Os microrganismos foram introduzidos na alimentação humana há milênios, quando se iniciou o processamento de bebidas alcoólicas, queijos e panificação. Os principais fatores para a utilização dos microrganismos como fonte não convencional de proteína, baseia-se na peculiaridade dos microrganismos em se reproduzirem rapidamente, por utilizarem os mais diferentes tipos de substrato, podendo ser controlados laboratorialmente, independentes de fatores ambientais ou climáticos, além de possuírem elevado teor de proteínas e vitaminas (Litchfield, 1977).

As leveduras são fungos unicelulares que têm capacidade de assimilar grande variedade de substratos, alta velocidade de crescimento e biomassa de fácil separação. O gênero *Saccharomyces* tornou-se importante devido ao seu valor nutricional, comercial e industrial e suas espécies são amplamente utilizadas na indústria de panificação, no processo de fabricação do etanol, na produção de proteínas modificadas, sendo reconhecida pela Food and Drug Administration (FDA), como um organismo "seguro" para uso em alimentos (Sgarbieri, 1996).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de cana de açúcar. Como

consequência da grande produtividade da cultura da cana de açúcar e do amplo parque industrial sucro-alcooleiro, a biomassa de levedura tornou-se um grande excedente desta indústria, e pesquisas vêm sendo conduzidas com o objetivo de se utilizar esta fonte não convencional de proteína para a nutrição animal e humana (Sgarbieri et al., 2002).

A partir da biomassa de levedura podemos obter autolisado de levedura, extrato de levedura, concentrado protéico de levedura e parede celular. Os produtos derivados das leveduras podem ser utilizados como ingrediente em formulações de embutidos, em produtos extrusados, em biscoitos e massas, como aditivos para a produção de sopas, molhos, temperos e também como ingredientes de rações animais entre outras funções.

A biomassa de levedura lavada e seca, utilizada para a produção de autolisado é obtida a partir da ruptura das paredes celulares. Durante o processo de autólise, as proteínas da levedura são hidrolisadas a aminoácidos e peptídios, acompanhadas da liberação de outros componentes solúveis da célula, incluindo açúcares simples. A autólise das células pode ser induzida pelo aumento da temperatura, adição de substâncias plasmolizantes e outros fatores que facilitam o rompimento da parede celular e ativação das enzimas (proteases, carbohidrases, lipases, nucleases) da própria célula. As nucleases que participam do processo de autólise, atuam sobre os ácidos nucléicos, reduzindo-os a polinucleotídeos, mononucleotídeos e nucleosídeos (Sgarbieri et al., 2002 ; Reed & Nagodawithana, 1991).

O teor nutrientes presentes na biomassa de leveduras dependem do meio e das condições de crescimento, sendo que, o teor de proteína bruta pode variar de 45 a 60%. As leveduras contêm elevados teores dos aminoácidos treonina e lisina, entretanto, algumas linhagens de leveduras, apresentam baixos teores dos aminoácidos sulfurados e triptofano. A adição do aminoácido metionina à biomassa de levedura tende a melhorar o seu teor de aminoácidos e o seu valor nutricional (Sarwar, et al., 1985 ; Martini et al., 1979;).

O teor de carboidratos na matéria seca das células varia de 20 a 35%, sendo formado por diferentes polissacarídeos localizados na parede celular, 15 a 20% de glicanas e mananas (Halász & Lástity, 1991).

As leveduras são excelentes fontes de vitaminas do complexo B (B₁, B₂, B₆, niacina e ácido fólico). A biomassa de levedura é fonte de componentes lipídicos como ésteres de ergosterol, o qual é importante como um precursor de vitamina D₂ (ergocalciferol) (Kollar et al., 1992).

O teor de lipídios pode variar de 4 a 7% e dependerá da natureza do meio de crescimento. O conteúdo de cinzas está entre 8 a 10% da matéria seca, sendo os minerais fósforo, potássio, magnésio e cálcio os principais componentes das cinzas (Roshkova et al. 1986).

Além do valor nutritivo, a levedura e seus derivados apresentam alguns componentes com propriedades funcionais fisiológicas importantes. Dentre esses componentes, podemos citar nucleotídeos e nucleosídeos, glicanas e mananas, minerais (zinco e selênio) e vitaminas (complexo B). Essas substâncias têm, em comum, a propriedade de proteger o organismo, atuando como moduladores do sistema imunológico, tanto celular como humoral (Sgarbieri et al., 2002).

2.2.4. Propriedades funcionais fisiológicas dos derivados de leveduras

A utilização da proteína de levedura para o consumo humano encontra alguns fatores limitantes como a presença de parede celular rígida, a qual é de difícil digestão pelas enzimas digestivas humanas, reduzindo a biodisponibilidade de nutrientes intracelular. Pode ainda, conter agentes alergênicos e fatores que ocasionam distúrbios gastrointestinais (Gálvez et al., 1990). Este problema pode ser solucionado, utilizando vários métodos químicos, físicos, mecânicos e enzimáticos para rompimento das paredes celulares. O método mais utilizado é o mecânico, devido ao seu baixo custo, por ser eficiente e por não trazer nenhum inconveniente à saúde (Haláz & Lastity, 1991).

Após a ruptura mecânica das células de levedura, Caballero-Córdoba et al., (1997), obtiveram um melhor aproveitamento da proteína, conseqüentemente houve melhora significativa da digestibilidade (85,0%) e a utilização líquida protéica aparente foram de 75,0%. A autólise tem sido utilizada para modificar a parede celular de levedura pela ação de enzimas endógenas.

As leveduras são fontes ricas em ácidos nucleicos (8 a 25 g de ácidos nucleicos/100g de proteína) sendo que em vários tipos de células, grande parte está presente como ácido ribonucleico (Clifford & Story, 1976).

Há dois tipos de ácidos nucleicos: ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA), que controlam de forma integrada a síntese de proteínas, sendo que a base uracila é encontrada somente na molécula do RNA e a timina na molécula de DNA (Gutierrez, 1997).

Os nucleotídeos de pirimidina e purina estão envolvidos em quase todos os processos celulares e desempenham papel muito importante na função estrutural, energética e na regulação de vários processos metabólicos. Os nucleotídeos participam como ativadores intermediários na síntese de glicogênio, glicoproteínas e fosfolípidios, e atuam como doadores de grupos metilo e sulfato; estruturalmente são componentes de inúmeras coenzimas e também funcionam como efetores alostéricos para as enzimas (Gutierrez, 1997 ; Rudolph, 1994).

Os nucleotídeos e nucleosídeos extraídos por hidrólise de RNA de levedura podem ser utilizados também com propósitos terapêuticos, sendo que a purina tem efeito semelhante aos antibióticos, no tratamento de câncer por quimioterapia. Outro efeito importante dos nucleotídeos é seu uso como fator de crescimento do neonato (Crueger & Crueger, 1989).

Nas últimas décadas, evidências epidemiológicas têm sugerido uma correlação entre estado nutricional e imunocompetência. Alguns anos atrás, acreditavam-se que os nucleotídeos não eram necessários para o crescimento e desenvolvimento normal, pois poderiam ser sintetizados pelo próprio organismo; isto é verdadeiro, quando pensamos em indivíduos saudáveis que não foram defrontados com nenhuma mudança no seu sistema imunológico. Entretanto sabe-se que indivíduos com deficiência nutricional, ou que passaram por grandes cirurgias, como transplante de órgãos, infecção sistêmica ou qualquer tipo de injúria, em qualquer um dos sistemas orgânicos, isto se torna falso, pois o organismo não consegue suprir todos os nucleotídeos necessários para sua recuperação.

2.2.5. Efeitos dos nucleotídeos e nucleosídeos sobre os tecidos

A absorção, transporte e uso de nucleotídeos exógeno é um processo complexo e ainda não esclarecido. Os nucleotídeos purínicos e pirimidínicos são constantemente sintetizados e degradados como imposição à demanda biológica e fisiológica do organismo.

Os nucleotídeos e nucleosídeos utilizados em formulações, atuam na proteção, crescimento, desenvolvimento, maturação, e recuperação dos sistemas biológicos, tratogastrointestinal, imunológico e hepático durante um período de estresse nutricional (Pizzini et al. ,1990).

De acordo com Quan et al. (1990), os principais efeitos dos nucleotídeos na dieta sob o sistema imunológico são promover a maturação das células T e aumentar a produção das células T auxiliares, tais como: a interleucina-2 e outras linfocinas que atuam sobre o sistema imune. Aumentam a atividade das células "natural killer" que atuam diretamente na eliminação de células estranhas ao organismo.

Rudolph (1994), realizando uma série de estudos com animais alimentados com dieta livre de nucleotídeos, por um período prolongado demonstraram que a imunidade celular poderá ser significativamente reprimida.

Os trabalhos realizados por Kulkarni et al. (1992 e1994) sugerem que dietas livres de nucleotídeos em camundongos promovem danos na função das células T, provavelmente devido a um atraso na diferenciação e maturação dos linfócitos T associados com imunodeficiência; esses resultados foram confirmados em estudos "in vitro" e "in vivo".

De acordo com Carver et al. (1991), o mecanismo preciso da ação dos nucleotídeos, no processo de imunidade celular, não é totalmente conhecido, entretanto os dados disponíveis até o momento, sugerem que a suplementação com nucleotídeos pode contribuir para o aumento do "pool" de nucleotídeos disponíveis para formação de leucócitos no sistema imunológico.

Van Buren et al. (1994) e Barankiewicz & Cohen (1987), observaram que a ativação dos linfócitos T causa rápido aumento na síntese de nucleotídeos, que são

imediatamente necessários para aumentar e cobrir a energia necessária no metabolismo e, posteriormente, para síntese dos ácidos nucléicos.

A desnutrição protéica e energética em modelos animais, provoca redução no peso do fígado e do intestino, redução na divisão celular e na proliferação das células, no conteúdo de DNA e no teor de proteína (Butzner & Gall, 1988).

De acordo com os trabalhos de Uauy et al., (1990) e Uauy, (1994), a suplementação da dieta com nucleotídeos, para ratos recém desmamados, atuam na proteção do intestino delgado promovendo o aumento na espessura da parede intestinal, na altura das vilosidades e na profundidade das criptas intestinais e também aumenta as atividades das dissacaridases intestinais e o conteúdo de DNA nas células da mucosa intestinal, quando comparado com os animais alimentados com dietas livres de nucleotídeos. Os nucleotídeos podem servir como unidades precursoras de DNA e RNA, especialmente quando há baixa ingestão de proteína, podendo atuar no desenvolvimento, reparo e na maturação do intestino e de outros tecidos acelerando o processo de divisão celular.

Os nucleotídeos têm também a capacidade de aumentar a biodisponibilidade de ferro; também atuam como prebióticos, promovendo modificações da microflora intestinal, aumentando a população de bifidobactérias e reduzindo a população de enterobactérias; modificam as frações lipídicas do plasma, aumentando os níveis de colesterol - HDL e reduzindo o colesterol - LDL e promovem o crescimento e maturação do intestino (Brunser et al., 1994 ; Nuñez, et al., 1990).

No fígado, os nucleotídeos e os nucleosídeos atuam no crescimento, regulação, proteção e regeneração dos tecidos. Os nucleotídeos da dieta aumentam o "pool" de nucleotídeos no fígado, melhoram a função hepática, mantêm o balanço de nitrogênio (aumentando a retenção de nitrogênio e promovendo melhor utilização da proteína), têm um papel importante na síntese de glicogênio, e na capacidade de regularizar e aumentar o fluxo sanguíneo no fígado, e de estimular a produção de glicose e, ainda induzem o sistema de transporte dos aminoácidos em ratos (Lautt et al., 1985).

O requerimento de nucleotídeos no organismo, poderá aumentar consideravelmente, quando a função do fígado é comprometida. Em ratos

alimentados com dietas livres de nucleotídeos, uma diminuição significativa de DNA e conteúdo de proteína foi observada por Leleiko et al. (1983).

Carver (1994) observou que a restrição de nucleotídeos à dieta experimental em modelos animais, provocam um acúmulo de lipídios hepáticos e uma redução no conteúdo de glicogênio.

De acordo com López-Navarro et al. (1995), a restrição de nucleotídeos na dieta resulta na diminuição da concentração dos nucleotídeos hepáticos, ocorrendo maior degradação do RNA, isto ocorre, possivelmente, como um mecanismo de compensação, pela falta de nucleotídeos no fígado. Estes resultados indicam que os nucleotídeos da dieta são utilizados no fígado, principalmente para manter seu "pool" de nucleotídeos. Entre as consequências provocadas pela restrição de nucleotídeos foi citado: o acúmulo de gordura no fígado, a diminuição dos nucleotídeos solúveis, principalmente ATP e outros nucleosídeos derivados da citidina como monofosfato de citidina (CMP).

López-Navarro et al. (1996), estudaram a influência dos nucleotídeos sobre o fígado de ratos Wistar. Os animais receberam uma dieta livre de nucleotídeos durante um período de 21 dias. Os resultados indicam que durante o período de restrição de nucleotídeos ocorreu uma redução no conteúdo de DNA e RNA nos núcleos e nucléolos dos hepatócitos. Sob a hipótese de que o tamanho dessas organelas está relacionado com o conteúdo de ácidos nucléicos; observou-se que os nucleotídeos têm influência nos nucléolos hepáticos, quando comparados com sua influência sobre os núcleos. Este fato ocorre, provavelmente pelo alto "turnover" do conteúdo de RNA no fígado. O conteúdo de RNA no fígado foi mais afetado pela restrição dos nucleotídeos do que o DNA, provavelmente pela redução na produção de ribossomos como resultado da baixa síntese de RNAr (RNA ribossômico).

Portanto, esta revisão bibliográfica nos permite sugerir que o concentrado protéico do soro de leite bovino, contendo proteínas de rápida digestão e absorção, com excelente disponibilidade de aminoácidos essenciais, ausência de fatores antinutricionais, ausência de compostos tóxicos e atividades fisiológicas funcionais, bem como, as proteínas do autolisado de levedura, rico em proteína e ácido nucléico e de baixo custo, poderão mostrar resultados positivos na recuperação de ratos com desnutrição protéica e alimentar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria-prima

3.1.1. Autolisado

Autolisado (AT) foi preparado a partir de células íntegras de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), provenientes do Centro de Tecnologia da Cooperativa dos Produtores de Cana-de-açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (Copersucar), com sede em Piracicaba-SP. O processo para obtenção do AT foi realizado no setor de bioquímica do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, do Instituto de Tecnologia de Alimentos/ITAL, Campinas-SP. A biomassa de levedura lavada foi ressuspensa em água (10% p/v) e depois adicionada de alguns agentes autolisantes e plasmolizantes, a saber: 15% de um pré-autolisado, 7% de etanol e 2% de NaCl. A mistura com pH 5,5 foi levada para dorna de fermentação de 200 litros, onde foi mantido à temperatura de 55°C por 24 horas, sob agitação mecânica e posteriormente foi desidratada diretamente em "spray dryer" obtendo-se o autolisado desidratado.

3.1.2. Concentrado protéico de soro de leite bovino

Leite bovino tipo B desnatado e pasteurizado (73°C, 15 seg) foi fornecido pela Cooperativa dos Produtores de Leite da região de Campinas, município de Jaguariúna-SP. O soro doce foi obtido pela coagulação da caseína pela renina usando coalho comercial Ha-La - Christian Hansen, Valinhos-SP. Posteriormente, o soro foi separado do coalho de caseína por filtração e em seguida foi ultrafiltrado em membranas WGM - Kock membrane systems (São Paulo), com porosidade de corte para PM de 10 kDa, em seguida diafiltrado 15 vezes o volume inicial. Após esses processos, o concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL) (> 80% de proteína) foi liofilizado. Este processamento foi realizado na instalação piloto do Centro de Tecnologia de Laticínios, Instituto de Tecnologia de Alimentos/ITAL. Exceto na pasteurização a temperatura de processamento foi controlada para não exceder 45°C.

3.1.3. Caseína comercial

A caseína comercial foi fornecida pela M. Cassab Comércio e Indústria Ltda, com sede em São Paulo-SP.

3.2. Análises químicas

As amostras de caseína comercial (CCP), concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL), autolisado de levedura (AT) e a mistura na proporção em base (p/p) de CSL₆₄:AT₃₆ foram submetidas à seguintes determinações:

3.2.1. Composição centesimal

Os teores de proteína bruta, cinzas e umidade foram determinados de acordo com procedimentos descritos no AOAC (1990); os lipídios totais pelo método de Bligh & Dyer (1959), os carboidratos por diferença (100 - somatória de proteína, lipídeos, cinza e fibra total) e a fibra total (solúvel e insolúvel) pelo método de Asp et al. (1983). Para obtenção do teor de proteína utilizou-se diferentes fatores de conversão para o nitrogênio protéico, sendo 6,38 para as proteínas de origem bovina, 5,80 para o AT e 6,25 para a mistura.

3.2.2. Determinação de aminoácidos totais

A determinação de aminoácidos totais de acordo com Spackman et al. (1958) foi feita em analisador automático Dionex (modelo DX 300), com separação em coluna de troca iônica e reação pós coluna com ninidrina. A hidrólise das amostras protéicas foi feita com HCl 6 N por 22 horas a 110°C.

O triptofano foi determinado após a hidrólise enzimática com pronase (24 horas, 40°C) seguida de reação calorimétrica com solução de 4-dimetilamino benzaldeído (DAB) em ácido sulfúrico 21,2 N e a leitura foi a 590 nm contra curva padrão de triptofano em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000 (Spies, 1967).

3.2.3. Preparo das dietas experimentais

As dietas foram preparadas segundo American Institute of Nutrition (AIN-G) como descrito por Reeves et al. (1993), conforme descrito na Tabela 1. As dietas preparadas foram: concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL); autolisado de levedura (AT); mistura de concentrado protéico de soro de leite bovino + autolisado de levedura (CSL₆₄:AT₃₆), variando apenas o nível de proteína, 6% durante o período de restrição e 17% durante o período de repleção protéica. A caseína comercial foi utilizada de duas formas: uma como dieta padrão (CCP) contendo 17% de proteína durante todo o período experimental e a segunda forma foi como caseína experimental (CCE), variando o teor protéico de 6% durante o período de restrição (30 dias) e 17% durante o período de repleção (30 dias).

Tabela 1: Dieta formulada para a fase de crescimento de roedores - AIN-93G .

Ingredientes*	Proteína 17%	Proteína 6%
	(g/Kg dieta)	
Amido de milho	405,00	529,52
Caseína (83,0 % proteína)	205,30	72,40
Amido de milho dextrinizado	132,00	132,00
Sacarose	98,50	99,50
Óleo de soja	66,10	68,63
Fibra (celulose)	50,00	50,00
Mistura mineral (AIN-93G) (Tab2)	27,80	32,50
Mistura vitamínica (AIN-93VX) (Tab3)	10,00	10,00
L-cistina	3,00	3,00
Bitartarado de colina - 41,1% colina	2,50	2,50
Terbutilidroquinona	0,014	0,014
Dieta q.s.p.	1.000,00	1.000,00

* Fonte: Reeves et al. (1993).

A formulação das misturas minerais e vitamínicas (Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.) encontram-se nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: Mistura mineral (AIN 93G-MX)*.

Componente	g/kg
Elementos minerais essenciais	
Carbonato de cálcio anidro - 40,04% Ca	357,00
Fosfato de potássio monobásico - 22,76% P; 28,73% K	196,00
Citrato de potássio, tri-K, monohidratado - 36,16% K	70,78
Cloreto de sódio - 39,34% Na; 60,66% Cl	74,00
Sulfato de potássio - 44,87% K; 18,39 % S	46,60
Óxido de magnésio - 60,32% Mg	24,00
Citrato de férrico - 16,5% Fe	6,06
Carbonato de zinco - 52,14% Zn	1,65
Carbonato de manganês - 47,79% Mn	0,63
Carbonato de cobre - 57,47% Cu	0,30
Iodato de potássio - 59,3% I	0,01
Selenito de sódio anidro - 41,79% Se	0,01025
Paramolibdato de amônio - 4 H ₂ O - 54,34% Mo	0,00795
Elementos minerais potencialmente benéficos	
Meta-silicato de sódio - 9 H ₂ O - 9,88% Si	1,45
Sulfato de potássio crômico - 12 H ₂ O - 10,42% Cr	0,275
Cloreto de lítio - 16,38% Li	0,0174
Ácido bórico - 17,5% B	0,0815
Fluoreto de sódio - 45,24% F	0,0635
Carbonato de níquel - 45% Ni	0,0318
Vanadato de amônio - 43,55% V	0,0066
Sacarose	221,026

* Fonte: Reeves et al. (1993).

Tabela 3: Composição da mistura vitamínica (AIN 93 VX) *.

Componentes	g/kg
Ácido Nicotínico	3,000
Pantotenato de Cálcio D	1,600
Piridoxina - HCl	0,700
Tiamina - HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido Fólico	0,200
D-biotina	0,020
Cianocobalamina (B-12) (0,1% em manitol)	2,500
Acetato de all- <i>rac</i> - α -tocoferol (E) (500 UI/g)	15,00
Palmitato de all-trans-retinol (A) (500.000UI/g)	0,800
Colicalcifero (D3) (400.000 UI/g)	0,250
Filoquinona (Vitamina K)	0,075
Sacarose	974,655

* Fonte: Reeves et al. (1993).

3.3. Primeiro ensaio biológico - restrição protéica

O primeiro ensaio, com duração de 60 dias, foi realizado com o objetivo de testar a capacidade de recuperação dos animais submetidos a períodos de restrição protéica (6%) e repleção protéica (17%) com diferentes fontes de proteínas.

3.3.1. Animais utilizados

Os animais utilizados foram ratos machos da linhagem "Wistar", livres de patógenos específicos (SPF), com idade de 21 a 23 dias do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP. Esses animais permaneceram em gaiolas individuais, em laboratório com temperatura mantida em 22- 23°C, com alternância automática de claro- escuro de 12 horas. Os animais receberam alimentos e água *ad libitum*, e o peso e consumo de dietas foram registrados semanalmente, até o término do experimento.

3.3.2. Protocolo experimental de restrição protéica

No protocolo experimental foram utilizados, 110 animais, sendo que 10 foram sacrificados no início do experimento "tempo zero" (0 dia) para controle. Os demais animais foram distribuídos em 5 tratamentos, com 20 ratos por grupo, a saber: CCP (caseína padrão ou controle), CCE (caseína experimental), CSL (concentrado protéico de soro de leite bovino), AT (autolisado de levedura), e mistura (CSL₆₄:AT₃₆). Durante os primeiros 30 dias do experimento, os animais receberam dieta de restrição protéica com 6% de proteína. Após o período de trinta dias, os animais receberam uma dieta normocalórica com 17% de proteína até o término do experimento (60 dias). A dieta padrão caseína foi de 17% de proteína, durante todo o período experimental. Os animais foram sacrificados no tempo 30 (30 dias) e tempo 60 (60 dias) conforme mostra a Figura 1.

Este protocolo foi certificado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)-IB-UNICAMP, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

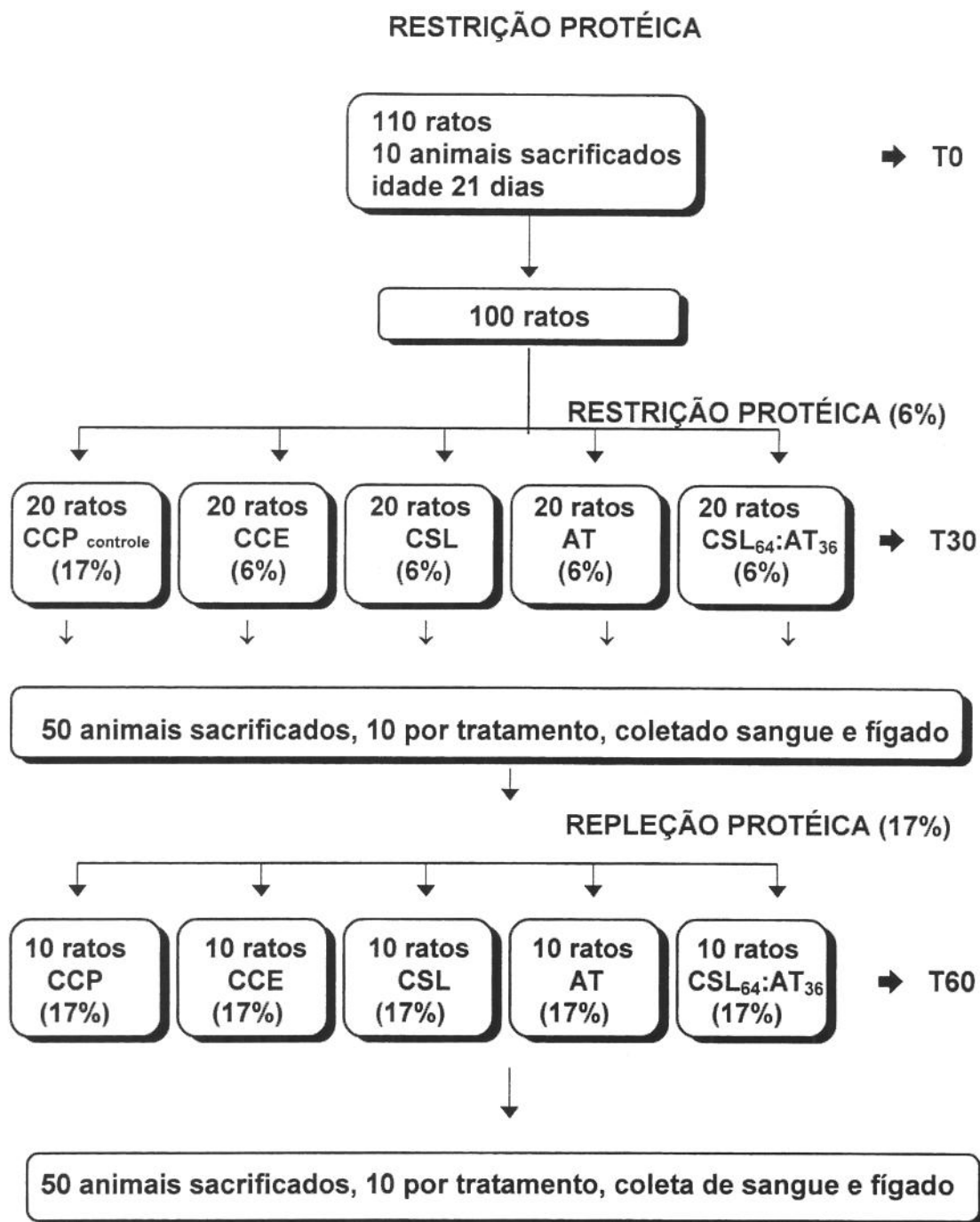


Figura 1: Esquema experimental experimental do primeiro ensaio biológico

T0 = Início do experimento

T30 = Amostras coletadas no 30º dia do experimento

T60 = Amostras coletadas no 60º dia do experimento

3.3.3. Coleta de sangue e análises bioquímicas

Os animais, após jejum de 16 horas, foram sacrificados no início do experimento "tempo zero " (0 dias), no período de 30 dias; e no final do experimento de 60 dias, para coleta de sangue por punção cardíaca.

As amostras de sangue coletadas foram colocadas em banho-maria a 37°C (marca Fanem modelo 100) por um tempo de 15 minutos, a seguir, foram centrifugadas em centrífuga de bancada Revan ciclo C.I a 471g por 15 minutos e o sobrenadante (soro) foi recolhido. No soro, as dosagens foram realizadas através de "kits" da Protal (Guarulhos - São Paulo): **a-)** Proteína Total leitura a 540 nm; segundo Doumas et al., 1971; **b-)** Albumina total com leitura de 625 nm; segundo Henry et al., 1957 e **c-)** Relação albumina/globulina (A/G). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000.

3.3.4. Coleta de fígado e análises bioquímicas

Imediatamente após a coleta de sangue, os fígados dos animais foram retirados, pesados, congelados e liofilizados para a dosagem de RNA, DNA e proteína total. A extração dos órgãos ocorreu nos tempos 0, 30 e 60 dias.

3.3.4.1. Ácido ribonucleico (RNA)

A extração foi realizada pelo procedimento de Schmidt & Thannhauser; modificado por Munro (1966), cujo princípio baseia-se na quantificação do RNA, através da intensidade do cromóforo formado pela ligação da ribose ao reagente orcinol; a leitura foi realizada a 670 nm em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000.

3.3.4.2. Ácido desoxirribonucleico (DNA)

A extração foi realizada de acordo com procedimento de Burton (1956), cujo princípio baseia-se na quantificação do DNA através da intensidade do cromóforo, formado pela reação da desoxirribose livre ao reagente difenilamina, que foi medido a 600 nm em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000.

3.3.4.3. Proteína total

Foi dosada através do “kits” Dye concentrado da Bio-Rad, com base no método de análise de Bradford (1976), cujo princípio baseia-se na quantificação da proteína, através da intensidade do cromóforo formado pela ligação da proteína ao corante coomassie brilhante blue, que foi medido a 595 nm, em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000.

3.3.4.4. Número de núcleos e peso dos hepatócitos

Com os resultados obtidos de DNA, RNA e proteína total foi realizado o cálculo matemático, para determinar o número de núcleos (número de células em milhões) e peso/núcleo (peso celular em mμg) no fígado, de acordo com os critérios citados por Enesco & Leblond (1962) conforme expressões abaixo:

$$\begin{array}{l} \text{N}^{\circ} \text{ Núcleos} \\ \text{(N}^{\circ} \text{ Células/em milhões)} \end{array} = \frac{\text{DNA total no órgão} \times 1000}{7,3/9,3}$$

$$\begin{array}{l} \text{Peso/ Núcleo} \\ \text{(Peso Células/ em m}\mu\text{g)} \end{array} = \frac{\text{Peso do fígado} \times 1000}{\text{N}^{\circ} \text{ Núcleos}}$$

Onde: 7,3 = conteúdo de DNA por núcleo em animais com idade entre 17 e 34 dias e
9,3 = conteúdo de DNA por núcleo em animais com idade entre 35 e 94 dias.

3.4. Avaliações nutricionais

O valor nutritivo da proteína foi estimado através dos seguintes índices nutricionais: quociente de eficiência alimentar (QEA) e digestibilidade aparente (Da) segundo metodologia descrita por Sgarbieri (1987).

O QEA e a (Da) foram determinados através das seguintes fórmulas:

$$\text{PERop} = \frac{\text{Ganho de peso (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}}$$

$$QEA = \frac{\text{Ganho de peso (g)}}{\text{Consumo de Dieta (g)}}$$

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

Onde: Da = Digestibilidade aparente
 NI = Nitrogênio ingerido
 NF = Nitrogênio fecal
 NA = Nitrogênio absorvido.

3.5. Segundo ensaio biológico - restrição alimentar

O segundo ensaio com duração de 45 dias, foi realizado com o objetivo de testar a capacidade de recuperação dos animais submetidos a período de restrição alimentar, com ingestão equivalente a 50% da média do consumo do dia anterior, pelo grupo padrão e período de restauração alimentar com oferta de dieta *ad libitum* (100%) com diferentes fontes de proteínas.

3.5.1. Protocolo experimental de restrição e restauração alimentar

O protocolo experimental foi conduzido com 65 animais, sendo 5 animais sacrificados no início do experimento denominados tempo zero (T0). Os demais foram distribuídos em 6 tratamentos, com 10 ratos por grupo, a saber: aprotéica (aprot.), CCP (caseína padrão), CCE (caseína experimental), CSL (concentrado protéico de soro de leite bovino), AT (autolisado de levedura) e mistura (CSL₆₄:AT₃₆). Durante os primeiros 21 dias do experimento, os animais receberam dieta de restrição alimentar com 17% de proteína, em cerca de 50% da média do consumo do dia anterior pelo grupo padrão (oferta *ad libitum*), após esse período, eles receberam uma dieta de restauração *ad libitum* com 17% de proteína até o término do experimento (42 dias).

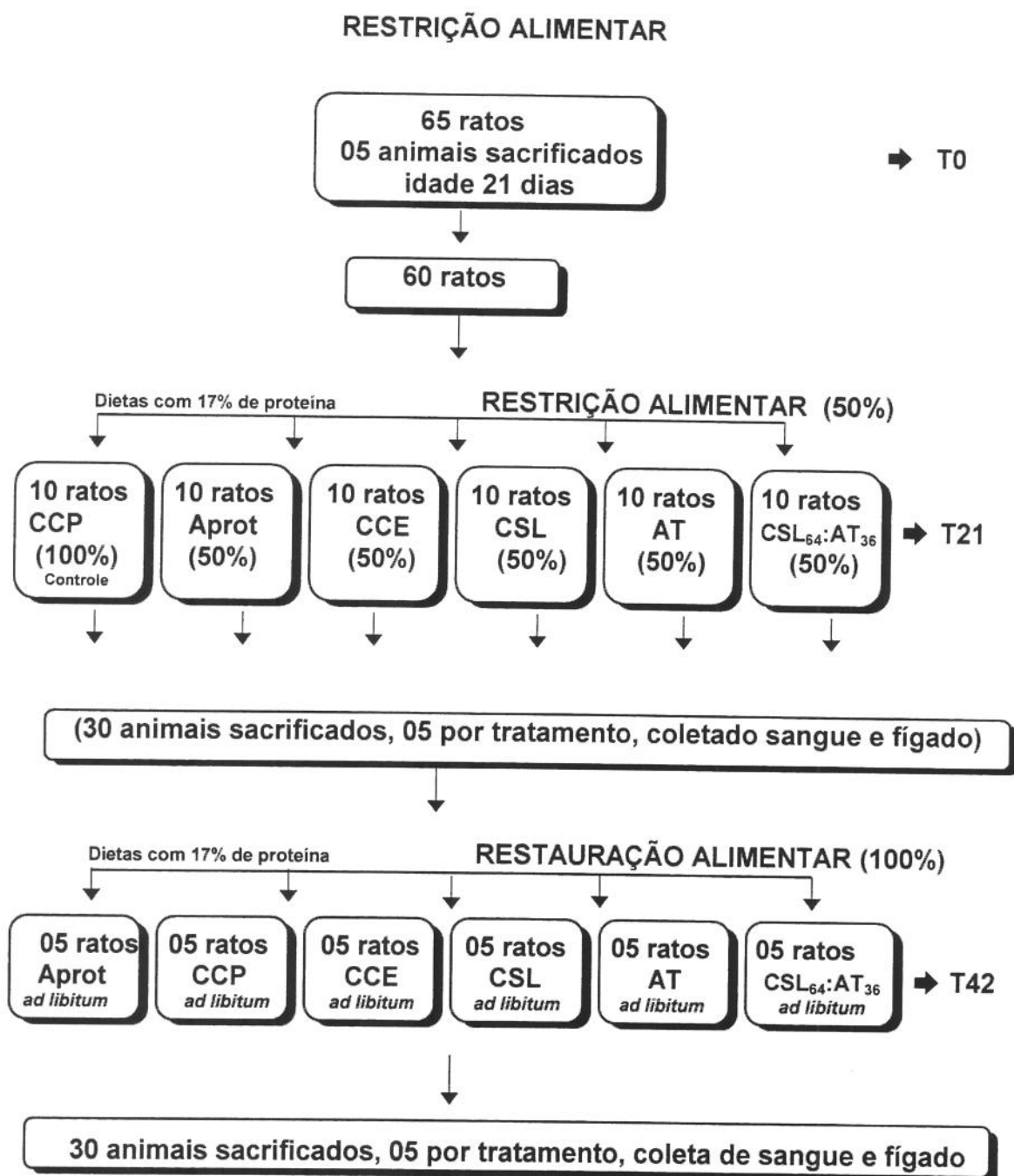


Figura 2: Esquema experimental do segundo ensaio biológico

T0 = Início do experimento

T21 = Amostras coletadas no 21º dia do experimento

T42 = Amostras coletadas no 42º dia do experimento

Os animais foram sacrificados no tempo 21 (21 dias) e 42 (42 dias) para coleta de sangue e fígado. Nesses períodos também foram calculados os seguintes índices nutricionais: quociente de eficiência protéica operacional (PERop); quociente de eficiência alimentar (QEA), digestibilidade aparente (Da) e quociente de utilização líquida da proteína (NPR), conforme já discutido nos itens 3.4 e 3.5.1.

O grupo aprotéico (aprot) foi eliminado quando cumpriu o objetivo de fornecer dados para cálculo do quociente de utilização líquida da proteína (NPR), conforme fórmula abaixo. Este protocolo foi certificado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa/UNICAMP).

$$NPR = \frac{\text{Ganho de peso GI (g)} + \text{perda de peso GII (g)}}{\text{Proteína consumida}}$$

Onde: GI = grupo em dieta protéica
 GII = grupo em dieta aprotéica

3.5.2. Preparo das dietas e análise nutricional

As dietas foram preparadas com 17% de proteína de acordo com American Institute of Nutrition (AIN-G), descrito por Reeves et al. (1993) conforme já descrito no item 3.2.3., com acréscimo de uma dieta aprotéica (Aprot).

3.5.3. Coleta de sangue, fígado e análises bioquímicas

O sangue e o fígado foram coletados no 1º (T0), no 21º (T21) e 42º dia (T42). A obtenção, tratamento e análises do soro foram idênticas conforme descrito no item 3.3.4. O tratamento do fígado foi semelhante ao descrito no item 3.3.5.

3.6. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (Gomes, 1982). As diferenças entre as médias dos tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. O pacote estatístico utilizado foi o Statística (Basic Statistics and Tables Program).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição química

Os resultados da caracterização química em base seca da caseína comercial (CC), concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL), autolisado de levedura (AT) e mistura de concentrado protéico de soro de leite bovino + autolisado de levedura (CSL₆₄:AT₃₆) estão presentes na Tabela 4.

Tabela 4: Composição centesimal aproximada da caseína comercial (CC), concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL), autolisado de levedura (AT) e mistura composta por concentrado protéico de soro de leite + autolisado de levedura (CSL₆₄:AT₃₆).

Componentes (%)	CC	CSL	AT	CSL ₆₄ :AT ₃₆
Proteína	83,0±0,01 ^a	81,3±0,03 ^b	39,5±0,04 ^d	66,2 ±0,25 ^c
Lipídios Totais	1,9±0,01 ^c	3,2±0,00 ^a	1,2±0,00 ^d	2,5±0,00 ^b
Cinzas	3,5±0,01 ^c	3,5±0,00 ^c	6,6±0,00 ^a	4,6±0,02 ^b
Fibra Total	nd	nd	32,4±0,00 ^a	11,7±0,01 ^b
Carboidrato*	11,6±0,01 ^d	12,0±0,02 ^c	20,3±0,01 ^a	15,0±0,00 ^b

(*) Cálculo por diferença (somatória dos componentes estudados - 100) ; nd= não determinada

Observa-se na Tabela 4, que a caseína comercial (CC) apresentou teor de proteína elevado diferindo estatisticamente dos demais tratamentos experimentais ao nível de 5% de significância. Para lipídios totais a dieta com CSL apresentou o melhor resultado diferindo dos demais tratamentos. A composição do autolisado de levedura mostrou teores elevados para cinzas (6,6%), fibras totais (32,4%) e carboidratos (20,3%) diferindo estatisticamente dos demais tratamentos à nível de 5% de significância.

A alta concentração de cinzas no autolisado de levedura deve-se, principalmente, à adição de cloreto de sódio durante o processo de obtenção do produto. Já o elevado teor de carboidrato é devido à adição de maltodextrina no processo de secagem em "spray dryer". A composição da mistura (CSL₆₄:AT₃₆) apresentou valores intermediários de proteína, fibra total e cinzas. Estes resultados estão de acordo com Jacobucci et al. (2001), Vilela et al. (2000) e Pacheco et al., (1997).

4.2. Composição de aminoácidos, escore químico e PDCAAS

A composição de aminoácidos da caseína comercial (CC), concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL), autolisado de levedura (AT) e mistura (CSL₆₄:AT₃₆) é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Aminoácidos dos tratamentos de caseína comercial (CC), concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL), autolisado de levedura (AT) e mistura (CSL₆₄:AT₃₆).

Aminoácidos (g/100g Prot)	CC	CSL	AT	CSL ₆₄ :AT ₃₆
Ac aspártico*	7,60	10,50	10,30	10,70
Treonina	4,70	6,88	5,20	6,60
Serina	6,40	5,53	5,10	5,00
Ac. glutâmico	24,60	17,81	12,40	16,20
Prolina	11,70	5,97	3,00	5,50
Glicina	1,90	1,79	3,90	2,40
Alanina	3,60	4,75	2,50	2,20
Valina	6,25	5,42	5,37	5,57
Metionina + cisteína.	3,02	4,91	2,50	3,80
Isoleucina	4,80	5,69	4,20	5,60
Leucina	10,10	10,55	6,00	9,90
Fenilalanina + tirosina	11,50	6,58	6,50	6,40
Lisina	8,70	9,97	8,70	9,20
Histidina	2,80	5,54	4,20	3,80
Arginina	3,51	1,56	2,65	2,48
Triptofano	1,55	2,06	1,36	1,59

(*) amostras em duplicata.

A caseína padrão (CC), o concentrado protéico de soro de leite (CSL) e a mistura (CSL₆₄:AT₃₆) apresentaram resultados superiores aos recomendados pela FAO/WHO (1991), para crianças na faixa de 2 a 5 anos de idade, não apresentando nenhum aminoácido limitante, conforme se observa na Tabela 6. A única exceção foi o autolisado de levedura (AT), que apresentou uma leve deficiência no aminoácido leucina.

Tabela 6 : Aminoácidos essenciais, escore de aminoácidos essenciais (EAE) e escore de aminoácidos essenciais corrigido pela digestibilidade verdadeira (PDCAAS) para as diferentes fontes protéicas estudadas (FAO/WHO, 1991).

Produtos (g/100 g P)*	FAO/WHO ¹	CC	CSL	AT	CSL ₆₄ :AT ₃₆
Treonina ⁺	3,40	4,70	6,88	5,20	6,60
Met+cisteína	2,50	3,02	4,91	2,50	3,80
Valina	3,50	6,25	5,42	5,37	5,57
Leucina	6,60	10,1	10,5	6,00*	9,90
Isoleucina	2,80	4,80	5,69	4,20	5,60
Fen+tirosina	6,30	11,5	6,58	6,50	6,40
Lisina	5,80	8,70	9,97	8,70	9,20
Histidina	1,90	2,80	5,54	4,20	3,80
Triptofano	1,10	1,55	2,06	1,36	1,59
PDCAAS (%)	100,00	100,00	100,00	91,00	100,00
EAE		≥ 1,00	≥ 1,00	0,91 (Leu)	≥ 1,00

(*) - Aminoácido limitante

(+) - Amostras em duplicata

EAE = Escore de aminoácidos essenciais

$$EAE = \frac{\text{mg de aa / g N da proteína teste}}{\text{mg de aa / g da proteína padrão}} \times 100$$

PDCAAS = EAE X Digestibilidade aparente da proteína

De acordo com Sarwar et al. (1985), todos os produtos derivados de leveduras contêm alto teor de treonina e lisina, porém, contêm baixos teores de aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína), e algumas vezes, deficiência em leucina (Sgarbieri et al., 2002). O autolisado de levedura obtido em nosso laboratório, não apresentou deficiência nos aminoácidos sulfurados e isto deve-se, provavelmente, aos cuidados e ajustes no processo de obtenção do produto.

Em relação aos PDCAAS observa-se na Tabela 6, que a CCP, CSL e mistura (CSL₆₄:AT₃₆) mostraram um escore de aminoácidos essenciais de 100%; única exceção foi o autolisado de levedura (AT) que apresentou escore de 91%, por apresentar o aminoácido leucina como limitante.

Quanto aos valores de EAE, nota-se que os produtos com caseína comercial (CC), CSL e mistura (CSL₆₄:AT₃₆) apresentaram valores próximos ou superiores a 1, os quais são comparáveis aos valores de referência da FAO/WHO (1991) mostrando suas qualidades protéicas. O AT apresentou valor de EAE inferior a 1 para o aminoácido limitante leucina (0,91). Pelos resultados apresentados podemos verificar que os concentrados protéicos: CC, CSL e a mistura apresentaram resultados semelhantes para EAE e PDCAAS e, que o autolisado de levedura (AT) apresentou qualidade protéica levemente inferior aos demais tratamentos.

4.3 Avaliação nutricional do primeiro ensaio biológico - restrição protéica

O primeiro ensaio biológico com duração de 60 dias refere-se ao modelo de restrição protéica. Os animais experimentais foram submetidos a períodos de restrição (6% de proteína/30 dias) e repleção protéica (17% de proteína/30 dias) com diferentes fontes de proteínas.

4.3.1. Consumo de dieta, consumo de proteína e ganho de peso

Os valores obtidos para consumo de dieta (CD), consumo de proteína (CP) e ganho de peso (GP) de ratos submetidos a períodos de restrição (6%), repleção protéica (17%) e período total (restrição + repleção protéica) com diferentes fontes protéicas, encontram-se na Tabela 7.

Pode-se observar em relação ao consumo de dieta (CD), na Tabela 7, que no período de restrição protéica, os animais da dieta padrão (CCP), os quais ingeriram dietas com 17% de proteína apresentaram resultado superior aos demais tratamentos, como esperado. Entre as dietas experimentais, o grupo de animais com dieta de autolisado de levedura (AT) apresentaram um consumo de 78,7% da quantidade consumida pelo grupo padrão (CCP), entretanto não diferiu estatisticamente dos tratamentos com CSL (consumo de 86,0%) e CCE (87,0%), porém diferiu da mistura (CSL₆₄:AT₃₆) que apresentou um consumo de 88,5% do grupo padrão.

Durante o período de repleção protéica (17%) o grupo padrão (CCP) manteve a maior ingestão e diferiu estatisticamente ($p \leq 0,05$) dos tratamentos com CSL e da

mistura (CSL₆₄:AT₃₆), que apresentaram a menor porcentagem de consumo, cerca de 86,0% e 88,5% respectivamente, da quantidade da dieta consumida pelo tratamento padrão (CCP), entretanto elas não diferiram dos demais tratamentos que apresentaram um consumo médio de 94,0% do grupo padrão. Em relação ao consumo total (período de restrição + repleção) observa-se que não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos experimentais (CCE, CSL, AT e mistura), que diferiram somente da dieta padrão, que apresentou resultado superior aos demais tratamentos.

Tabela 7- Consumo de dieta (CD), consumo de proteína (CP) e ganho de peso (GP) de ratos submetidos a períodos de restrição, repleção protéica e período total (restrição + repleção protéica) com diferentes fontes de proteínas.

Tratamentos	CD(g)	CP(g)	GP (g)
<i>Restrição protéica (6%)</i>			
0 - 30 dias -			
CCP (17%)	573,74 ± 19,05 ^{a*}	97,53 ± 3,23 ^a	203,20 ± 9,92 ^a
CCE	499,22 ± 39,69 ^{bc}	29,95 ± 2,37 ^b 121,23 ± 12,49 ^b	
CSL	496,97 ± 46,83 ^{bc}	29,82 ± 3,46 ^b	108,30 ± 10,03 ^{bc}
AT	451,96 ± 56,00 ^c	27,12 ± 3,36 ^b	93,36 ± 15,25 ^c
CSL ₆₄ :AT ₃₆	507,73 ± 34,00 ^b	30,46 ± 2,04 ^b	120,68 ± 13,00 ^b
<i>Repleção protéica (17%)</i>			
30 - 60 dias			
CCP	572,17 ± 39,57 ^a	97,27 ± 6,73 ^a	103,17 ± 19,21 ^a
CCE	538,56 ± 57,00 ^{ab}	91,55 ± 9,70 ^{ab}	116,83 ± 7,00 ^a
CSL	496,35 ± 60,00 ^b	84,40 ± 10,20 ^b	107,73 ± 13,10 ^a
AT	540,01 ± 28,50 ^{ab}	91,80 ± 4,84 ^{ab}	112,20 ± 9,40 ^a
CSL ₆₄ :AT ₃₆	507,54 ± 43,64 ^b	86,28 ± 5,34 ^b	114,35 ± 15,11 ^a
<i>Restrição e Repleção protéica (6 e 17%)</i>			
0 - 60 dias			
CCP	1.145,91 ± 32,41 ^a	194,85 ± 5,46 ^a	306,37 ± 27,63 ^a
CCE	1.037,78 ± 51,73 ^b	121,51 ± 8,81 ^b	238,06 ± 15,02 ^b
CSL	993,32 ± 89,51 ^b	114,22 ± 11,60 ^b 216,03 ± 15,98 ^{bc}	
AT	991,97 ± 55,91 ^b	118,92 ± 5,13 ^b	205,56 ± 9,52 ^c
CSL ₆₄ :AT ₃₆	1.015,27 ± 43,64 ^b	116,74 ± 5,50 ^b	235,03 ± 18,94 ^b

(*) Valores expressos como média (± desvio padrão) de 10 animais por tratamento, onde: CCP = caseína padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b,c) Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem entre si ($p \leq 0,05$) dentro de cada período de tempo.

Quanto ao consumo de proteína (CP), conforme mostra a Tabela 7, durante o período de restrição protéica, observa-se que os animais da caseína padrão (CCP) apresentaram resultados superiores e diferiram estatisticamente dos demais tratamentos experimentais. Em relação ao consumo protéico das dietas experimentais (CCE, CSL, AT e mistura), elas foram em média, cerca de 29,34% do grupo padrão (CCP), não ocorrendo diferença estatística entre os tratamentos experimentais ($p \geq 0,05$).

Para o período de repleção protéica (17%), os animais dos grupos experimentais CCE e AT não diferiram estatisticamente ($p \geq 0,05$) do grupo padrão (CCP) e dos demais tratamentos. Somente as dietas de CSL e mistura (CSL₆₄:AT₃₆) diferiram significativamente da dieta padrão. O consumo protéico total mostrou que a dieta padrão apresentou resultado superior aos demais tratamentos que não diferiram entre si ao nível de 5% de significância.

Na Tabela 7, encontram-se também as variações de peso corporal (GP) dos ratos alimentados com as diferentes dietas experimentais, durante o período de restrição (6%), repleção protéica (17%) e período total (restrição + repleção protéica).

Observa-se que durante o período de restrição protéica (6%), os animais alimentados com AT apresentaram o menor ganho de peso, cerca de 45,94% do grupo padrão (CCP), porém não diferiu estatisticamente do grupo com CSL (53,3%). Entretanto, diferiu dos tratamentos com CCE e CSL₆₄:AT₃₆ que apresentaram um ganho de peso médio de 59,5%, do grupo padrão. O grupo padrão (CCP), apresentou resultado superior aos demais tratamentos, como era esperado. Durante o período de repleção protéica (17% proteína) observa-se que não houve diferença estatística entre o grupo padrão (CCP) e os demais tratamentos experimentais ($p \geq 0,05$).

Quanto ao ganho de peso total (restrição + repleção), conforme mostra a Figura 3 nota-se que o grupo com autolisado de levedura (AT) apresentou o menor ganho de peso, cerca de 67,1% do grupo padrão, porém não diferiu estatisticamente do grupo com CSL (70,5%). Contudo diferiu estatisticamente dos tratamentos com CCE e CSL₆₄:AT₃₆ que apresentaram um ganho de peso médio de cerca de 77,0% do grupo padrão.

Pelos resultados apresentados, pode-se observar que os animais do grupo com autolisado de levedura (AT) apresentaram o menor ganho de peso, apesar de não ter ocorrido diferença estatística com o grupo alimentado com CSL. O menor ganho de peso e menor ingestão apresentados por este grupo, pode ter ocorrido

devido à qualidade protéica da dieta que é deficiente no aminoácido leucina, o qual pode reduzir a disponibilidade de aminoácidos para a síntese protéica, enquanto que o tratamento com CSL apresenta excelente teor de aminoácidos e por ser considerada uma proteína de fácil digestão e absorção, apresenta uma rápida disponibilidade de aminoácidos e alta síntese protéica (Dangin et al., 2001).

Quanto ao período de repleção, com a elevação no teor de proteína (17%), observamos que os animais experimentais (CCE, CSL, AT e mistura) apresentaram recuperação no ganho de peso, entretanto no período de tempo experimental não foi suficiente para a recuperação da deficiência provocada pela restrição protéica pós desmame conforme mostra a Figura 3.

Na Figura 3 encontra-se o crescimento cumulativo dos grupos de animais experimentais submetidos à restrição e repleção protéica durante o ensaio experimental.

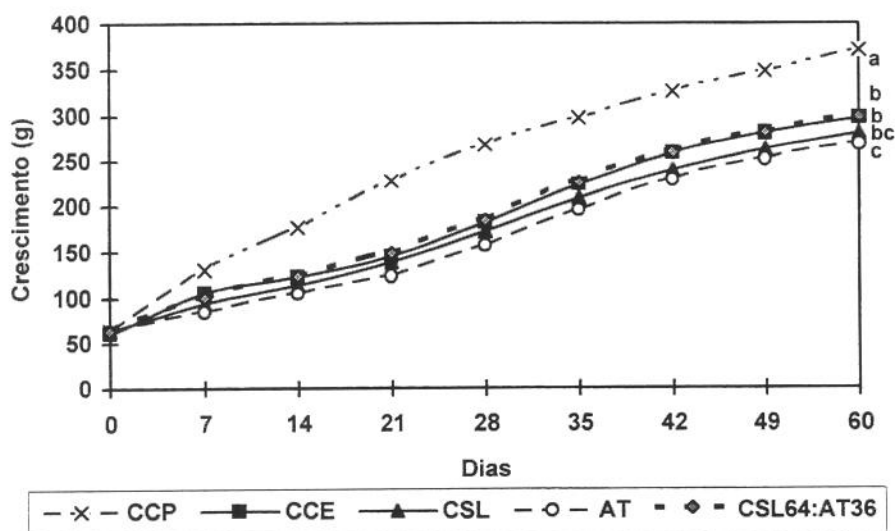


Figura 3: Curvas de crescimento de ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas.

(*) Valores expressos como média de 10 animais por tratamento, onde: CCP = caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL = concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b,c) Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Os resultados apresentados na Figura 3 mostram que o período de repleção protéica não foi suficiente para a recuperação completa dos grupos experimentais e

confirma os resultados apresentados por Winick & Noble (1966), que afirma que a restrição protéica provocada no período pós desmame, provoca uma redução na divisão celular e na aquisição de novas células, produzindo uma redução no ganho de peso corporal conforme podemos observar pelos resultados apresentados. O período de repleção normalizou os processos de divisão e a proliferação celular, entretanto não sanou os prejuízos causados pela restrição protéica na primeira fase após desmame.

Quanto ao menor consumo da ingestão alimentar apresentada pelo grupo com CSL, isto poderá ser explicado com base no trabalho publicado por Sgarbieri et al. (2000), quando observaram que a proteína do soro de leite é rapidamente digerida e absorvida pelo intestino, ao mesmo tempo em que estimulam a síntese de proteínas e o catabolismo protéico, permitindo um rápido fluxo de aminoácidos na corrente sanguínea, que desencadearia um processo fisiológico, provavelmente reduzindo o apetite dos animais.

4.3.2. Quociente de eficiência protéica operacional (PERop) e Quociente de eficiência alimentar (QEA)

Os efeitos da ingestão das dietas sobre os Quocientes de eficiência protéica (PER) e Quociente de eficiência alimentar (QEA) estão representados nas Figuras 4 e 6.

A dieta padrão (CCP) foi preparada com 17% de proteína e não com 10%, como recomenda o método oficial para determinação de PER, por este motivo, esses valores devem ser chamados de PERoperacional (PERop).

A Figura 4 mostra que durante o período de restrição protéica (6% de proteína) não houve diferença estatística entre as dietas CCE, CSL e mistura (CSL₆₄:AT₃₆) que diferiram da dieta padrão (CCP) ao nível de 5% de significância.

Durante o período de repleção protéica (17% de proteína) somente a dieta com AT apresentou um PER inferior aos demais, entretanto não diferiu estatisticamente do CSL, porém diferiu dos demais tratamentos estudados. Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos com CCE, CSL e (CSL₆₄:AT₃₆), que diferiram somente da dieta padrão (CCP) que apresentou um PER inferior aos demais tratamentos experimentais.

No período total (restrição + repleção protéica) observa-se que a dieta padrão (CCP), com teor de proteína igual a 17% apresentou valor de PER inferior às demais

dietas experimentais (6 e 17% de proteína) que apresentaram valores de PER superior ao padrão (CCP), devido ao menor ganho de peso e baixo consumo protéico durante o período de restrição protéica. Estes resultados foram superiores ao apresentado por Beck et al. (1989), trabalhando com dieta deficiente em proteína ao nível de cerca de 5%.

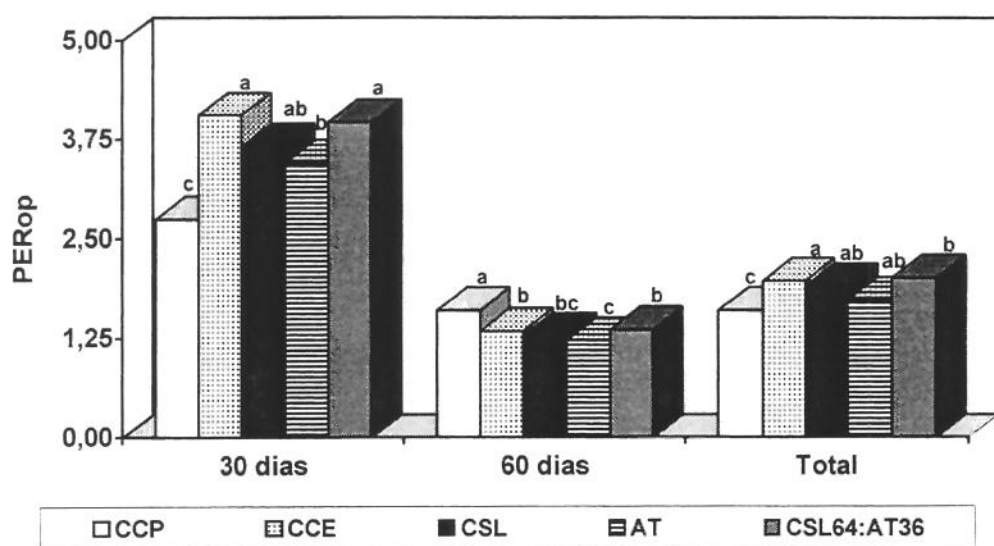


Figura 4: Quociente de eficiência protéica operacional (PERop) de ratos submetidos a períodos de restrição, repleção protéica e período total (restrição + repleção protéica) com diferentes fontes de proteínas.

(*) Valores expressos como média de 10 animais por tratamento, onde: CCP = caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL = concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b,c) Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$) dentro de cada período de tempo.

Os animais do grupo com AT apresentaram um PER inferior aos demais tratamentos. Uma possível explicação para o reduzido valor de PER, apresentado pela dieta padrão (CCP), pode ser observado na Tabela 7 e Figura 5. Observa-se consumo protéico reduzido apresentado pelos tratamentos experimentais, podem ser consequência do reduzido teor protéico dessas dietas.

A Figura 5 apresenta o consumo protéico dos ratos alimentados com diferentes fontes protéicas submetidos à restrição e repleção protéica.



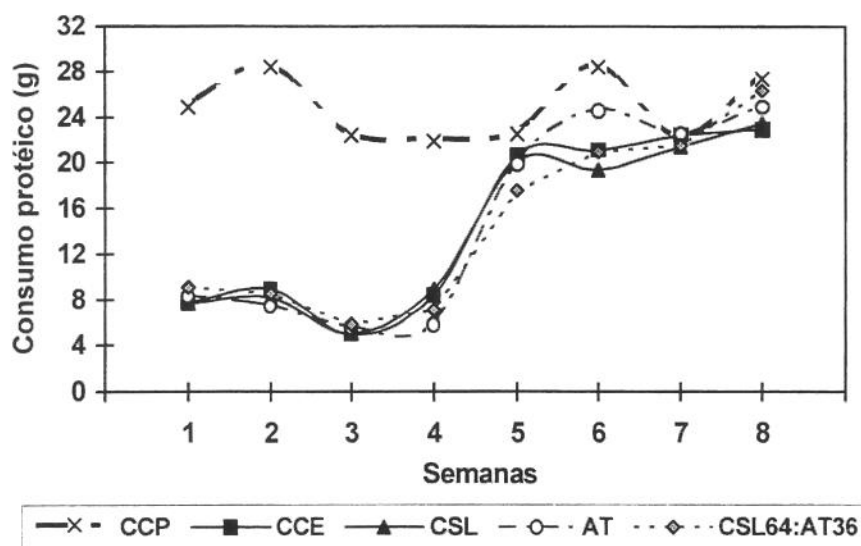


Figura 5: Consumo protéico total de ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas

(*) Valores expressos como média de 10 animais por tratamento, onde: CCP = (caseína Padrão), CCE = (caseína experimental), CSL = (concentrado protéico de soro de leite bovino), AT = (autolisado de levedura) e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

Pode-se notar na Figura 5, que o consumo protéico médio das dietas experimentais nas primeiras quatro semanas (período de restrição) foram aproximadamente de 7,33 g/semana, enquanto que o grupo padrão manteve um consumo protéico de 24,38g/semana, indicando que o consumo do grupo com CCP foi cerca de 3,32 vezes maior que o consumo dos grupos experimentais. O ganho de peso também interferiu nos valores de PER, pois os grupos experimentais obtiveram um ganho de peso durante as quatro primeiras semanas de cerca de 27,71g por semana, enquanto que, o padrão manteve um ganho médio de 50,79g por semana. Portanto o reduzido consumo protéico e reduzido ganho de peso, quando comparado com o grupo padrão (elevado consumo protéico e ganho de peso), foi provavelmente a causa dos valores elevados de PER dos grupos experimentais. Este resultado sugere que durante o período de restrição protéica os grupos experimentais mantiveram uma capacidade de crescimento reduzido quando comparado com o grupo padrão (CCP).

Durante o período de repleção protéica (17%), a dieta padrão (CCP) manteve o melhor consumo e crescimento, entretanto os animais em dietas experimentais

consumindo dietas com 17% de proteína aumentaram seu consumo protéico de 7,33g /semana (restrição) para 21,84 g/semana (repleção), conseqüentemente aumentou-se a absorção e retenção protéica melhorando capacidade de crescimento desses animais.

A Figura 6 mostra as variações no Quociente de eficiência alimentar (QEA) dos vários tratamentos experimentais, para os períodos de 0 a 30 (restrição protéica) e 30 a 60 dias (repleção protéica) e 0 a 60 dias (restrição + repleção protéica).

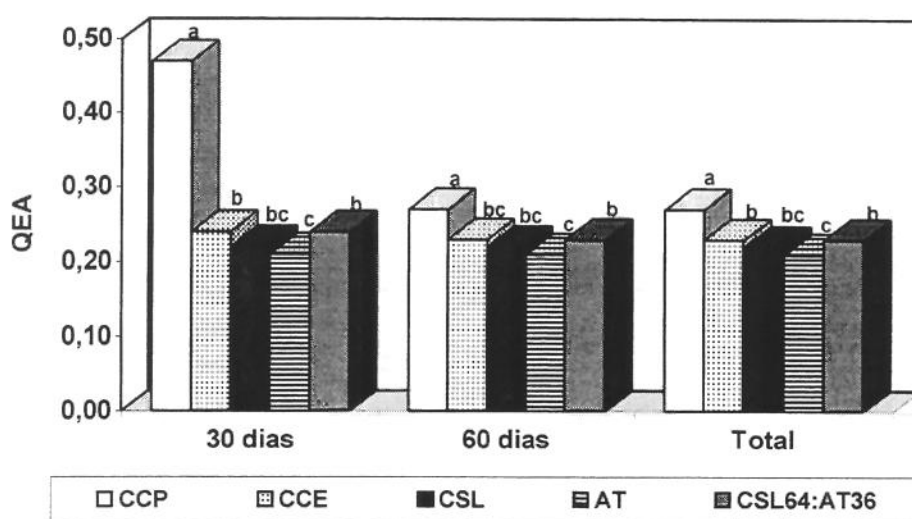


Figura 6: Quociente de eficiência alimentar (QEA) de ratos submetidos a períodos de restrição, repleção protéica e período total (restrição + repleção protéica) com diferentes fontes de proteínas.

(*) Valores expressos como média de 10 animais por tratamento, onde: CCP = caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b,c) Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$) dentro de cada período de tempo.

Quanto aos Quocientes de eficiência alimentar (QEA) observa-se que, no período de restrição (6%), o menor valor de QEA foi apresentado pelos animais da dieta com AT, que não diferiu estatisticamente do tratamento com CSL, porém diferiu estatisticamente dos demais tratamentos experimentais, à nível de 5% de significância. Este menor quociente de eficiência alimentar deve-se à menor ingestão da dieta e conseqüentemente, ao menor ganho de peso apresentado por ambos os grupos conforme já discutido. A dieta padrão (CCP) apresentou resultado superior aos demais e diferiu estatisticamente das demais dietas experimentais. Durante o período de repleção protéica (17%), observamos que não houve diferença estatística entre as

dietas experimentais (CCE, CSL, AT e CSL₆₄:AT₃₆). Apenas a mistura diferiu estatisticamente do AT ao nível de 5% de significância.

O valor de QEA no período total mostra que o grupo padrão (CCP) apresentou resultado superior aos demais, em consequência do maior consumo de dieta e ganho de peso, enquanto o menor resultado foi apresentado pelo AT, que não diferiu estatisticamente da dieta CSL, que apresentaram menor consumo e ganho de peso.

Podemos concluir que o grupo padrão (CCP) apresentou ganho de peso e consumo de dieta superior aos demais tratamentos, entretanto apresentou valor reduzido de PER, provavelmente pelo teor protéico estar acima de 10%. Entre as dietas experimentais, podemos observar que o AT apresentou menor índice de crescimento, devido provavelmente à sua qualidade protéica que é deficiente no aminoácido leucina.

4.3.3. Nitrogênio excretado (NE), nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio absorvido (NA) e digestibilidade aparente da proteína (Da)

Na Tabela 8 encontram-se os valores para nitrogênio excretado (NE), ingerido (NI), nitrogênio absorvido (NA) e digestibilidade aparente da proteína (Da) para ratos alimentados com diferentes fontes protéicas

Na Tabela 8 observamos que durante o período de restrição protéica (6%), a excreção de nitrogênio (NE) foi maior para o grupo de animais da dieta padrão (CCP) e para o grupo com AT, que não diferiram entre si, porém diferiram estatisticamente, dos demais tratamentos ($p \leq 0,05$). Durante o período de repleção protéica (17%) o grupo de animais com AT apresentou a maior excreção de nitrogênio, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) da dieta padrão e dos demais tratamentos experimentais.

O grupo padrão (CCP) apresentou uma maior ingestão (NI) e absorção de nitrogênio (NA), durante o período de restrição protéica (6%), isto se deve ao maior consumo e maior concentração de proteína na dieta. Os grupos experimentais (CCE, CSL, AT e CSL₆₄:AT₃₄), apresentaram reduzidos teores de nitrogênio absorvido, quando comparados ao grupo padrão, sendo que o tratamento com AT apresentou a menor ingestão e absorção de nitrogênio, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos experimentais.

Em relação ao nitrogênio ingerido (NI) no período de repleção protéica (17%), não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre as dietas CCE, CSL e mistura (CSL₆₄:AT₃₄). Somente a dieta com CSL diferiu da dieta padrão (CCP) e do AT, que apresentaram uma maior ingestão de nitrogênio.

Tabela 8: Nitrogênio excretado (NE), nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio absorvido (NA) e digestibilidade aparente da proteína (Da) em ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas.

Tratamento	NE(g)	NI(g)	NA(g)	Da(%)
0 - 30 dias				
CCP	0,14 ± 0,02 ^{a*}	4,58 ± 0,90 ^a	4,44 ± 0,89 ^a	96,94 ± 0,74 ^a
CCE	0,09 ± 0,01 ^b	1,40 ± 0,28 ^b	1,31 ± 0,27 ^b	93,57 ± 1,10 ^b
CSL	0,08 ± 0,01 ^b	1,28 ± 0,34 ^b	1,20 ± 0,34 ^b	93,75 ± 2,46 ^b
AT	0,12 ± 0,02 ^a	1,13 ± 0,27 ^c	1,01 ± 0,27 ^c	89,38 ± 4,10 ^c
CSL ₆₄ :AT ₃₆	0,09 ± 0,01 ^b	1,34 ± 0,18 ^b	1,25 ± 0,28 ^b	93,28 ± 1,10 ^b
30 - 60 dias				
CCP	0,33 ± 0,07 ^b	3,95 ± 0,42 ^a	3,62 ± 0,42 ^a	91,64 ± 1,93 ^a
CCE	0,31 ± 0,04 ^b	3,31 ± 0,55 ^{ab}	3,00 ± 0,55 ^{ab}	90,63 ± 2,24 ^{ab}
CSL	0,35 ± 0,05 ^b	3,03 ± 0,51 ^b	2,70 ± 0,51 ^b	88,44 ± 2,73 ^{ab}
AT	0,66 ± 0,10 ^a	3,92 ± 0,51 ^a	3,26 ± 0,53 ^{ab}	83,16 ± 3,46 ^c
CSL ₆₄ :AT ₃₆	0,40 ± 0,06 ^b	3,35 ± 0,46 ^{ab}	2,95 ± 0,52 ^b	88,05 ± 3,95 ^b

(*) Valores expressos como média (± desvio padrão) de 10 animais por tratamento, onde: CCP = caseína padrão, CCE = caseína experimental, CSL = concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b,c) Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem entre si ($p \leq 0,05$) dentro de cada período de tempo.

Para a digestibilidade aparente da proteína (Da), durante o período de restrição protéica, nota-se que a dieta padrão (CCP), apresentou a maior digestibilidade, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Não ocorreu diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre as dietas experimentais (CCE, CSL e CSL₆₄:AT₃₄), que diferiram somente da dieta padrão (CCP) e do AT, que apresentou a menor digestibilidade ($p \leq 0,05$). No período de repleção (17%) não ocorreu diferença estatística entre o grupo padrão (CCP) e os grupos com CCE e CSL que não diferiram estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). O grupo com AT apresentou menor digestibilidade e diferiu estatisticamente dos demais

tratamentos experimentais ($p \leq 0,05$). O grupo com mistura ($CSL_{64}:AT_{34}$) apresentou resultado intermediário diferindo estatisticamente do AT e dieta padrão (CCP).

Os animais com ingestão de autolisado de levedura (AT) apresentaram a menor digestibilidade, talvez devido a qualidade da proteína do autolisado de levedura que apresenta ligeira deficiência no aminoácido leucina. Entretanto, os valores apresentados pelo autolisado de levedura, neste trabalho, estão em concordância com vários autores, entre eles podemos citar: Vilela et al. (2000), Cabalero-Córdova & Sgarbieri (1997) e Cozzolino (1984) que trabalharam com leveduras, obtendo resultados que variaram de 75 a 92% de digestibilidade.

Talvez a conclusão mais importante que se possa tirar com relação aos índices de crescimento estudados é que, mesmo em dietas de alto valor protéico, na fase mais crítica do crescimento (desmame), não houve a recuperação do peso corporal desses animais experimentais, mesmo quando colocados por igual período de tempo em dieta de recuperação, conforme sugerem os dados nutricionais. Tudo indica que a deficiência no desenvolvimento corpóreo persistirá na idade adulta dos animais.

4.4. Análises bioquímicas do primeiro ensaio biológico - restrição protéica

4.4.1. Análises sorológicas

4.4.1.1. Albumina total, proteína total e relação albumina/globulina (A/G)

Na Tabela 9 encontram-se os níveis séricos de proteína total, albumina total e a relação albumina/globulina dos animais experimentais submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas.

Observa-se que os níveis de proteínas séricas, durante o período de restrição protéica (6%), não apresentaram diferença estatística entre as dietas experimentais: CSL, AT e mistura e a dieta padrão (CCP) ao nível de 5% de significância. A caseína experimental (CCE) apresentou a menor concentração de proteína total, entretanto não diferiu do grupo com mistura ($CSL_{64}:AT_{36}$) e do tempo zero (T0), este último não sofreu processo de restrição protéica. Em relação ao período de repleção protéica (17%), observou-se que não ocorreu diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos experimentais e a dieta padrão (CCP). Esses resultados indicam que, a elevação do teor

de proteína, provavelmente acelerou a disponibilidade dos aminoácidos para a reposição das proteínas séricas. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira et al. (2001).

Tabela 9: Concentração de proteína total (PT), albumina total sérica (ATS) e relação albumina/globulina (A/G) de ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas.

Tratamento	PT g/dL	ATS g/dL	A/G
TO	5,10 ± 0,36 ^{b*}	2,62 ± 0,26 ^c	1,07 ± 0,21 ^b
0 - 30 dias			
CCP	5,81 ± 0,37 ^a	3,26 ± 0,19 ^{ab}	1,30 ± 0,19 ^{ab}
CCE	5,10 ± 0,07 ^b	3,20 ± 0,27 ^b	1,70 ± 0,47 ^a
CSL	5,66 ± 0,40 ^a	3,40 ± 0,20 ^{ab}	1,44 ± 0,18 ^{ab}
AT	5,71 ± 0,34 ^a	3,54 ± 0,10 ^a	1,67 ± 0,28 ^{ab}
CSL ₆₄ :AT ₃₆	5,43 ± 0,27 ^{ab}	3,41 ± 0,20 ^{ab}	1,75 ± 0,39 ^a
30 - 60 dias			
CCP	6,30 ± 0,07 ^a	3,50 ± 0,26 ^{ab}	1,30 ± 0,20 ^b
CCE	6,22 ± 0,13 ^a	3,80 ± 0,28 ^a	1,61 ± 0,35 ^a
CSL	6,02 ± 0,22 ^a	3,70 ± 0,27 ^{ab}	1,60 ± 0,26 ^a
AT	6,21 ± 0,26 ^a	3,46 ± 0,10 ^b	1,30 ± 0,10 ^b
CSL ₆₄ :AT ₃₆	6,22 ± 0,19 ^a	3,64 ± 0,16 ^{ab}	1,42 ± 0,20 ^{ab}

(*) Valores expressos como média (± desvio padrão) de 10 animais por tratamento, onde: CCP = caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b) Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem entre si (p ≤ 0,05) dentro de cada período de tempo.

Na Tabela 9 verificamos que para albumina total, não houve diferença estatística entre a dieta padrão e as dietas com AT, CSL e mistura (CSL₆₄:AT₃₆). Apenas a dieta com CCE apresentou o menor índice de albumina total sérica diferindo estatisticamente do AT. O grupo zero (T0) recém-desmamado não sofreu processo de restrição protéica e apresentou resultado inferior aos tratamentos experimentais ao nível de 5% de significância. No período de repleção protéica (17%), pode-se observar que não houve diferença estatística entre a dieta padrão (CCP) e as dietas experimentais (CCE, CSL, AT e mistura). Somente a dieta com AT que apresentou o menor índice de albumina total diferiu da dieta CCE, porém não diferiu das demais dietas experimentais (p ≥ 0,05).

Estes resultados foram superiores ao apresentado por Qu et al., (1996) trabalhando com ratos machos desnutridos com 2% de caseína, durante 15 dias,

obtendo um valor de albumina sérica de 2,5 g/dL, durante o período de restrição, e um índice de 3,3 g/dl, durante o período de repleção com 20% de caseína.

De acordo com Philbrick & Hill (1974) e Rothschild et al. (1988) o baixo nível de albumina está associado com uma redução na taxa de síntese das células hepáticas, que podem ser influenciadas pela disponibilidade de aminoácidos séricos, especialmente pelo aminoácido triptofano presente na molécula de albumina e os aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina); esses aminoácidos têm a capacidade de acelerar a síntese de albumina. Isto pode ser um fator de proteção apresentado pela dieta com CSL, CCE e mistura (CSL₆₄:AT₃₄); dietas que apresentaram teores de aminoácidos que atendem às especificações da referência padrão da FAO/WHO (1991).

A relação albumina/globulina (A/G) apresentada na Tabela 9 mostra que durante o período de restrição protéica (6%), as dietas experimentais CCE, CSL, AT e mistura (CSL₆₄:AT₃₆) foram semelhantes à dieta padrão e não diferiram estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). No período de repleção protéica (17%), as dietas experimentais: CSL, CCE e mistura (CSL₆₄:AT₃₆) não diferiram estatisticamente entre si, diferiram somente do grupo com caseína padrão (CCP) e do AT que apresentou a menor relação de A/G ao nível de 5% de significância.

Pelos resultados apresentados, notamos que a redução no teor protéico das dietas experimentais não foi suficiente para afetar a capacidade de síntese das proteínas séricas (proteína total, albumina, e globulina) no fígado; provavelmente isto se deve a qualidade protéica das diferentes fontes protéicas estudadas. Este resultado está de acordo com Golden (1982) e Haider & Tarver (1969), que não observaram nenhuma alteração na síntese das proteínas plasmáticas em ratos com restrição protéica (6 a 9%). Talvez a melhor resposta apresentada pelos animais alimentados com autolisado de levedura (AT) durante o período de restrição protéica, imposta neste trabalho, possa ser explicado pelo estudo desenvolvido por López-Navarro et al. (1996), os quais sugerem que as dietas ricas em nucleotídeos contribuem para o "pool" de nucleotídeos no fígado e favorecem os processos bioquímicos que ocorrem neste órgão, como por exemplo, a síntese de RNA e de proteínas plasmáticas, entretanto esse mecanismo de proteção ainda não foi claramente elucidado.

4.4.2 Análises hepáticas

4.4.2.1 Peso do fígado

O peso do fígado (PFig) em base úmida e sua percentagem relativa ao peso corporal (% Fig) encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10: Peso do fígado (PFig) e percentagem do fígado (%Fig) em relação ao peso corporal de ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas.

Tratamentos	0 - 30 dias		30 - 60 dias	
	PFig(g)	%Fig	PFig(g)	%Fig
CCP	7,85 ± 0,92 ^a	3,49 ± 0,21 ^a	10,31 ± 1,64 ^a	2,93 ± 0,27 ^a
CCE	5,35 ± 0,41 ^b	3,48 ± 0,21 ^a	8,70 ± 0,66 ^b	3,04 ± 0,12 ^a
CSL	4,24 ± 0,48 ^c	3,02 ± 0,27 ^b	7,76 ± 0,83 ^b	2,91 ± 0,17 ^a
AT	4,31 ± 0,59 ^c	3,43 ± 0,38 ^a	7,53 ± 0,69 ^b	3,00 ± 0,17 ^a
CSL ₆₄ :AT ₃₆	4,52 ± 0,56 ^c	3,10 ± 0,13 ^b	8,13 ± 0,82 ^b	2,87 ± 0,14 ^a

(*) Valores expressos como média (± desvio padrão) de 10 animais por tratamento, onde: CCP = caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b,c) Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem entre si (p ≤ 0,05) dentro de cada período de tempo.

Nos resultados apresentados na Tabela 10, observa-se que os ratos alimentados com caseína padrão (sem restrição) apresentaram valores superiores aos demais tratamentos. Não houve diferença estatística entre as dietas experimentais com CSL, AT e mistura (CSL₆₄:AT₃₆). O grupo com caseína experimental (CCE) apresentou resultado superior aos demais, diferindo dos tratamentos experimentais e da dieta padrão, provavelmente isto deve ter ocorrido pelo maior ganho de peso conforme observamos na Tabela 7. No período de repleção (17%), observa-se que o peso do fígado (Pfig) e percentagem de fígado (%Fig) das dietas experimentais (CCE, CSL, AT e mistura (CSL₆₄:AT₃₆)) que apresentaram uma recuperação no ganho de peso, conforme observamos na Tabela 7, foram semelhantes; diferiram somente da caseína padrão que apresentaram peso superior aos demais (p ≤ 0,05).

Em relação à percentagem do fígado (%Fig) durante o período de restrição protéica (6%), observa-se que não houve diferença estatística entre os grupos de animais das dietas com CCE e AT e dieta padrão (CCP), porém diferiram estatisticamente da dieta com CSL e mistura (CSL₆₄:AT₃₆) ao nível de 5% de significância. Esses resultados sugerem que os animais dos grupos com ingestão de CCE e AT, apesar de consumirem dietas com teor protéico menor do que o grupo controle (CCP), mantiveram constante a percentagem de crescimento do fígado em relação ao peso corporal. Isto se deve, provavelmente a qualidade protéica da caseína ou talvez a presença dos nucleotídeos no AT que podem ter melhorado a função hepática desses animais ou talvez, porque a restrição protéica não afetou de forma drástica o crescimento do fígado (Walker, 1994). Em relação à percentagem do fígado (%Fig) durante o período de repleção protéica (17%) não houve diferença estatística entre os tratamentos experimentais e a dieta padrão ao nível de 5% de significância.

Podemos concluir que, apesar da elevação no teor de proteína durante o período de repleção protéica (17%), não houve a recuperação no ganho de peso do fígado quando comparado com grupo padrão (CCP), mostrando que a restrição protéica afetou o processo de crescimento celular do fígado; e mesmo com a dieta de recuperação, a deficiência no desenvolvimento do órgão persistiu. Estes resultados são concordantes com os dados encontrados por Oliveira et al. (2001) e Firmansyah et al., (1989).

4.4.2.2. Determinação de RNA, DNA, Proteína total e relações RNA/DNA e PT/DNA

O conteúdo de ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA), proteína total (PT) e a relação RNA/DNA e proteína/DNA (PT/DNA) estão apresentados na Tabela 11.

Nota-se na Tabela 11 que o conteúdo de RNA no grupo T0 apresentou resultado superior aos demais tratamento, provavelmente por não ter sofrido o processo de restrição protéica. Em relação ao período de restrição protéica (6% proteína) observa-se que o conteúdo de RNA dos tratamentos experimentais (AT e CSL₆₄:AT₃₆), não diferiram estatisticamente da caseína padrão (CCP). Somente caseína experimental (CCE) e a dieta CSL diferiram dos demais tratamentos experimentais. Quanto ao período de

repleção protéica (17%), o grupo de animais com ingestão de AT apresentou resultado superior aos demais tratamentos, diferindo estatisticamente ao nível de 5% de significância. O resultado superior apresentado pelo autolisado de levedura (AT), poderá ser explicado pelo seu conteúdo de nucleotídeos. De acordo com os trabalhos desenvolvidos por López-Navarro et al. (1996); López-Navarro et al. (1995) e Ogoshi et al., (1985) e outros pesquisadores, os quais sugerem que dietas com nucleotídeos contribuem para a manutenção do "pool" de nucleotídeos e na manutenção do conteúdo de RNA no fígado.

A maior concentração de DNA presente na Tabela 11 foi apresentada pelos animais no tempo zero (idade entre 21 e 23 dias), que não sofreram nenhum processo de restrição, cuja principal característica, nesta fase de crescimento, é o aumento na divisão celular, em consequência da elevação da síntese de DNA, entretanto a taxa multiplicação celular reduz gradualmente com o passar da idade (maturidade) e tendem a uma estabilidade (Hurley, 1980 ; Winick & Noble, 1965).

Durante o período de restrição protéica (6%), o conteúdo de DNA das dietas experimentais: CCE, CSL, AT e mistura (CSL₆₄AT₃₆) não diferiu estatisticamente entre si, contudo diferiu da dieta padrão (CCP) ao nível de 5% de significância. Quanto ao período de repleção protéica (17%), podemos observar que o grupo de animais em dieta com CSL apresentou resultado superior à dieta padrão e aos demais tratamentos experimentais. Esses resultados sugerem que a qualidade protéica do concentrado protéico de soro de leite influenciou à síntese de DNA. Estes resultados foram inferiores aos apresentados por López-Navarro et al. (1996) e Lourenço (1975) respectivamente (4,45mg/g e 6,4 mg/g), e próximo aos resultados obtidos por Burrin et al.(1988) de 3,25 mg/g DNA.

Para o conteúdo de proteína total (PT) presente na Tabela 11, nota-se que no período de restrição protéica (6%), as dietas contendo CSL, AT e CCP apresentaram resultado superior aos demais, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) da dieta com mistura (CSL₆₄:AT₃₆) e do tempo zero (T0). Em relação ao período de repleção protéica (17%), percebe-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos experimentais e a dieta padrão, indicando provavelmente que a elevação no teor de proteína permitiu a aceleração da capacidade de síntese protéica e da recuperação dos animais. Outro fator a ser observado é que houve uma redução na taxa de síntese protéica, isto provavelmente ocorreu com o aumento da idade dos animais.

Tabela 11: RNA, DNA, Proteína total (PT), relação RNA/DNA e PT/DNA por grama de fígado de ratos submetidos a períodos de restrição e repleção proteica com diferentes fontes de proteínas.

Tratamento	RNA (mg/g)	DNA (mg/g)	PT (mg/g)	RNA/DNA	PT/DNA
T0	10,73 ± 0,54 ^{a*}	4,24 ± 0,41 ^a	581,82 ± 9,06 ^c	2,53 ± 0,02 ^c	137,44 ± 1,90 ^c
0-30 dias					
CCP	7,40 ± 1,00 ^b	2,40 ± 0,35 ^b	930,20 ± 82,55 ^a	3,14 ± 0,62 ^{bc}	387,60 ± 69,43 ^b
CCE	5,12 ± 0,81 ^c	1,45 ± 0,30 ^c	690,15 ± 83,27 ^{bc}	3,53 ± 0,77 ^b	475,96 ± 112,10 ^{ab}
CSL	5,45 ± 0,47 ^c	1,64 ± 0,49 ^c	903,00 ± 161,36 ^a	3,32 ± 0,87 ^b	550,61 ± 205,46 ^a
AT	8,30 ± 1,60 ^b	1,90 ± 0,44 ^c	851,00 ± 159,06 ^{ab}	4,37 ± 0,80 ^b	447,89 ± 142,41 ^{ab}
CSL ₆₄ :AT ₃₆	9,30 ± 0,78 ^b	1,73 ± 0,24 ^c	742,54 ± 120,04 ^b	5,37 ± 0,92 ^a	429,21 ± 81,10 ^a
30-60 dias					
CCP	8,60 ± 0,82 ^b	2,62 ± 0,45 ^c	844,30 ± 70,32 ^a	3,30 ± 0,51 ^{bc}	322,25 ± 70,82 ^{ab}
CCE	8,55 ± 0,84 ^{bc}	2,70 ± 0,41 ^c	894,40 ± 66,99 ^a	3,20 ± 0,57 ^{bc}	331,26 ± 47,90 ^{ab}
CSL	7,50 ± 1,62 ^c	3,20 ± 0,23 ^b	881,34 ± 92,55 ^a	2,34 ± 0,39 ^c	274,42 ± 30,77 ^b
AT	10,40 ± 0,92 ^a	2,25 ± 0,46 ^c	828,00 ± 129,20 ^a	4,62 ± 1,21 ^a	368,00 ± 77,03 ^a
CSL ₆₄ :AT ₃₆	9,00 ± 0,71 ^{bc}	2,55 ± 0,26 ^c	825,55 ± 129,82 ^a	3,53 ± 0,52 ^b	323,74 ± 63,85 ^{ab}

(*) Valores expressos como média (± desvio padrão) de 10 animais por tratamento, onde: CCP = caseína padrão, CCE = caseína experimental, CSL = concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura) e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).
(a,b,c) Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem entre si (p= 0,05) dentro de cada período de tempo.

Para a relação entre RNA/DNA percebe-se que durante o período de restrição protéica (6%), a dieta contendo mistura (CSL₆₄:ATL₃₆) apresentou a maior relação, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) da dieta padrão (CCP) e das demais dietas experimentais. No período de repleção (17%), o grupo de animais com AT apresentou uma relação de RNA/DNA superior, diferindo estatisticamente das demais dietas (CCE, CSL e mistura) e da dieta padrão (CCP).

Quanto à relação PT/DNA, observa-se que no período de restrição protéica (6%), o grupo com CSL apresentou a maior relação, pois apresentou conteúdo de proteína total elevado, indicando um crescimento do fígado por tamanho celular. O CSL não diferiu estatisticamente das demais dietas experimentais, diferindo estatisticamente ($\leq 0,05$) da dieta padrão (CCP) e do tempo zero (T0) que apresentou resultado inferior aos tratamentos experimentais. Durante o período de repleção protéica (17%) a dieta com AT apresentou resultado semelhante aos grupos com CCE, mistura (CSL₆₄:AT₃₄) e caseína padrão, diferindo somente da dieta com CSL.

Através da análise dos resultados apresentados, podemos afirmar que: a dieta com CSL apresentou a maior capacidade de síntese de DNA no período de repleção protéica (17%), provavelmente devido a maior disponibilidade de aminoácidos essenciais, principalmente os aminoácidos sulfurados que influenciam o estado de metilação das moléculas de DNA durante a divisão celular (Fonseca et al., 1999; Heine et al., 1991). De acordo com Winick & Noble (1967), a elevação na síntese de DNA com redução na síntese de RNA, indica que o crescimento celular no fígado ocorreu pelo aumento no número de células, e em menor proporção pelo tamanho celular, resultado este confirmado pelos menores índices apresentados, nas relações entre RNA/DNA e PT/DNA apresentados por este grupo. Comportamento oposto foi observado para o grupo de animais com AT que apresentou a maior capacidade de síntese de RNA e menor síntese de DNA, o qual influenciou as relações RNA/DNA e PT/DNA, indicando que o crescimento celular do fígado ocorreu pelo aumento no tamanho celular. O grupo de animais do tempo zero (T0) com idade de 21 dias, cuja principal característica, nesta fase de crescimento, é o aumento no número de células (hiperplasia) e rápida proliferação celular, apresentou maior síntese de DNA e menor índice nas relações de RNA/DNA e PT/DNA, indicando que o crescimento celular do fígado foi pelo aumento no número de células.

4.4.2.3. Número de núcleos e peso dos hepatócitos (peso/núcleo)

Na Tabela 12 encontram-se as determinações do número de núcleos e peso celular de acordo com os critérios propostos por Enesco & Leblond (1962).

De acordo com Enesco & Leblond (1962), a síntese de DNA hepático é elevada durante a vida fetal; após o nascimento esta atividade de síntese diminui progressivamente até atingir um nível de estabilidade em torno de 95 dias de vida. Os autores dividiram o índice de crescimento em 3 períodos: do nascimento até 17 dias ocorre um rápido crescimento, com acréscimo de células através da rápida proliferação celular e quase nenhuma ou pequena mudança no tamanho celular; no período de 17 a 34-48 dias ocorre uma redução na proliferação celular e elevação no tamanho celular (peso/núcleo); após 48 dias ocorre redução ou cessa a proliferação de novas células e o aumento no tamanho celular vai reduzindo cada vez mais até chegar a um equilíbrio, isto varia de órgão para órgão.

Tabela 12: Determinação de número de núcleos (nº. células em milhões) e peso dos hepatócitos (peso celular em mµg) em fígado de ratos submetidos a períodos de restrição e repleção protéica com diferentes fontes de proteínas.

Trata/to	0 - 30 dias		30 - 60 dias	
	nº. de núcleo (milhões)	peso/núcleo (mµg)	nº. de núcleo (milhões)	peso/núcleo (mµg)
T0	683,87± 6,63 ^{a*}	5,08± 0,42 ^c	683,87± 6,63 ^a	5,08± 0,42 ^c
CCP	329,31± 49,31 ^b	24,23± 3,67 ^b	281,50 ± 48,93 ^c	37,65± 8,49 ^a
CCE	198,63± 41,37 ^c	27,81± 5,07 ^a	289,57± 44,34 ^c	29,25± 9,16 ^b
CSL	225,61± 67,14 ^c	19,93± 4,89 ^b	343,76± 25,09 ^b	22,68± 2,93 ^b
AT	260,68± 60,79 ^c	17,25± 4,12 ^b	242,47± 50,11 ^c	32,11± 5,92 ^{ab}
CSL₆₄:AT₃₆	237,12± 33,76 ^c	19,55± 4,66 ^b	274,41± 28,87 ^c	29,74± 2,61 ^b

(*) Valores expressos como média (± desvio padrão) de 10 animais por tratamento, onde: CCP = caseína padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b,c,d) Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem entre si (p = 0,05) dentro de cada período de tempo.

Observa-se na Tabela 12, que em relação ao número de núcleos (células), os animais do tempo zero (T0) apresentaram resultados superiores às dietas experimentais, provavelmente por não terem sofrido nenhum processo de restrição e por estarem numa faixa etária caracterizada por rápida multiplicação celular.

No período de restrição protéica (6%), a dieta padrão (CCP) apresentou resultado superior para número de núcleos quando comparado com as demais dietas experimentais. Não houve diferença estatística entre as dietas (CCE, CSL, AT e mistura) ao nível de 5% de significância. Este resultado nos permite afirmar que a restrição com 6% de proteína afetou o desenvolvimento celular em todas as dietas experimentais; provavelmente ocorreu uma redução na divisão celular, na síntese e degradação protéica, tendo como consequência, uma redução no número de células. No período de repleção protéica (17%), a dieta com CSL apresentou resultado superior para número de núcleos, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos experimentais ($p \leq 0,05$). Isto ocorre, provavelmente pela qualidade da proteína, o qual permite uma rápida recuperação do organismo, pela maior disponibilidade de aminoácidos e a maior capacidade de síntese protéica, entretanto este fato necessita de maior elucidação (Burrin et al., 1988). A elevação no conteúdo de DNA permite uma elevação no número de divisão celular e um aumento no crescimento celular do fígado.

Quanto ao peso dos hepatócitos (peso/núcleo), no período de restrição protéica (6%), o grupo de animais com CCE apresentou resultado superior às demais dietas, indicando que o aumento no tamanho do tecido foi devido ao aumento no tamanho das células (hipertrofia), pois a divisão celular deste órgão foi afetada pelo baixo conteúdo de DNA, conforme já observamos na Tabela 12. Não houve diferença estatística entre as dietas experimentais CSL, AT e mistura (CSL₆₄:AT₃₆) e a dieta padrão ao nível de 5% de significância. Durante o período de repleção protéica (17%) os resultados sugerem que à dieta padrão (CCP) e o autolisado de levedura (AT) não diferiram estatisticamente entre si. Não houve diferença estatística entre os tratamentos com CCE, CSL e mistura que diferiram somente dos tratamentos com CCP e tempo zero (T0).

Pelos resultados apresentados, podemos afirmar que a restrição protéica ocorrida logo após desmame (período caracterizado por replicação celular ativa)

afetou levemente o crescimento celular do fígado, provocando uma redução do conteúdo de DNA, uma redução na taxa de divisão celular e uma redução no número de células; com isso, o crescimento do fígado foi mais pelo aumento no tamanho celular, confirmando os resultados de Winick & Noble (1965) e Albanes et al. (1990).

Portanto, pelos resultados apresentados podemos sugerir que houve uma redução no tamanho celular e no número de células, as quais não foram totalmente recuperadas através da restauração alimentar, uma vez que o crescimento do fígado dos grupos experimentais, não alcançou o mesmo crescimento do grupo padrão, sugerindo que a deficiência no desenvolvimento do órgão permaneceu apesar da restauração alimentar.

4.5 Avaliação nutricional do segundo ensaio biológico - restrição alimentar

O segundo ensaio biológico refere-se ao modelo de restrição alimentar, com diferentes fontes protéicas, sendo que os animais dos grupos experimentais receberam uma dieta com restrição alimentar de 50% em relação ao grupo de animais alimentados *ad libitum*, tendo como controle o grupo de caseína padrão. O experimento teve duração de 42 dias, sendo dividido em 21 dias de restrição e 21 dias de restauração alimentar. O teor protéico utilizado nas dietas foi de 17% durante todo o ensaio experimental.

4.5.1. Consumo de dieta, consumo de proteína e ganho de peso

A Tabela 13 mostra os valores obtidos para consumo de dieta (CD), consumo de proteína (CP) e ganho de peso (GP), durante os 42 dias de ensaio biológico, divididos em período de restrição, restauração e restrição + restauração alimentar.

Nota-se na Tabela 13, que o consumo de dieta (CD) dos grupos experimentais, durante o período de restrição alimentar (50%), foi em média cerca de 47% do consumo da dieta padrão (CCP). Não houve diferenças estatísticas entre as dietas experimentais CCE, CSL, AT e mistura (CSL₆₄:AT₃₄) que diferiram estatisticamente da dieta padrão (CCP) ao nível de 5% de significância. Durante o período de restauração alimentar (*ad libitum*), observamos que não houve diferença estatística entre o grupo padrão (CCP) e as dietas experimentais. Entretanto, ao observar-se o consumo no período total (restrição + restauração alimentar) durante os quarenta e dois dias do

experimento, nota que o grupo padrão (CCP) ingeriu uma quantidade de dieta superior aos demais tratamentos experimentais, que não diferiram entre si ($p \geq 0,05$).

Tabela 13- Consumo de dieta (CD), consumo de proteína (CP) e ganho de peso (GP) de ratos submetidos a períodos de restrição, restauração alimentar e período total (restrição + restauração) com diferentes fontes protéicas.

Tratamentos	CD(g)	CP(g)	GP (g)
<i>Restrição alimentar (50%)</i>			
0 - 21 dias			
CCP	293,11 $\pm$ 38,74 ^{a*}	49,83 $\pm$ 6,60 ^a	127,74 $\pm$ 11,02 ^a
CCE	162,35 $\pm$ 4,81 ^b	27,60 $\pm$ 0,82 ^b	53,51 $\pm$ 8,86 ^b
CSL	154,80 $\pm$ 10,47 ^b	26,32 $\pm$ 1,80 ^b	47,50 $\pm$ 4,20 ^b
AT	151,14 $\pm$ 3,41 ^b	25,70 $\pm$ 0,58 ^b	48,64 $\pm$ 4,67 ^b
CSL ₆₄ :AT ₃₆	154,84 $\pm$ 7,00 ^b	26,32 $\pm$ 1,18 ^b	52,56 $\pm$ 7,98 ^b
<i>Restauração alimentar (ad libitum)</i>			
21 - 42 dias			
CCP	408,43 $\pm$ 22,10 ^a	69,43 $\pm$ 3,76 ^a	104,76 $\pm$ 7,05 ^c
CCE	428,72 $\pm$ 36,71 ^a	72,88 $\pm$ 6,24 ^a	150,91 $\pm$ 14,95 ^a
CSL	423,30 $\pm$ 15,90 ^a	71,96 $\pm$ 2,70 ^a	140,88 $\pm$ 11,34 ^{ab}
AT	406,26 $\pm$ 22,47 ^a	69,06 $\pm$ 3,82 ^a	131,15 $\pm$ 7,12 ^b
CSL ₆₄ :AT ₃₆	405,04 $\pm$ 22,00 ^a	68,85 $\pm$ 3,74 ^b	140,13 $\pm$ 8,84 ^{ab}
<i>Restrição e Restauração alimentar</i>			
0 - 42 dias			
CCP	701,54 $\pm$ 58,83 ^a	119,26 $\pm$ 10,00 ^a	232,50 $\pm$ 13,91 ^a
CCE	591,07 $\pm$ 35,17 ^b	100,48 $\pm$ 5,95 ^b	204,43 $\pm$ 13,85 ^b
CSL	578,10 $\pm$ 18,79 ^b	98,28 $\pm$ 3,21 ^b	188,37 $\pm$ 10,84 ^{bc}
AT	557,41 $\pm$ 23,60 ^b	94,76 $\pm$ 4,01 ^b	179,79 $\pm$ 9,94 ^c
CSL ₆₄ :AT ₃₆	559,88 $\pm$ 28,83 ^b	94,17 $\pm$ 4,90 ^b	192,70 $\pm$ 7,56 ^{bc}

(*) Valores expressos como média ($\pm$ desvio padrão) de 05 animais por tratamento, onde: CCP = caseína padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b) Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem entre si ($p = 0,05$) dentro de cada período de tempo.

Em relação ao consumo de proteína (CP) apresentada na Tabela 13, observa-se que durante o período de restrição alimentar (50%), os animais das dietas experimentais ingeriram em média 53,2% do consumo do grupo padrão (CCP). Não houve diferença estatística entre as dietas experimentais ($p \geq 0,05$). No período de restauração alimentar

(*ad libitum*) nota-se uma elevação no consumo de dieta e no consumo protéico do grupo de animais experimentais, que não diferiram estatisticamente da dieta padrão (CCP) ao nível de 5% de significância. Observando o consumo protéico no período total, notamos que o grupo padrão (CCP) foi superior aos demais tratamentos que não diferiram estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$).

Na Figura 7, estão representados os valores obtidos para ganho de peso, durante o período de restrição, restauração alimentar e período total (restrição + restauração alimentar).

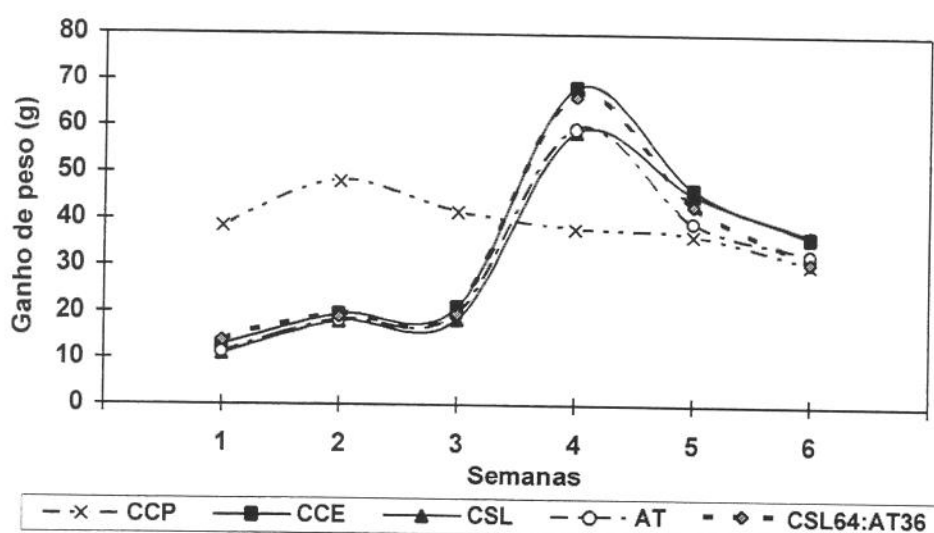


Figura 7: Ganho de peso semanal de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas.

(*) Valores expressos como média de 05 animais por tratamento, onde: CCP= caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

Durante o período de restrição alimentar (50%), a dieta padrão (CCP) apresentou resultado superior aos demais tratamentos, conforme mostra a Tabela 13 e a Figura 7, com um ganho médio nas três primeiras semanas de 42,58g, sendo que o ganho médio dos tratamentos experimentais foi de apenas 16,85g; nota-se que não houve diferença estatística entre eles ao nível de 5% de significância. Quanto ao período da restauração alimentar (*ad libitum*), após a terceira semana com a liberação da dieta *ad libitum*, observa-se um pico de ganho de peso dos grupos experimentais, que obtiveram um ganho de peso médio de 63,22g entre a terceira e quarta semanas; já o grupo experimental manteve um ganho médio de 37,93g semanais. Após esse pico, o ganho de peso do grupo padrão foi de 33,41 g nas duas últimas semanas (5 e 6) e os animais

experimentais mantiveram um ganho médio de 38,78g (5 e 6 semanas). Esses resultados explicam por que o menor ganho de peso apresentado pelo grupo padrão durante o período de restauração alimentar; o grupo padrão não reduziu seu ganho, apenas manteve o ganho médio de peso, o diferencial foi o ganho excessivo de peso apresentado pelos grupos experimentais após a liberação do consumo alimentar, em virtude da restrição alimentar do período anterior.

Em relação a ganho de peso total, observa-se que a dieta padrão (CCP) apresentou o índice de crescimento corporal superior aos demais tratamentos experimentais. Não houve diferenças estatísticas entre as dietas experimentais CCE, CSL e mistura (CSL₆₄:AT₃₆) que diferiram somente da dieta padrão (CCP). O grupo com autolisado de levedura (AT) apresentou o menor ganho de peso e diferiu da caseína padrão (CCP) e da caseína experimental (CCE). Pelos resultados apresentados podemos observar que o consumo de dieta e consumo protéico das dietas experimentais (CCE, CSL, AT e CSL₆₄:AT₃₆) mantiveram o mesmo padrão, diferindo somente do grupo padrão (CCP).

Na Figura 8 encontra-se o crescimento cumulativo dos grupos de animais experimentais submetidos à restrição e restauração alimentar durante o ensaio experimental.

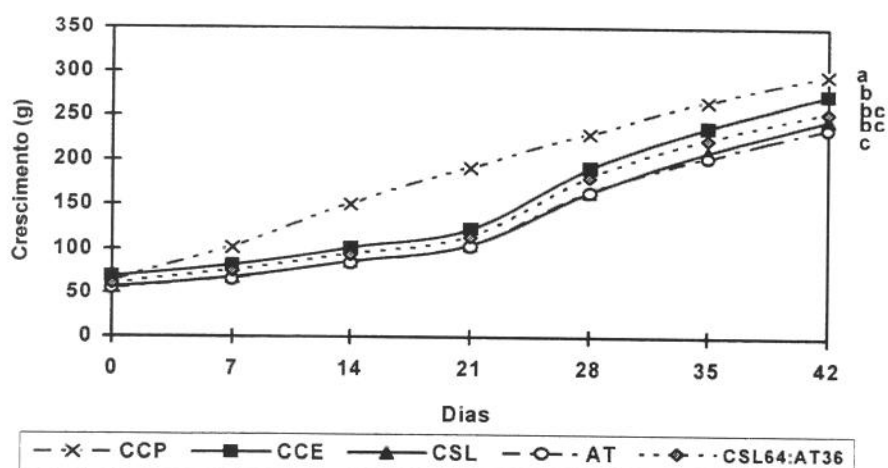


Figura 8: Crescimento total de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas.

(*) Valores expressos como média de 05 animais por tratamento, onde: CCP= caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b,c) Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($p = 0,05$).

Nos resultados obtidos para o crescimento cumulativo podemos observar que, o grupo com autolisado de levedura (AT) apresentou o menor ganho de peso corporal, diferindo dos grupos com ingestão de caseína padrão e experimental, porém não diferiu dos tratamentos com CSL e CSL₆₄:AT₃₆. De acordo com Cardoso, et al., (1991) e Araya et al., (1979); os animais submetidos a restrição alimentar com conteúdo elevado de proteína, podem utilizar a proteína para fins energéticos. A utilização das proteínas para fins energéticos faz com que ocorra uma redução na velocidade do metabolismo basal, devido ao mecanismo adaptativo para conservação de energia. O restabelecimento da ingestão alimentar, aumenta a velocidade de crescimento e a taxa de metabolismo basal. Entretanto, a restauração alimentar não foi suficiente para que o crescimento dos grupos experimentais pudesse alcançar o mesmo apresentado pelo grupo padrão, indicando que a deficiência no desenvolvimento corpóreo continuará persistindo até a vida adulta do animal. Este resultado também confirmou que o grupo com autolisado de levedura (AT) foi o grupo mais susceptível a restrição protéica e restrição alimentar.

4.5.2. Quociente de eficiência protéica operacional (PERop), Quociente de eficiência alimentar (QEA) e Quociente de utilização líquida da proteína (NPR)

Na Figura 9 estão presentes os resultados para PERop, durante o período de restrição e restauração alimentar.

Os resultados para PERop indicam que, durante o período de restrição alimentar (50%), a dieta padrão (CCP) apresentou um valor de PER próximo a 2,5, o qual foi superior aos demais tratamentos. Não houve diferença estatisticamente entre as demais dietas experimentais, que diferiram apenas da dieta padrão ao nível de 5% de significância. Este resultado sugere que a redução alimentar provocou uma redução na ingestão calórica e com isso houve uma redução no crescimento dos animais experimentais. Durante o período de restauração alimentar (*ad libitum*), observa-se que os animais dos grupos experimentais (CCE, CSL, AT e mistura) apresentaram maior ganho de peso e diferiram estatisticamente do grupo padrão ($p \leq 0,05$), que apresentou resultado inferior aos demais tratamentos. Em relação ao PER no período total (restrição + restauração alimentar), nota-se que não houve diferença estatística entre o grupo padrão e as demais dietas experimentais.

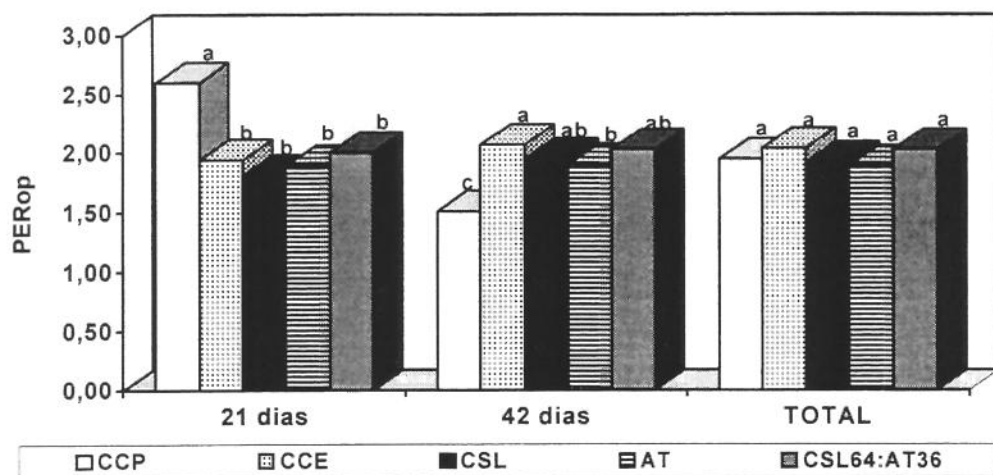


Figura 9: Quociente de eficiência protéica operacional (PERop) de ratos submetidos a períodos de restrição, restauração alimentar e período total (restrição + restauração alimentar) com diferentes fontes de proteínas.

(*) Valores expressos como média de 05 animais por tratamento, onde: CCP = caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL = concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b) Médias seguidas por letras distintas diferem entre si (p= 0,05) dentro de cada período de tempo.

A Figura 10 mostra os resultados para Quociente de utilização líquida da proteína (NPR), durante o período de restrição e restauração alimentar.

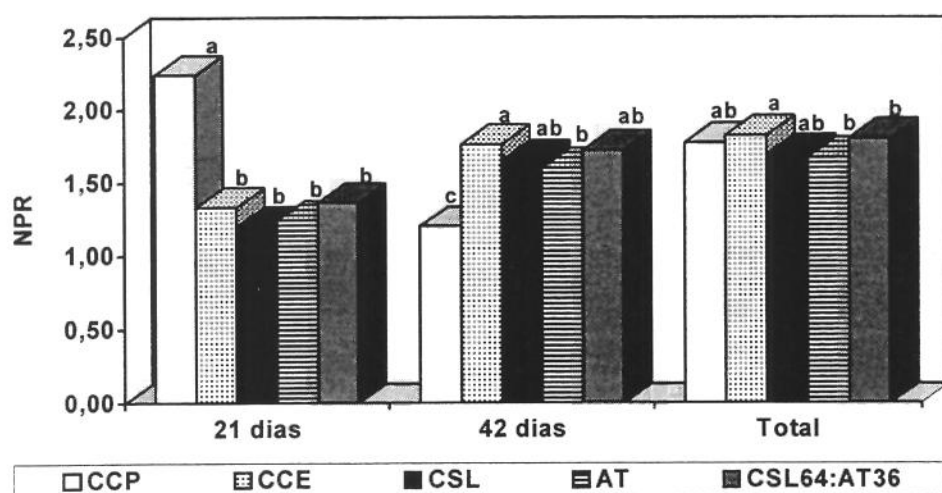


Figura 10: Quociente de utilização líquida da proteína (NPR) de ratos submetidos a períodos de restrição, restauração alimentar e total (restrição + restauração alimentar) diferentes fontes de proteínas.

(*) Valores expressos como média de 05 animais por tratamento, onde: CCP= caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino), AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b) Médias seguidas por letras distintas diferem entre si (p= 0,05) dentro de cada período de tempo.

Em relação à utilização líquida da proteína (NPR) no período de restrição alimentar, a dieta padrão (CCP) apresentou resultados superiores aos demais tratamentos. Não houve diferença estatística entre as dietas CCE, CSL, AT e mistura (CSL₆₄:AT₃₄). No período de restauração alimentar a dieta padrão (CCP) apresentou resultado inferior aos demais tratamentos experimentais, entretanto não houve diferença estatística entre CCE, CSL, mistura; somente o AT diferiu do grupo mantido com CCE. Em relação ao período total, não houve diferença estatística entre a dieta padrão e as dietas com CCE, CSL e mistura. Os animais do grupo tratado com autolisado de levedura (AT) apresentaram menor capacidade de manutenção e crescimento, diferindo estatisticamente da dieta experimental (CCE), porém semelhantes às demais dietas. Isto se deve, provavelmente, à qualidade protéica da dieta.

Na Figura 11, encontram-se os resultados para QEA, durante o período de restrição e restauração alimentar.

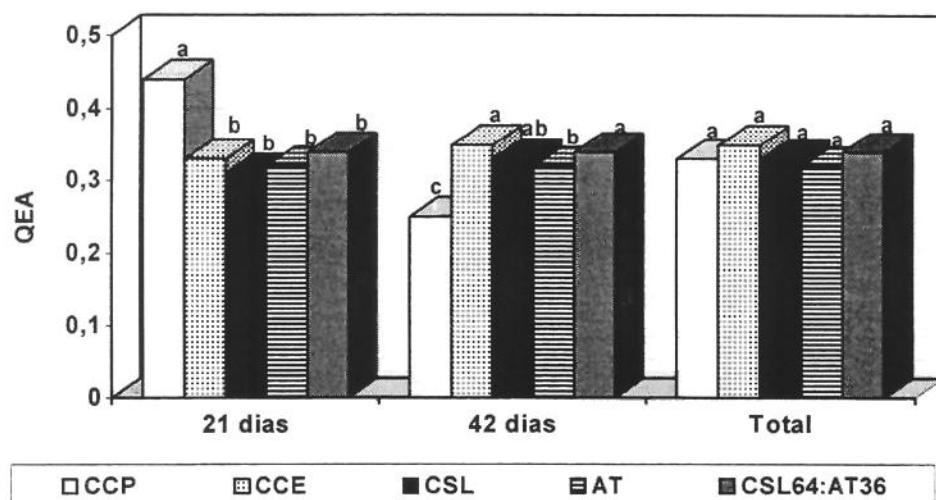


Figura 11: Quociente de eficiência alimentar (QEA) de ratos submetidos a períodos de restrição, restauração alimentar e total (restrição + restauração) com diferentes fontes de proteínas.

(*) Valores expressos como média de 05 animais por tratamento, onde: CCP = caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL = concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b) Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($p=0,05$) dentro de cada período de tempo.

Os valores de QEA sugerem que, durante o período de restrição alimentar, (50%) as dietas experimentais foram semelhantes e diferiram somente da dieta

padrão ($p \leq 0,05$) que apresentou ganho de peso/consumo alimentar superior aos demais tratamentos, conforme mostra a Tabela 13 e a Figura 9.

Observando a Figura 12, notamos que os grupos experimentais apresentaram um consumo médio de 51,93g/semana e o grupo padrão apresentou um consumo médio entre 88,00 a 107,00g/semana, durante as três primeiras semanas do experimento (restrição alimentar).

No período de restauração alimentar observamos que o grupo padrão (CCP) apresentou o menor índice para QEA, quando comparado com os demais tratamentos experimentais. Uma possível explicação para este fato, esta presente na Figura 12, onde podemos notar que, após a liberação alimentar (*ad libitum*), ocorreu um pico no consumo das dietas experimentais (CCE, CSL, AT e mistura), cujo consumo alimentar aumentou em cerca de 3,7 vezes, quando comparado com o consumo alimentar, durante o período de restrição alimentar (50%), enquanto o grupo padrão manteve um aumento em cerca de 1,89 vezes, quando comparado com o período de restrição; portanto o consumo da dieta padrão manteve-se em crescimento normal; o diferencial foi a ingestão excessiva dos grupos experimentais em função da restrição alimentar imposta no período anterior.

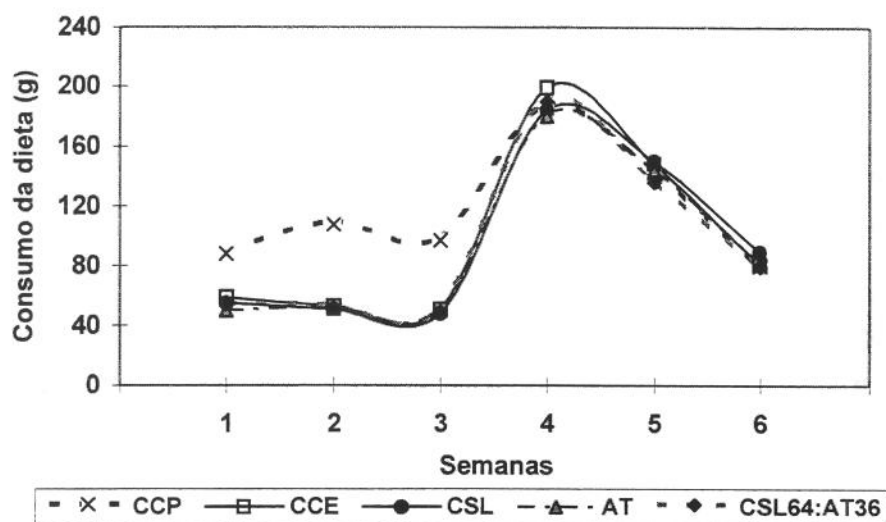


Figura 12: Consumo de dieta de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas.

(*) Valores expressos como média de 05 animais por tratamento, onde: CCP= caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino), AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

Entre as dietas experimentais, podemos observar que a dieta de CCE apresentou resultado superior aos demais e diferiu estatisticamente da dieta padrão e do AT. Em relação ao QEA no período total (restrição + restauração), observamos que não houve diferença estatística entre a dieta padrão e os demais tratamentos experimentais. Analisando os resultados de PER entre os experimentos com restrição protéica e restrição alimentar, podemos concluir que, no primeiro experimento, o conteúdo protéico teve interferência direta sobre os resultados, pois o baixo conteúdo protéico e reduzido ganho de peso provocou uma elevação nos valores de PER dos grupos experimentais; já no experimento com restrição alimentar, o menor ganho de peso reduziu os valores de PER dos grupos experimentais, não ocorrendo interferência do conteúdo protéico, que se manteve a 17% durante todo o ensaio biológico.

4.5.3. Nitrogênio excretado (NE), nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio absorvido (NA) e digestibilidade aparente da proteína (Da)

Na Tabela 14, encontram-se os valores para nitrogênio excretado (NE), nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio absorvido (NA) e digestibilidade aparente da proteína (Da).

Durante o período de restrição alimentar (50%), observa-se que a excreção fecal de nitrogênio (NE) foi maior no grupo de dieta com autolisado de levedura (AT), o qual diferiu estatisticamente da dieta padrão (CCP) e das demais dietas experimentais ($p \leq 0,05$). Não houve diferença estatística entre o grupo CCP e CSL₆₄:AT₃₆ que diferiram dos demais tratamentos a nível de 5% de significância. No período de restauração alimentar (*ad libitum*), o autolisado manteve a maior excreção, diferindo das demais dietas e do padrão (CCP); o mesmo ocorreu com o grupo mantido com a mistura (CSL₆₄:AT₃₆) que apresentou resultado intermediário e diferiu do padrão e das demais dietas experimentais.

Em relação à ingestão de nitrogênio (NI), no período de restrição alimentar (50%) não houve diferença estatística entre as dietas experimentais que diferiram estatisticamente da dieta padrão (CCP). Em relação ao período de restauração (*ad libitum*), a caseína padrão (CCP) não diferiu estatisticamente das demais dietas.

Para a quantidade de nitrogênio absorvido (NA), no período de restrição alimentar (50%), o grupo padrão (CCP) apresentou resultado superior aos demais.

Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre as dietas experimentais que diferiram do padrão. Para o período de restauração alimentar (*ad libitum*) verifica-se que a dieta padrão (CCP) não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos experimentais ao nível de 5% de significância.

Tabela 14: Nitrogênio excretado (NE), nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio absorvido (NA) e digestibilidade aparente da proteína (Da) de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas.

Trata/o	NE(g)	NI(g)	NA(g)	Da (%)
0 - 21 dias				
CCP	0,12 $\pm$ 0,02 ^{b*}	2,91 $\pm$ 0,40 ^a	2,79 $\pm$ 0,40 ^a	95,87 $\pm$ 1,13 ^a
CCE	0,05 $\pm$ 0,001 ^c	1,41 $\pm$ 0,001 ^b	1,36 $\pm$ 0,01 ^b	96,45 $\pm$ 0,55 ^a
CSL	0,05 $\pm$ 0,001 ^c	1,36 $\pm$ 0,02 ^b	1,31 $\pm$ 0,03 ^b	96,33 $\pm$ 0,61 ^a
AT	0,24 $\pm$ 0,04 ^a	1,40 $\pm$ 0,03 ^b	1,16 $\pm$ 0,06 ^b	82,86 $\pm$ 3,05 ^c
CSL ₆₄ :AT ₃₆	0,12 $\pm$ 0,01 ^b	1,41 $\pm$ 0,02 ^b	1,30 $\pm$ 0,06 ^b	91,48 $\pm$ 0,84 ^b
21 - 42 dias				
CCP	0,26 $\pm$ 0,04 ^{c*}	3,81 $\pm$ 0,28 ^a	3,55 $\pm$ 0,24 ^a	93,20 $\pm$ 0,72 ^a
CCE	0,21 $\pm$ 0,03 ^c	3,94 $\pm$ 0,37 ^a	3,73 $\pm$ 0,35 ^a	94,67 $\pm$ 0,62 ^a
CSL	0,20 $\pm$ 0,01 ^c	4,00 $\pm$ 0,37 ^a	3,80 $\pm$ 0,37 ^a	95,00 $\pm$ 0,46 ^a
AT	0,75 $\pm$ 0,08 ^a	3,92 $\pm$ 0,56 ^a	3,20 $\pm$ 0,64 ^a	80,86 $\pm$ 3,93 ^c
CSL ₆₄ :AT ₃₆	0,38 $\pm$ 0,02 ^b	3,70 $\pm$ 0,34 ^a	3,32 $\pm$ 0,35 ^a	89,73 $\pm$ 1,24 ^b

(*) Valores expressos como média ($\pm$ desvio padrão) de 05 animais por tratamento, onde: CCP = caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b,c) Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem entre si ($p= 0,05$) dentro de cada período de tempo.

Os índices de digestibilidade aparente da proteína (Da) apresentados na Tabela 14, mostram que a dieta com AT apresentou resultado inferior às demais dietas, durante o período de restrição e restauração alimentar. Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre as dietas CCP, CCE e CSL, que diferiram dos tratamentos com AT e da mistura (CSL₆₄:AT₃₆).

Os resultados mostram que, apesar da restrição alimentar, o balanço nitrogenado manteve-se positivo, indicando que o fornecimento de energia, de aminoácidos e de nitrogênio total foi suficiente para a manutenção do peso corporal e para as taxas de síntese e degradação protéica; isto também foi condicionado pela

qualidade de proteína oferecida pelas dietas. Durante o período de restrição alimentar, provavelmente, os grupos experimentais adaptaram o organismo ao baixo consumo energético, porém com o período de restauração houve a liberação alimentar e a recuperação parcial dos grupos experimentais conforme já discutido. Resultados semelhantes foram encontrados por Harris (1980).

Em relação ao grupo com autolisado de levedura (AT), este apresentou menor capacidade de manutenção e crescimento, fato semelhante ao que ocorreu com o mesmo grupo experimental, durante o período de depleção protéica, isto provavelmente ocorreu em função da qualidade protéica inferior que pode ter interferido no crescimento.

4.6. Análises bioquímicas do segundo ensaio - restrição alimentar

4.6.1. Análises sorológicas

4.6.1.1. Proteína total, albumina total sérica e relação A/G

Na Tabela 15, encontram-se os valores obtidos para proteína total, albumina total sérica e relação A/G.

Durante o período de restrição alimentar (50%), observa-se que o nível de proteína total para o tratamento com AT foi semelhante à caseína padrão (CCP), que apresentou resultado superior aos demais tratamentos. Não houve diferenças estatísticas ($p \geq 0,05$) entre as dietas experimentais CCE, CSL, AT, (CSL₆₄:AT₃₆), e o grupo do tempo zero (T0) que não sofreu processo de restrição alimentar. Para o período de restauração alimentar (*ad libitum*), nota-se que não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre as dietas experimentais e o padrão (CCP), que diferiram somente do tempo zero (T0). Esses resultados sugerem que todas as proteínas experimentais apresentaram boa capacidade de recuperação. Este resultado está de acordo com Carughi et al. (1989).

No período de restrição alimentar (50%), observa-se na Tabela 15, que o nível de albumina sérica dos grupos experimentais: CCE, CSL e AT foram semelhantes e não diferiram estatisticamente ($p \geq 0,05$) do grupo padrão (CCP) e do tempo zero

(T0). A exceção foi o grupo de animais com mistura (CSL₆₄:AT₃₆) que apresentou resultado inferior aos demais tratamentos, porém foi semelhante ao tratamento com AT. Durante o período de restauração alimentar (*ad libitum*), não houve diferença estatística entre o grupo padrão (CCP), grupo do tempo zero (T0) e as dietas experimentais ao nível de 5% de significância.

Tabela 15: Concentração de proteína total (PT), albumina total sérica (ATS) e relação albumina/globulina (A/G) de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas.

Tratamento	PT g/dL	ATS g/dL	A/G
TO	5,17 ± 0,11 ^{b*}	3,61 ± 0,17 ^a	2,43 ± 0,61 ^a
0 - 30 dias			
CCP	6,03 ± 0,37 ^a	3,75 ± 0,17 ^a	1,71 ± 0,41 ^{ab}
CCE	5,40 ± 0,34 ^b	3,51 ± 0,18 ^a	1,94 ± 0,45 ^{ab}
CSL	5,21 ± 0,17 ^b	3,53 ± 0,20 ^a	2,15 ± 0,37 ^a
AT	5,56 ± 0,20 ^{ab}	3,41 ± 0,07 ^{ab}	1,60 ± 0,21 ^{ab}
CSL ₆₄ :AT ₃₆	5,47 ± 0,30 ^b	3,10 ± 0,22 ^b	1,32 ± 0,22 ^b
30 - 60 dias			
CCP	6,00 ± 0,19 ^a	3,91 ± 0,18 ^a	1,93 ± 0,40 ^{ab}
CCE	6,17 ± 0,39 ^a	4,16 ± 0,29 ^a	2,10 ± 0,24 ^{ab}
CSL	6,43 ± 0,58 ^a	3,80 ± 0,16 ^a	1,44 ± 0,30 ^b
AT	6,50 ± 0,58 ^a	4,04 ± 0,54 ^a	1,73 ± 0,53 ^{ab}
CSL ₆₄ :AT ₃₆	6,00 ± 0,13 ^a	3,90 ± 0,43 ^a	1,90 ± 0,55 ^{ab}

(*) Valores expressos como média (± desvio padrão) de 05 animais por tratamento, onde: CCP = caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b) Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem entre si (p= 0,05) dentro de cada período de tempo.

Para a relação A/G no período de restrição (50%), o grupo com mistura (CSL₆₄:AT₃₆) apresentou uma relação inferior e diferiu estatisticamente ($p \leq 0,05$) dos grupos com CSL e tempo zero (T0) que apresentaram a melhor relação; entretanto a mistura não diferiu do grupo padrão (CCP) e dos demais tratamentos experimentais (CCE e AT). No período de restauração alimentar (*ad libitum*), não houve diferença estatística entre a dieta padrão (CCP) e os demais tratamentos experimentais,

somente a dieta com CSL apresentou a menor relação que diferiu apenas do grupo do tempo zero (T0) ao nível de 5% de significância.

Os dados reportados indicam que, em relação à proteína total sérica, não houve diferença entre as dietas experimentais, sugerindo que somente a restrição alimentar (50% de restrição) não afeta a capacidade de síntese das proteínas séricas, isto porque os teores de proteínas destas dietas mantiveram-se relativamente elevados. Em relação à albumina total e à relação A/G, somente o grupo de animais alimentados com a mistura (CSL₆₄:AT₃₆) apresentou uma redução de síntese, entretanto durante o período de restauração alimentar, houve a recuperação na capacidade de síntese para todos os grupos estudados. Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Smith & Lunn (1984), Haider & Tarver (1969) indicando que a restrição alimentar não associada a deficiência protéica drástica mantém normalizada a taxa de síntese das proteínas plasmáticas.

Pelos resultados apresentados durante o período de restrição protéica (6%) e restrição alimentar (50%), podemos concluir que os processos de restrição utilizados neste estudo, não foram suficientes para afetar a capacidade dos hepatócitos em sintetizar as proteínas séricas. Podemos também concluir que o período de repleção protéica e restauração alimentar foi eficiente em recuperar os grupos experimentais estudados.

4.6.2 Análises hepáticas

4.6.2.1 Peso do fígado

O peso do fígado (Pfig) e o peso do fígado expresso como percentagem do peso corporal (%Fig) encontra-se na Tabela 16.

Na Tabela 16 observamos que durante à restrição alimentar (50%), o peso do fígado (PFig) da dieta padrão (CCP) apresentou resultado superior aos demais, diferindo estatisticamente ao nível de 5% de significância. Entre as dietas experimentais os animais alimentados com AT apresentaram resultado inferior aos tratamentos com CCE, CSL e CCP, sendo semelhantes apenas ao grupo da mistura (CSL₆₄:AT₃₆). Quanto ao período de restauração alimentar (*ad libitum*), nota-se que o

houve um crescimento do fígado, não ocorrendo diferença estatística entre as dietas experimentais e a dieta padrão ($p \geq 0,05$).

Tabela 16: Peso do fígado (PFig) e percentagem do fígado (%Fig) em relação ao peso corporal de ratos submetidos a períodos de restrição alimentar e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas.

Tratamentos	0 - 21 dias		21 a 42 dias	
	PFig(g)	%Fig	PFig(g)	%Fig
CCP	$6,65 \pm 0,29^{a*}$	$3,34 \pm 0,12^c$	$8,60 \pm 0,98^a$	$2,84 \pm 0,04^b$
CCE	$4,35 \pm 0,50^b$	$3,91 \pm 0,29^b$	$8,34 \pm 0,99^a$	$3,05 \pm 0,18^{ab}$
CSL	$4,79 \pm 0,29^b$	$4,35 \pm 0,25^a$	$8,20 \pm 0,64^a$	$3,32 \pm 0,14^a$
AT	$3,82 \pm 0,41^c$	$3,40 \pm 0,15^c$	$7,74 \pm 0,49^a$	$3,29 \pm 0,11^a$
CSL ₆₄ :AT ₃₆	$3,93 \pm 0,36^{bc}$	$3,54 \pm 0,20^{bc}$	$7,91 \pm 0,68^a$	$3,12 \pm 0,21^{ab}$

(*) Valores expressos como média ($\pm$ desvio padrão) de 05 animais por tratamento, onde: CCP = caseína Padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b,c) Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem entre si ($p= 0,05$) dentro de cada período de tempo.

Em relação a percentagem do fígado (%Fig) no período de restrição alimentar (50%), observamos que a dieta com CSL apresentou resultado superior aos demais tratamentos. Não houve diferença estatística entre a caseína padrão (CCP) e os tratamentos com AT e mistura. Esses resultados sugerem que o grupo com ingestão de CSL mantiveram a percentagem de crescimento do fígado elevado, provavelmente devido a sua qualidade protéica, uma vez que o seu ganho de peso conforme mostra a Tabela 13 foi semelhante aos demais tratamentos experimentais. Quanto ao período de restauração (*ad libitum*), a dieta padrão (CCP) apresentou a menor percentagem do fígado, indicando a estabelecida no crescimento do fígado e no ganho de peso desses animais neste período. Entre as dietas experimentais não houve diferença estatística entre elas.

Os resultados sugerem que o grupo de animais com ingestão de autolisado de levedura (AT) apresentou menor desenvolvimento do fígado durante a restrição alimentar; provavelmente isto ocorreu em resposta à redução no ganho de peso e devido a menor qualidade protéica da dieta.

4.6.2.2. Determinação de RNA, DNA, Proteína total e relações RNA/DNA e PT/DNA

Verifica-se na Tabela 17, que durante o período de restrição alimentar (50%), o conteúdo de RNA no fígado dos grupos com CSL, AT e mistura (CSL₆₄:AT₃₆) foram semelhantes e não diferiram estatisticamente da dieta padrão (CCP). A dieta com CCE diferiu do padrão (CCP) e da mistura, porém não diferiu do grupo do tempo zero (T0) ao nível de 5% de significância. Durante o período de restauração alimentar (*ad libitum*), o grupo com ingestão de AT apresentou o maior conteúdo de RNA e não diferiu dos tratamentos com CSL e mistura (CSL₆₄:AT₃₆), contudo diferiu da dieta padrão (CCP), dos tratamentos com CCE e T0 que apresentaram o menor conteúdo de RNA.

Em relação ao conteúdo de DNA, durante o período de restrição alimentar (50%) a dieta com AT apresentou resultado inferior e diferiu estatisticamente dos grupos (CCP), tempo zero e dos demais grupos experimentais. Durante o período de restauração alimentar (*ad libitum*), nota-se uma elevação na síntese de DNA, não ocorrendo diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre a dieta padrão (CCP), o tempo zero (T0) e as demais dietas experimentais, sugerindo que a restauração alimentar normalizou a capacidade de síntese de DNA e a multiplicação celular.

Quanto ao teor de proteína total (PT) nos hepatócitos, observamos que não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os grupos padrão (CCP), zero (T0) e experimentais que apresentaram resultados semelhantes durante o período de restrição (50%) e restauração alimentar (*ad libitum*). Esses resultados indicam que a restrição alimentar realizada após o desmame não comprometeu drasticamente os constituintes celulares (DNA, RNA e proteína total), talvez porque ela não tenha ocorrido durante o período mais intenso de divisão celular (10 dias antes do nascimento até 17 dias após o nascimento). Os resultados também indicam que somente o AT apresentou menor conteúdo de DNA, entretanto manteve os mesmos resultados para RNA e proteína total dos demais tratamentos experimentais.

Tabela 17: RNA, DNA, e Proteína total (PT), relação RNA/DNA e PT/DNA por grama de fígado de ratos submetidos a períodos de restrição e recuperação alimentar com diferentes fontes de proteínas.

Trata/to	RNA (mg/g)	DNA (mg/g)	PT (mg/g)	RNA/DNA	PT/DNA
TO	8,60 ± 1,13 ^{b*}	4,25 ± 0,25 ^a	711,12 ± 107,82 ^a	2,02 ± 0,34 ^b	167,32 ± 30,48 ^b
0-21 dias					
CCP	12,42 ± 1,26 ^a	4,50 ± 0,61 ^a	625,50 ± 29,40 ^a	2,76 ± 0,48 ^b	139,00 ± 14,10 ^b
CCE	8,30 ± 0,72 ^b	4,00 ± 0,39 ^a	622,00 ± 110,81 ^a	2,10 ± 0,15 ^b	155,50 ± 17,84 ^b
CSL	9,80 ± 1,48 ^{ab}	4,10 ± 0,55 ^a	577,00 ± 93,39 ^a	2,40 ± 0,32 ^b	140,73 ± 37,98 ^b
AT	11,00 ± 1,54 ^{ab}	2,60 ± 0,72 ^b	680,44 ± 26,06 ^a	4,23 ± 1,68 ^a	261,70 ± 85,54 ^a
CSL ₆₄ :AT ₃₆	11,06 ± 1,16 ^a	3,80 ± 0,53 ^a	670,11 ± 37,39 ^a	2,91 ± 0,55 ^b	176,34 ± 25,00 ^b
21- 42 dias					
CCP	8,13 ± 1,25 ^b	3,60 ± 0,41 ^a	717,50 ± 9,21 ^a	2,26 ± 0,31 ^{ab}	199,30 ± 24,75 ^a
CCE	8,00 ± 1,03 ^b	4,24 ± 0,67 ^a	687,05 ± 66,75 ^a	1,90 ± 0,29 ^b	162,04 ± 23,76 ^a
CSL	9,60 ± 0,77 ^{ab}	4,24 ± 0,83 ^a	634,65 ± 113,42 ^a	2,26 ± 0,56 ^{ab}	149,70 ± 32,03 ^a
AT	10,06 ± 0,62 ^a	3,90 ± 0,29 ^a	707,00 ± 49,40 ^a	2,60 ± 0,12 ^a	181,28 ± 20,53 ^a
CSL ₆₄ :AT ₃₆	8,60 ± 0,29 ^{ab}	3,96 ± 0,48 ^a	712,31 ± 52,85 ^a	2,17 ± 0,21 ^{ab}	179,87 ± 34,60 ^a

(*) Valores expressos como média (± desvio padrão) de 05 animais por tratamento, onde: CCP = caseína padrão, CCE = caseína experimental, CSL = concentrado protéico de soro de leite bovino, AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).
(a,b,c) Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem entre si (p ≤ 0,05) dentro de cada período de tempo.

Quanto à relação RNA/DNA (Tabela 17), nota-se que no período de restrição alimentar (50%), o grupo com dieta de AT apresentou resultado superior, diferindo estatisticamente do grupo padrão (CCP) e dos demais tratamentos experimentais ao nível de 5% de significância. No período de restauração alimentar (*ad libitum*), o grupo de animais alimentados com autolisado de levedura (AT) continuou apresentando uma relação de RNA/DNA superior, diferindo somente do grupo com CCE que apresentou a menor relação.

Em relação a PT/DNA no período de restrição alimentar (50%), pode-se observar que o grupo com AT apresentou resultado superior, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) da caseína padrão (CCP), do tempo zero (T0) e dos demais tratamentos experimentais. No período de restauração alimentar (*ad libitum*), observamos que todos os tratamentos apresentaram relação PT/DNA semelhante, não ocorrendo diferença estatística entre eles, que diferiram somente do tempo zero (T0) ao nível de 5% de significância. Os resultados apresentados estão de acordo com os trabalhos de Carrillo et al., (1996) e Goodman & Ruderman, (1980)

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que, o autolisado de levedura (AT) apresentou a menor capacidade de crescimento por hiperplasia (número de células), talvez pela menor capacidade de divisão celular e síntese de DNA. O menor conteúdo de DNA, e o aumento na síntese protéica indica que o crescimento do fígado, no AT, foi mais por aumento no tamanho celular (hiperplasia), conforme indica os resultados da relação RNA/DNA. Resultados semelhantes foram encontrados com o mesmo grupo (AT), durante o modelo de restrição protéica, significando que a qualidade protéica do autolisado, poderá estar reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos e provavelmente interferindo no processo de divisão celular e na síntese de DNA no fígado, (Lourenço, 1975 ; Morgan & Peters, 1971).

4.6.2.3. Número de núcleos e peso dos hepatócitos (peso/núcleo)

Na Tabela 18, encontra-se o cálculo para número de núcleos e peso por núcleo, segundo os critérios de Enesco & Leblond (1962).

Durante o período de restrição alimentar (50%), nota-se que os animais do grupo com AT apresentaram menor número de células, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos experimentais; isto ocorreu pela baixa qualidade protéica do AT

que interfere, provavelmente com a velocidade de divisão celular e com a síntese de DNA, conforme podemos observar na Tabela 17. As dietas de CSL, CCE e mistura foram semelhantes entre si e não diferiram do grupo padrão (CCP) e do grupo zero (T0) ao nível de 5% de significância. Este resultado indicam que a qualidade protéica dessas dietas possibilitaram uma maior divisão celular e síntese de DNA consequentemente uma multiplicação celular.

Durante o período de restauração alimentar (*ad libitum*), com a restauração da ingestão calórica, ocorreu provavelmente uma normalização na velocidade de divisão celular e na síntese de DNA, com isso observa-se que não houve diferença estatística entre as dietas experimentais e a dieta padrão (CCP) ao nível de 5% de significância. Outro fator a ser considerado também é que no período de restauração alimentar ocorreu uma redução no processo de hiperplasia (aumento no número de células), entretanto houve um aumento no processo de hipertrofia (aumento no tamanho celular) em consequência da maturidade dos animais. O grupo (T0) que não sofreu processo de restrição alimentar apresentou resultado superior para número de núcleos e diferiu dos demais tratamentos experimentais.

Tabela 18: Determinação de número de núcleos (número células em milhões) e peso dos hepatócitos (peso celular em μg) em fígado de ratos submetidos a períodos de restrição e restauração alimentar com diferentes fontes de proteínas.

Trata/to	0 - 21 dias		21 - 42 dias	
	nº. de núcleo (milhões)	peso/núcleo (μg)	nº. de núcleo (milhões)	peso/núcleo (μg)
T0	685,80 $\pm$ 41,11 ^{a*}	3,72 $\pm$ 0,52 ^c	685,80 $\pm$ 41,11 ^a	3,72 $\pm$ 0,52 ^b
CCP	612,33 $\pm$ 83,58 ^{ab}	11,01 $\pm$ 1,43 ^a	385,81 $\pm$ 45,12 ^b	21,91 $\pm$ 1,54 ^a
CCE	550,68 $\pm$ 53,76 ^{ab}	8,16 $\pm$ 1,21 ^b	456,13 $\pm$ 72,30 ^b	18,73 $\pm$ 4,33 ^a
CSL	556,98 $\pm$ 75,60 ^{ab}	8,74 $\pm$ 1,37 ^{ab}	455,70 $\pm$ 89,53 ^b	18,55 $\pm$ 4,14 ^a
AT	353,15 $\pm$ 99,34 ^c	11,40 $\pm$ 2,78 ^a	416,77 $\pm$ 31,74 ^b	18,67 $\pm$ 1,92 ^a
CSL₆₄:AT₃₆	516,98 $\pm$ 72,27 ^b	7,66 $\pm$ 0,89 ^b	425,60 $\pm$ 52,53 ^b	18,40 $\pm$ 3,54 ^a

(*) Valores expressos como média ($\pm$ desvio padrão) de 05 animais por tratamento, onde: CCP = caseína padrão, CCE = caseína experimental, CSL= concentrado protéico de soro de leite bovino , AT = autolisado de levedura e mistura = (CSL₆₄:AT₃₆).

(a,b,c) Médias seguidas por letras distintas diferem entre si (p= 0,05) dentro de cada período de tempo.

Em relação ao peso/núcleo (tamanho celular) no período de restrição alimentar (50%), a dieta com AT não diferiu estatisticamente da dieta padrão (CCP) e do CSL, porém diferiu das demais dietas experimentais. No período de restauração alimentar (*ad libitum*), não ocorreu diferença entre as dietas experimentais e a dieta padrão (CCP). A diferença entre estas dietas é que a caseína padrão reduziu seu crescimento por hiperplasia e aumentou o crescimento por hipertrofia, isto normalmente ocorre à medida que o animal envelhece.

O grupo de animais do tempo zero (T0) mostrou resultado superior em relação ao número de núcleos, quando comparado com as demais dietas; isto ocorreu, porque este grupo não sofreu nenhum processo de restrição alimentar e também por estarem num período de crescimento celular ativo, cuja principal característica é o crescimento por hiperplasia celular (número de células).

Através dos resultados apresentados, pode-se notar que, o grupo de animais alimentado com AT foi o mais afetado pela restrição alimentar, provavelmente, devido à qualidade protéica que interferiu com a velocidade da divisão celular e com a síntese de DNA, conseqüentemente houve uma redução no crescimento por hiperplasia celular (número de células) e um aumento por hipertrofia celular (tamanho da célula), entretanto durante o período de restauração alimentar cresceu por hipertrofia e hiperplasia alimentar. As demais dietas experimentais por apresentarem boas qualidades protéicas sofreram menores interferências no processo de divisão celular e síntese de DNA, cresceram por hiperplasia durante o período de repleção alimentar e por hiperplasia + hipertrofia durante o período de restauração alimentar. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a boa qualidade protéica do concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL) e da caseína, entretanto uma boa surpresa foi a qualidade protéica mostrada pela mistura (CSL₆₄:AT₃₄) que apresentou resultados semelhantes à caseína experimental (CCE), mostrando ser uma proteína efetiva contra a restrição protéica e restrição alimentar, uma vez que, ela apresenta comportamento sinérgico entre as proteínas do concentrado protéico de soro de leite bovino e da levedura.

5. CONCLUSÕES

Do presente estudo resultaram as seguintes conclusões:

1. A análise centesimal dos ingredientes evidenciou que, o concentrado protéico de soro de leite bovino (CSL) e a caseína comercial (CC) são excelentes fontes de proteína, e que o autolisado de levedura (AT) apresentou bons teores de fibras totais, cinzas e carboidratos em relação aos demais tratamentos experimentais;
2. Os teores de aminoácidos dos concentrados protéicos mostraram-se adequados, quando comparados ao padrão teórico da FAO/WHO, exceto o autolisado de levedura, que mostrou ligeira deficiência no aminoácido leucina, apresentando um escore de aminoácidos essenciais (EAE) de 91%;
3. *No modelo de restrição seguida de repleção protéica concluiu-se que:*
 - em relação aos índices de desenvolvimento corporal e nutricional (ganho de peso, QEA, PER e digestibilidade) o grupo de animais alimentados com autolisado de levedura (AT) foi o mais afetado pela restrição protéica;
 - quanto aos índices bioquímicos (proteína total, albumina e relação albumina/globulina), nenhuma alteração na síntese protéica foi observada, durante o período de restrição protéica nos tratamentos estudados;
 - para os índices de desenvolvimento celular do fígado (RNA, DNA, proteína total, peso dos hepatócitos e número de núcleos), durante o período de restrição protéica, a dieta contendo concentrado protéico de soro de leite (CSL) apresentou maior conteúdo de DNA e melhor capacidade de recuperação e desenvolvimento celular do fígado, através do aumento no número de células (hiperplasia) e o autolisado de levedura (AT) o melhor conteúdo de RNA, indicando que o desenvolvimento celular do fígado ocorreu devido ao tamanho celular (hipertrofia celular).

4. *No modelo de restrição e restauração alimentar concluiu-se que:*

- quanto aos índices de desenvolvimento corporal e nutricional (ganho de peso, QEA, PER e digestibilidade), durante período de restrição, as dietas contendo caseína experimental (CCE), CSL e mistura (CSL₆₄:AT₃₆) proporcionaram maior crescimento e o grupo de AT, os menores índices nutricionais (PER, NPR, QEA e Da);
- em relação aos índices bioquímicos (proteína total, albumina e relação albumina/globulina) não houve diferença estatística entre as dietas experimentais, mostrando que somente restrição alimentar (50% de restrição) não afetou a capacidade de síntese das proteínas séricas;
- para os índices de desenvolvimento celular do fígado (RNA, DNA, proteína total, peso dos hepatócitos e número de núcleos), durante o período de restrição alimentar, o autolisado de levedura (AT) apresentou a menor capacidade de síntese de DNA e a maior capacidade de síntese de RNA, indicando que o desenvolvimento celular ocorreu devido ao tamanho celular. Não houve diferença estatística entre os demais tratamentos experimentais;

5. Nos dois modelos concluiu-se que: o grupo de animais consumindo o autolisado de levedura, diferiu estatisticamente dos demais tratamentos e foi o mais afetado pelos modelos de restrição estudados, apresentando os menores índices de desenvolvimento corporal e nutricional. Contudo, o AT apresentou o maior conteúdo de RNA, indicando que o desenvolvimento celular do fígado desses animais ocorreu, principalmente, por hipertrofia celular. As dietas contendo caseína experimental (CCE), concentrado protéico de soro de leite (CSL) e mistura apresentaram comportamento semelhante para crescimento corporal, síntese de DNA, RNA e proteína total; houve uma única exceção para o grupo com CSL, durante o período de restrição protéica, que apresentou melhor síntese de DNA e desenvolvimento celular do fígado por hiperplasia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALBANES, D. ; SALBE, A.D. ; LEVANDER, O.A. ; TAYLOR, P.R. NIXON, D.W. ; WINICK, M. The effect of early caloric restriction on clonic cellular growth in rats. **Nutrition and Cancer**, New York, v. 13, n. 1/2, p. 73-80, 1990.
- AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1991. 547p.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 12ed. Washington, 1990, 1018p.
- ARABBI, P. R. Alimentos funcionais - aspectos gerais. **Revista Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 21, p. 87-102, 2001.
- ARAYA, J. ; RUZ, M. SALDAÑO, P. ; ROMEO, E. Determinacion de los requerimientos y de la eficiencia en la utilizacion de energia y proteínas de la dieta, durante la recuperacion de la desnutricion en ratas: auto seleccion de energia y proteínas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 24, n.3, p. 354-373, 1979.
- ASP, G.N. ; JOHANSSON, C.G. ; HALLMER, H. ; SILJESTRÖM, M. A rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.31, p. 476-482, 1983.
- BARANKIEWICZ, J. ; COHEN, A. Purine nucleotide metabolism in phytohemagglutinin-induced human T lymphocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.258, n.1, p.167-175, 1987.
- BARFORD, J.P. ; CAIL, R.G. ; CALLENDER, I. J. ; FLOYD, E. J. Anaerobic digestion of high-strength cheese whey utilizing semicontinuous digesters and chemical flocculant addition. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 28, n.11, p.1601-1607, 1986.
- BECK, B. ; DOLLET, J.M. ; MAX, J. P. Refeeding after various times of ingestion of a low protein diet: effects on food intake and body weight in rats. **Physiology & Behavior**, New York, v. 45, n. 4, p. 761-765, 1989.
- BLIGH, E.G. ; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.7, p. 911-917, 1959.

- BOIRIE, Y. ; DANGIN, M. GAGHON, P.; VASSON, M. P. ; MAUBOIS, J. L. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academic of Science USA**, Washington, v. 94, n.12, p.14930-14935, 1997.
- BOUNOUS, G. ; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical Investigative Medicine**, Toronto, v.14, n. p. 296-309, 1991.
- BOUNOUS, G. ; KONGSHAVN, P.A.L. ; GOLD, P. The imunienhancing property of dietary whey proteins concentrate. **Clinical investigative Medicine**, Toronto, v.11, n.1, p.271-278, 1988.
- BOZA, J. ; JIMÉNEZ, J. ; BARÓ, L. ; MARTÍNEZ, O. ; SUÁREZ, M.D. ; GIL,A. Effects of native and hydrolyzed whey protein on intestinal repair of several starved rats at weaning. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v.22, n.2, p. 186-193, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitical Biochemistry**, San Diego, v.72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRENNAN, M.F. ; CERRA, F. ; DALY, J.M. ; FISCHER, J.E. MOLDAWE, L.L. ; SMITH, R.J. ; VINNARS, E. ; WANNEMACHER, R. ; YOUNG, V.R. Report of research workshop: branched-chain amino acids in stress and injury. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Baltimore, v.10, n.5, p. 446-452, 1986.
- BRUNSER, O. ; ESPINOZA, J. ; ARAYA, M.; CRUCHET, S. ; GIL, A. Effect of dietary nucleotide supplementation on diarrhoea disease in infants. **Acta Paediatrica**, New York, v.83, p.188-191, 1994.
- BURRIN, D. G. ; BRITTON, R.A. ; FERRELL, C.L. Visceral organ size and hepatocyte metabolic activity in fed and fasted rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 118, n.12, p.1547-1552, 1988.
- BURTON, K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. **The Biochemical Journal**, Cambridge, v. 62, n.2, p.315-322, 1956.
- BUTZNER, D.J. ; GALL, D.G. Impact of protein-calorie malnutrition on the developing intestine. **Biology of the Neonate**, Basel, v. 54, n (1/8), p.151-159, 1988.

- CABALLERO-CÓRDOBA, G.M. ; PACHECO, M.T.B. ; SGARBIERI, V.C. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp) e determinação do valor nutritivo da proteína em células integras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.2, p.102-106, 1997.
- CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; SGARBIERI, V.C. Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v.17, n.2, p.102-106, 1997.
- CARDOSO, M.A. ; TIRAPEGUI, J.O. ; MARCHINI, J.S. Alterações metabólicas na desnutrição protéico-calórica. **Cadernos de Nutrição**, São Paulo, v.3, p.27-41, 1991.
- CARRILLO, M.C.; CARNOVALE, C.E. ; FAVRE, C. ; MONTI, J. A. SCAPINI, C. Hepatic protein synthesis and serum aminoacid levels during liver regeneration in young and old malnourished rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, New York, v. 91, p. 55-64, 1996.
- CARUGHI, A. ; CARPENTER, K.J. DIAMOND, M.C. Effect of environmental enrichment during nutritional rehabilitation on body growth, blood parameters and cerebral cortical development of rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.119, n.12, p. 2005-2016, 1989.
- CARVER, J.D. Dietary nucleotides: cellular Immune, intestinal and hepatic system effects. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.124, n.1S, p. 144S-148S, 1994.
- CARVER, J.D. ; PIMENTEL, B. ; COX, W.I. ; BARNES, L.A. Dietary nucleotides effects upon immune function in infants. **Pediatrics**, New York, v.88, p.359-363, 1991.
- CHALA, A. ; RAO,D.R. ; CHAWAN, C.B. ; SHACKELFORD, L. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v.18, p. 517-521, 1997.
- CLIFFORD, A. J. ; STORY, D.L Level of purines in foods and their metabolic effects in rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.106, n.3, p.435-442, 1976.
- COZZOLINO, S.M.F. Valor nutricional da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* em melaço de cana de açúcar. **Revista de Farmacia e bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.20, n.2, p.191-200, 1984.

- CRUEGER, W. ; CRUEGER, A. **Biotechnology. A textbook of industrial microbiology**. 2 ed. Sunderland: Sinauer, 1989, 357p.
- DALLAS, P. O uso de derivados de soro de leite em aplicações em produtos de consumo. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 21, p. 60-61, 1999.
- DANGIN, M. ; BOIRIE, Y. ; GARCIA-RODENAS, C. ; GACHON, P. ; FAUQUANT, J. ; CALLIER, P. ; BALLÈVRE, O. ; VEAUFRÈRE, B. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. **American Journal Physiological Endocrinology Metabolism**, New York, v. 280, p. E340-E348, 2001.
- DAVIES, H.J.A.; BAIRD, I.M.; FOWLER, J. ; MILLS, I.H. ; BAILLIE, J.E. ; RATTAN, S.; HOWARD, A.N. Metabolic response to low and very calorie diets. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, v.49, p.745-751, 1989.
- DICHI, J.B. ; BURINI, R. C. Avaliação do metabolismo protéico em humanos. **Cadernos de Nutrição**, São Paulo, v.5, p. 18-35, 1992.
- DOUMAS, B.T. ; WATSON, W.A. ; BIGGS, H.G. Interferences with biuret methods for serum proteins- use of benedicts qualitative glucose reagent as biuret reagent. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 29, n.10, p.1491 -1495, 1971.
- ENESCO, M. ; LEBLOND, C.P. Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. **Journal Embriological Experimental Morphological**, London v. 10, n.4, p. 530-562, 1962.
- FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Protein quality evaluation**. Rome, 1991. 66p. (Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation).
- FIRMANSYAH, A. ; SUWANDITO, L. ; PENN, D. ; LEBENTHAL, E. Biochemical and morphological changes in the digestive tract of rats after prenatal and postnatal malnutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Baltimore v. 50, n.1-2, p. 261-268, 1989.
- FONSECA, L.M. ; FONSECA, C.S.P. ; BRANDÃO, S.C.C. Propriedades anticarcinogênicas de componentes do leite. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 21, p. 50-56, 1999.
- FRÜHBECK, G. Slow and fast dietary proteins. **Nature**, Paris, v. 391, p.843-845, 1998.

- GÁLVEZ, A. ; RAMÍREZ, M.J. ; GARCÍA-GARIBAY, M. Chemical composition of a mixture of single-cell protein obtained from *Kluyveromyces fragilis* and whey proteins. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.40, n.2, p.252-262, 1990.
- GOLDEN, M. H.N. Transport proteins as indices of protein status. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 6, p.1159-1165, 1982.
- GOMES, P.F. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Nobel, 1982, 430p.
- GOODMAN, M.N. ; RUDERMAN, N.B. Starvation in the rat. Effect of age and obesity on organ weights, RNA, DNA, and protein. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 239, n.4, p. E269-E276, 1980.
- GUTIERREZ, L.E. **Bioquímica de leveduras**. Piracicaba: ESALQ/USP Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, 1997, 270p.
- GUZMÁN, G. J. Whey protein concentrate (80%) its importance in human nutrition. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, Avanços e Perspectivas, Campinas: FEA/UNICAMP, 1995.
- HAIDER, M. ; TARVER, H. Effect of diet on protein synthesis and nucleic acid level in rat liver. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 99, p.433-445, 1969.
- HALÁSZ, A. ; LÁSTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 312p.
- HARDY, G. Nutraceutical and functional foods: introduction and meaning. **Nutrition**, New York, v. 16, n. 7/8, p. 688-689, 2001.
- HARRIS, P.M. Changes in adipose tissue of the rat due to early undernutrition followed by rehabilitation. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.43, n.1, p. 15-26, 1980.
- HEINE, W.E. ; KLEIN, P.D. ; REEDS, P.J. The importance of α -Lactalbumin in infant nutrition. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.121, n.4, p.277- 283, 1991.
- HENRY, R. ; SOBEL, C. BERKMAN, S. Albumin standards and measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 31, n.1, p. 87, 1957.
- HURLEY, L.S. **Development nutrition**. Prentice-Hall. New Jersey, 1980, 335p.

- JACOBucci, H. B. ; SGARBIERI, V.C. ; DIAS, N. F.G.P. ; BORGES, P. TANIKAWA, C. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and protein and liver cholesterol. **Nutrition Research**, New York, v. 21, p. 905-915, 2001.
- KOLLAR, R. STURDIK, E. ; SAJBIDOR, J. Complete fractionation on *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v.6, n.3, 225-237, 1992.
- KULKARNI, A.D. ; RUDOLPH, F. ; VAN BUREN, C. T. The role of dietary sources of nucleotides in immune function: A Review. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n.1S, p. 1442S-1446S, 1994.
- KULKARNI, S.S. ; FANSLOW, W.C. ; RUDOLPH, F. B; VAN BUREN, C. T. Immunohemopoietic effects of dietary nucleotide restriction in mice. **Transplantation**, Baltimore, v.53, n.2, p. 467-472, 1992.
- LAGRANGE, V. ; DALLAS, P. Inovação de produto com concentrados de proteína de soro de leite dos USA. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.31, n.1, p.17-21, 1997.
- LAUTT, W.W.; LEGARE, D.J. ; D'ALMEIDA, M.S. Adenosina as putative regulator of hepatic arterial flow (the buffer response). **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 248, n.3, p. H331-H338, 1985.
- LELEIKO, N.S. ; BRONSTEIN, A.D. ; BALIGA, B.S. ; MUNRO, H.N. De novo purine synthesis in the rat small and large intestine: effect of dietary protein and purines. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 2, p.313-319, 1983.
- LITCHFIELD, J.H. Single-cell proteins. **Food Technology**, Chicago, v. 31, n.5, p. 175-9, 1977.
- LÓPEZ-NAVARRO, A.T. ; BUENO, J.D. ; GIL, A. ; SÁNCHEZ-POZO, A. Morphological changes in hepatocytes of rats deprived of dietary nucleotides. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.76, n.4, p.579-589, 1996.
- LÓPEZ-NAVARRO, A. T. ; GIL, A. ; SÁNCHEZ-POZO, A. Deprivation of dietary nucleotides results in a transient decrease in acid-soluble nucleotides and RNA concentration in rat liver. **The Journal of Nutrition**. Bethesda, v. 125, n.8, p.2090 -2095, 1995.

- LOURENÇO, E.J. **Tópicos de Proteínas de Alimentos**. Jabotical:Funep, 2000, p.344.
- LOURENÇO, E.J. **Influência da proteína da dieta sobre o desenvolvimento de órgãos de ratos**. São Paulo, 1975. 97p. Tese (Doutor em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- MARCHINI, J.S. ; FAUSTO, M.A. ; RODRIGUES, M.M.P. ; OLIVEIRA, J.E.D. ; VANNUCCHI, H. Necessidades e recomendações de proteínas: revisão atualização e sugestões. **Cadernos de Nutrição**, São Paulo, v.6, p.1-21, 1993.
- MARTÍNEZ, H. Aspectos clínicos e tratamento. In: **MÁ NUTRIÇÃO PROTÉICO-ENERGÉTICA**, 61, São Paulo, 2001. Anais, p.11-17.
- MARTINI, A.E.V. ; MILLER, M.W. ; MARTINI, A. Amino acid composition of whole cells of different yeasts. **Journal Agriculture of Food Chemistry**, Easton, v.27, n.5, p. 982- 984, 1979.
- MARTORELL, R. Conseqüências de longo prazo da subnutrição no desenvolvimento físico e mental. In: **MÁ NUTRIÇÃO PROTÉICO-ENERGÉTICA**, 61, São Paulo, 2001. Anais, p.19-29.
- MASANÉS, R. ; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, A. ; ALEMANY, M.; REMESAR, X. ; RAFECAS, I. Effect of dietary protein content on tissues protein synthesis rates in azucler lean rats. **Nutrition Research**, New York, v. 19, n.17, p. 1017-1026, 1999.
- McINTOSH, G.H. ; ROYLE, P.J. ; LEU, R.K.L. ; REGESTER, G.O.; JOHNSON, M.A. GRINSTED, R.L. ; KENWARD, R.S. ; SMITHERS, G.W. Whey proteins as functional food ingredients? **International Dairy Journal**, Alberta, v.8, n. 5/6, p. 425-434, 1998.
- McINTOSH, G.H.; REGESTER, G.O.; LEU, R.K.L.; ROYLE, P.J.; SMITHERS, G.W. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.125, n.4, p.809-816, 1995.
- MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, Alberta, v.8, n. 5/6, p. 425-434, 1998.

- MORGAN, E.H. PETERS Jr, T. The biosynthesis of rat serum albumin, **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 246, n.11, p.3500-3507, 1971.
- MUNRO, H.N. The determination of nucleic acids. **Methods of Biochemical Analysis**, Somerset, v. 14, p.113-176, 1966.
- NUÑEZ, M.C. ; AYUDARTE, M.V. MORALES, D. SUAREZ, M.D., GIL,A. Effect of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with experimental chronic diarrhea. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, New York, v.14, n.6, p. 598-604, 1990.
- OGOSHI, S. ; IWASA, M. ; YONEZAWA, T. ; TAMIYA, T. Effect of nucleotide and nucleoside mixture on rats given total parenteral nutrition after 70% hepatectomy. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Batimore, v. 9, n.2. p. 339-342, 1985.
- OLIVEIRA, S.R.P. ; BION, F.M. ; LOPES, S.M.L. ; METRI, A.C. Uso de uma mistura alimentar contendo bioproteínas (*Saccharomyces cerevisiae*): efeito sobre a gestação, a lactação e o crescimento de ratos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 51, n.1, p. 72-79, 2001.
- PACHECO, M.T.B. ; CABALLERO-CÓRDOBA, M. ; SGARBIERI, V.C. Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrates. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Osaka, v. 43, n.6, p. 6001-612, 1997.
- PHILBRICK, D.J. ; HILL, D.C. Development of malnutrition in rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 27, p. 813-818, 1974.
- PIZZINI, R.P. ; KUMAR, S. ; KULKARNI, A.D. RUDOLPH, F.B. ; VAN BUREN, C.T. Dietary nucleotides reverse malnutrition and starvation- induced immunosuppression. **Archives of Surgery**, Chicago, v. 125, p. 86-90, 1990.
- QU, Z ; LING, P.R. ; TAHAN, S.R. SIERRA, P. ; ONDERDONK, A.B. BISTRAN, B.R. Protein and lipid refeeding changes protein metabolism and colonic but not small intestinal morphology in protein-depleted rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 126, p. 906-912, 1996.
- QUAN, R. ; BARNESS, L.A. ; UAUY, R. Do infants need nucleotide supplemented formula for optimal nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Baltimore, v.11, p. 429-437, 1990.

- REED, G. ; NAGODAWITHANA, T.W. **Yeast Tecnology**, New York: Van Nostrand Reinhold, p.369-445, 1991.
- REEVES, P.G. ; NIELSEN, F.H. ; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.
- REGESTER, G.O. ; McINTOSH, G.H. ; LEE, V.W.K. ; SMITHERS, G.W. Whey proteins as nutritional and functional food ingredients. **Food Austrália**, Sydney, v. 48, n.3, p. 123-127, 1996.
- ROSALES, F.H. Yeast as protein source for human nutrition (A Review). **Acta Microbiologica Hungarica**, Budapest, v.31, n.3, p.159-172, 1984.
- ROSHKOVA, Z. ; DUKIANDJIEV, S. ; PAVLOV, K. Biochemical characterization of yeast protein isolates. **Die Nehrung**, Frankfurt, v.30, n.1, p. 3-4, 1986.
- ROSSOUW, J.E. Kwashiorkor in North America. **American Journal Clinical of Nutrition**, New York, v. 49, p. 588-592, 1989.
- ROTHSCHILD, M.A. ; ORATZ, M ; SCHREIBER, S.S. Serum Albumin, **Hepatology**, Baltimore, v. 8, n. 2, p. 385-401, 1988.
- RUDOLPH, F.B. The biochemistry and physiology of nucleotides. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n.1S, p. 124S-127S, 1994.
- SARWAR, G. ; SHAH, B.G. ; MONGEAU, R. KOPPNER, K. Nucleic acid, fiber and nutrient composition of inactive dried food yeast products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n.2, p. 353-357, 1985.
- SCHANBACHER, F.L.; TALHOUK, R.S. ; MURRAY, L.I. ; GHERMAN, L. ; WILLETT, L.B. Milk-borne bioactive peptides. **International Dairy Journal**, Alberta, v.8, n.5/6, p. 393-402, 1998.
- SGARBIERI, V.C. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas: Unicamp/ ALMED, 1987. 387p.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificações**. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.116.

- SGARBIERI, V.C. ; PACHECO, M.T.B. Revisão: Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, n.1,2, p.7-19, 1999.
- SGARBIERI, V.C. RANGEL, H.A.; ZINSLY, P.F. PACHECO, M.T.B. ; DIAS, N.F.G.P. **Novel nutritional and physiological functions of milk proteins**. In: Food of 21 st century - Food and Resource Technology environment, 21, 2000, Wuxi, Jiangsu. 2000. p.196-210.
- SGARBIERI, V.C. ; OLIVEIRA, D.A.G. ; SANTUCCI, M.C.C. ; SCHMIT, F. YAMADA, E.A. ; FARIA, E.V. ; ROSA, L.L. ALVIM, I.D. BALDINI, V.L. ; CHAUD, S.G. **Desenvolvimento de tecnologia visando o aproveitamento de levedura em alimentação humana e animal**. Campinas: FAPESP/ ITAL, 2002 ,130p. (Relatório Inovação Tecnológica (98/4173-5).
- SMITH, J.E. ; LUNN, P.G. Albumin-synthesizing capacity of hepatocytes isolate from rats fed diets differing in protein and energ content. **Annals of Nutrition & Metabolism**, Paris, v. 28, n.5 , p. 281-287, 1984.
- SMITHERS, G.W.; BALLARD, J. F.; COPELAND, A.D.; DE SILVA, K.J.; DIONYSIUS, D.A.; GODDARD, F.C.; GRIEVEM, P.A.; McINTOSH, G.H.; MITCHELL, I.R.; PEARCE, J.R. ; RESGESTER, G.O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.79, n.8, p.1454-1459, 1996.
- SOMMER, R. Yeast extracts: production, properties and components. **Food Australia**, Sydney, v. 50, n.4, p. 181-183, 1998.
- SPACKMAN, D.H. ; SETEIN, W.H. ; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in chromatography of aminoacids. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 30, n.7, p.1190-1197, 1958.
- SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, Washington-DC, v.39,n.10, p.1412-1415, 1967.
- TAKANO, T. Milk derived peptides and hypertension reduction. **International Dairy Journal**, Alberta, v.8, n.5/6, p. 375-381, 1998.
- TOMÉ, D. ; DEBABB, H. Physiological effects of milk protein components. **International Dairy Journal**, Alberta, v.8, n. 5/6, p. 383-392, 1998.
- UAUY, R. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.124S, n.1S, p. 157S-159S, 1994.

- UAUY, R. ; STRINGEL, G. ; THOMAS, R. ; QUAN, R. Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 10, n.4, p.497-503, 1990.
- VALENTE, F.L. S. Do combate à Fome à segurança alimentar e nutricional o direito à alimentação adequada. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, Campinas, v. 10, n.1, p. 20-36, 1997.
- VAN BUREN, C. T ; KULKARNI, A.D. ; RUDOLPH, F. The role of nucleotides in adult nutrition. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.124, n.1S, p.160S-165S, 1994.
- VILELA, E.S.D. ; SGARBIERI, V.C. ; ALVIM, I.D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*). **Revista de Nutrição**, Campinas, vol. 13, n.3, p. 185-192, 2000.
- WALKER, W.A. Nucleotides and nutrition: role as dietary supplement. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.124, n.1S, p.121S-123S, 1994.
- WALZEM, R.L. ; DILLARD, C.J. ; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Critical Reviews in Food and Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 42, n. 4, p. 353-375, 2002.
- WINICK, M. ; NOBLE, A. Cellular response with increased feeding in neonatal rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 91, n. 2, p.179-182, 1967.
- WINICK, M. ; NOBLE, A. Cellular response in rats during manInutrition at varios ages. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 89, n. 3, p.300-306, 1966.
- WINICK, M. ; NOBLE, A. Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in rat. **Developmental Biology**, New York, v.12, p. 451-466, 1965.
- WIT, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n.3, p.597-608, 1998.
- YOUNG, V.R. ; MARCHINI, J.S. Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. **American Journal Clinical of Nutrition**, New York, v. 51, p. 270-289, 1990.