



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

*Desenvolvimento de um Produto Dietético
Funcional para Idosos*

Fabiane La Flor Ziegler

Nutricionista

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Orientador

Campinas

2006

Fabiane La Flor Ziegler

Nutricionista

*Desenvolvimento de um Produto Dietético
Funcional para Idosos*

Dissertação apresentada à Faculdades de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Alimentos e Nutrição – Área de Nutrição Básica Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Campinas

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Z62d Ziegler, Fabiane La Flor
Desenvolvimento de um produto dietético funcional para idosos /
Fabiane La Flor Ziegler. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Alimento funcional. 2. Idosos. 3. Físico-química –
Propriedades. 4. Vida de prateleira. I. Sgarbieri, Valdemiro Carlos.
II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Development of a functional dietetic product for the elderly

Palavras-chave em inglês (Keywords): Functional food, Elderly, Properties –
Physical Chemistry, Shelf life

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Valdemiro Carlos Sgarbieri
Celio Kenji Miyasaka
Helena Maria André Bolini
José de Assis Fonseca Faria

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Orientador

Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Membro

Profa. Dra. Helena Maria André Bolini
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Membro

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Membro

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier

Aos que sempre acreditaram e acima de tudo confiaram em mim,

DEDICO

A minha mãe Marilene e meus irmãos Guilherme e Rafael, pelo amor, apoio, compreensão e carinho, que me fizeram ter coragem para sempre prosseguir;

Ao prof. Valdemiro Sgarbieri, pela amizade, ensinamentos e excelente orientação em todos os momentos, o que levarei sempre comigo;

A minha querida família, pela ajuda e eterna torcida pela minha realização profissional.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por iluminar minhas decisões, guiar meus passos e acima de tudo pelos obstáculos vencidos e conquistas alcançadas.

Ao amigo e eu diria, um verdadeiro pai, *Jaime Homrich*, pelos ensinamentos, amizade e incentivo.

Ao meu pai, *Paraguassú*, pela vida, educação e formação profissional.

Aos amigos especiais *Dr. Estevão de Oliveira e Juliano Barin*, maiores incentivadores dessa jornada, pelo apoio e estímulo constante.

Aos amigos *Cleci, Marcos e Felipe Streb*, os quais me recepcionaram muitíssimo bem em Campinas, pela ajuda, carinho e amizade.

Ao amigo *Waldir Filho*, pela dedicação e amor à minha mãe e irmãos, ajudando-os a suportar e aliviar minha ausência.

À *Faculdade de Engenharia de Alimentos*, especialmente ao *Departamento de Alimentos e Nutrição*, pela oportunidade em realizar o curso.

Ao Prof. Dr. *Celio Miyasaka*, pela colaboração, amizade e pôr disponibilizar o laboratório de Nutrição e Metabolismo para a execução de grande parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. *Jaime Amaya-Farfán* e a Prof^a. Dr^a. *Helena Bolini*, pela ajuda e pôr disponibilizarem os laboratórios de Fontes Protéicas e Análise Sensorial.

Ao Prof. Dr. *José de Assis Faria*, pela colaboração, ajuda e pôr disponibilizar o laboratório de Embalagens. A *Alice*, pela atenção a mim dispensada em vários momentos.

Aos membros da *Banca Examinadora*, pela importante contribuição e sugestões apresentadas.

A amiga de todas as horas *Elisvânia de Freitas*, incansável em me socorrer nas piores dificuldades, pelos conselhos, carinho, amizade e vários momentos divertidíssimos.

Ao amigo *Luciano Bruno*, pela amizade, apoio e confiança, jamais esquecerei tudo o que fizeste por mim.

Às amigas e companheiras de república *Elisvânia, Taciana, Alyne, Renata e Aline*, pela amizade, estímulo, apoio e compreensão nos momentos mais difíceis, nos quais vocês passaram a ser minha segunda família.

Aos meus queridos amigos gaúchos *Camila, Cláudia, Cedenir, Elizete, Fabiane, Lísia, Lucielen, Raquel, Roberta, Roger e Rodrigo* e a “quase” gaúcha *Giovanna*, os quais sabem o quão difícil é deixar a família, os amigos e o local que amamos para partir em busca da realização profissional, pela amizade, carinho e pelos vários momentos de diversão nos nossos churrascos e baladinhas.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório de Nutrição e Metabolismo: *Cláudia, Elisa, Elisvânia, Janesca, Laura, Luciano, Maria Inês e Pablo*, pela ajuda, incentivo, compreensão e amizade.

Às amigas *Fabiana e Alexandra*, pela amizade, carinho e companheirismo.

A todos os funcionários do DEPAN: *Fátima, Cidinha, Sônia, Eliana, Karla, Chico, Lia, Nice, Soely e Adriana*, pela amizade e colaboração. A *Suzana*, pela ajuda, ensinamentos e amizade, durante toda a realização do curso.

A todos da secretaria de Pós-Graduação, em especial ao *Cosme*, pela paciência e dedicação.

Aos *amigos distantes*, os quais mesmo de longe sempre torceram por mim.

Aos *colegas do curso*, pela amizade.

Ao *CNPq* pela bolsa de estudo concedida.

À *FAPESP*, pelo apoio financeiro através do projeto temático, coordenado pelo Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri.

Às empresas *Danisco, Doce Aroma Food Ingredients, Gelita South America, Globalfood, Mane do Brasil Ltda, M.Cassab Ltda, Orafiti, Purac e Roche*, pela doação dos ingredientes utilizados durante a execução desse trabalho.

A todas as pessoas que não foram mencionadas e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos.

Fabiane.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xxvii
RESUMO GERAL	xxx
GENERAL SUMMARY	xxxii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CONCLUSÃO GERAL	7
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1. Envelhecimento populacional	13
2. Alterações do envelhecimento e sua influência sobre o estado nutricional	15
2.1. Fatores socioeconômicos e psicológicos	15
2.2. Alterações fisiológicas	16
2.2.1. Composição corporal	17
2.2.2. Modificações metabólicas	18
2.2.3. Modificações no sistema digestivo	19
2.2.4. Alterações na percepção sensorial	21
2.2.5. Efeitos secundários dos fármacos	22
2.2.6. Alterações do sistema imunológico	24
3. Alimentos e ingredientes funcionais	25
3.1 Proteínas	27
3.1.1. Proteínas do soro de leite bovino	27
3.1.2. Hidrolisado de colágeno bovino	37
3.2. Prebióticos	42
3.3. Vitaminas e Minerais	45
4. Referências bibliográficas	49

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E NUTRICIONAL DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E HIDROLISADO DE COLÁGENO BOVINO	67
Resumo	69
1. Introdução	71
2. Material e métodos	73
2.1. Matéria-Prima	73
2.2. Métodos	73
2.2.1. Caracterização físico-química	73
Composição centesimal	73
Determinação do grau de hidrólise	74
Solubilidade	75
Determinação de aminoácidos totais	75
2.2.2. Avaliação nutricional em ratos	76
Composição e preparo das dietas	79
Determinação do valor nutritivo da proteína	83
2.2.3. Análise estatística	88
3. Resultados e discussão	89
3.1. Composição centesimal	89
3.2. Determinação do grau de hidrólise	90
3.3. Solubilidade	91
3.4. Composição de aminoácidos	97
3.5. Avaliação nutricional	99
4. Conclusões	110
5. Referências bibliográficas	110
CAPÍTULO 3 - DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO DIETÉTICO FUNCIONAL PARA IDOSOS DESNUTRIDOS	116
Resumo	118
1. Introdução	119
2. Materiais e métodos	121

2.1. Ingredientes	121
2.2. Embalagem	122
2.3. Formulação do produto	122
2.3.1. Testes preliminares da formulação	123
2.3.2. Avaliação sensorial com idosos	126
2.3.3. Formulação do produto final	129
2.3.4. Caracterização físico-química	131
2.4. Análise estatística	131
3. Resultados e discussões	132
3.1. Formulação final	132
3.2. Avaliação sensorial com idosos	140
3.3. Composição centesimal	146
4. Conclusão	148
5. Referências bibliográficas	149

CAPÍTULO 4 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E VIDA DE PRATELEIRA DO PRODUTO	155
Resumo	157
1. Introdução	158
2. Materiais e métodos	161
2.1. Vida de prateleira: considerações gerais, protocolo experimental ...	161
2.2. Determinação de umidade e atividade de água (a_w)	163
2.3. Determinação de isotermas de adsorção	163
2.4. Determinação da taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA)	166
2.5. Determinação instrumental de cor	167
2.6. Avaliação sensorial	169
2.7. Análise de minerais e vitaminas	170
2.8. Estimativa da vida de prateleira do produto	171
2.9. Análise estatística e de correlações	172
3. Resultados e discussões	173

3.1. Umidade e atividade de água (a_w)	173
3.2. Isoterma de adsorção	175
3.3. Taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA)	179
3.4. Análise instrumental da cor	180
3.5. Avaliação sensorial: tempos T_0 , T_{15} e T_{30}	185
3.6. Análise de minerais e vitaminas: T_0 , T_{15} e T_{30}	191
3.7. Estimativa da vida de prateleira	198
4. Conclusões	202
5. Referências bibliográficas	203
ANEXOS	209

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Composição protéica do WPC e do WPI comerciais (%).....	29
--	----

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E NUTRICIONAL DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E HIDROLISADO DE COLÁGENO BOVINO

2.1. Composição básica da dieta, segundo AIN-93 G para ratos em crescimento.....	80
2.2. Formulação da mistura vitamínica AIN-93 VX.....	81
2.3. Mistura mineral AIN G –MX.....	82
2.4. Composição centesimal do isolado protéico do soro de leite bovino (WPI) e do hidrolisado de colágeno bovino (HCB).....	89
2.5. Determinação do grau de hidrólise (%GH) pelo método do TNBS.....	91
2.6. Valores obtidos para a solubilidade do isolado protéico de soro de leite bovino a 25 °C com variação do pH e da concentração de sal (NaCl).....	92
2.7. Valores obtidos para solubilidade do hidrolisado de colágeno bovino em água a 25 °C com variação do pH e da concentração de sal (NaCl).....	94
2.8. Valores obtidos para a solubilidade da mistura 60%WPI: 40%HCB em água a 25 °C com variação da concentração da mistura em porcentagem.....	96
2.9. Valores obtidos para os aminoácidos totais (g por 100g de proteína) do isolado protéico do soro de leite bovino (WPI) e hidrolisado de colágeno bovino (HCB).....	97
2.10. Escore de aminoácidos essenciais (EAE) calculados com base no padrão de referência da FAO/WHO (1990).....	99
2.11. Ingestão de dieta, ingestão de proteína, PER (operacional) e NPR para ratos em dietas com 12% proteína de diferentes fontes.....	102
2.12. Valores obtidos para nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal, digestibilidade verdadeira e PDCAAS para ratos em dietas com 12% proteína de diferentes fontes.....	104

2.13. Valores de para nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal, nitrogênio urinário e digestibilidade aparente para a caseína comercial (CC), isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), mistura de 50% WPI: 50% HCB e mistura de 60% WPI: 40% HCB.....	107
---	-----

CAPÍTULO 3 - DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO DIETÉTICO FUNCIONAL PARA IDOSOS DESNUTRIDOS

3.1. Contribuição nutricional do produto em relação à recomendação da DRI (Dietary Reference Intakes) para macro e micronutrientes	130
3.2. Composição nutricional do produto final por dose (200 mL) e pelo total diário (600 mL) de ingestão.....	134
3.3. Valores de limite máximo permitidos pela resolução n° 389 (expressos em g/mL), valores da IDA (expressos em mg/Kg de peso) e os valores utilizados no produto (expressos em g/mL)	140
3.4. Composição nutricional equivalente a uma porção (200mL) do leite desnatado Lider [®] utilizado na avaliação sensorial com idosos	141
3.5. Composição nutricional do chocolate em pó solúvel Nestlé [®] equivalente a uma dose (3g/200mL) do produto	141
3.6. Média de aceitação das amostras do produto desenvolvido	142
3.7. Composição centesimal das formulações sem saborizante e chocolate	147

CAPÍTULO 4 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E VIDA DE PRATELEIRA DO PRODUTO

4.1. Soluções salinas saturadas utilizadas nos dessecadores e suas respectivas atividades de água a 25 °C	166
4.2. Teor de umidade e atividade de água (a_w) das formulações sem saborizante e chocolate no tempo inicial (T_0) e no tempo final (T_{30} dias) do estudo de vida de prateleira	173

4.3. Valores experimentais de umidade de equilíbrio (%) em várias condições de atividade de água para a formulação sem saborizante, a temperatura ambiente (27 °C).....	175
4.4. Valores experimentais de umidade de equilíbrio (%) em várias condições de atividade de água para a formulação chocolate, a temperatura ambiente (27 °C).....	176
4.5. Valores da luminosidade (L*), das coordenadas de cromaticidade (a* e b*) e diferenças em relação ao padrão (tempo zero) para a formulação sem saborizante, à temperatura ambiente	181
4.6. Valores da luminosidade (L*), das coordenadas de cromaticidade (a* e b*) e diferenças em relação ao padrão (tempo zero) para a formulação sabor chocolate, a temperatura ambiente	181
4.7. Valores da luminosidade (L*), das coordenadas de cromaticidade (a* e b*) e diferenças em relação ao padrão (tempo zero) para a formulação sem saborizante, a temperatura ambiente	182
4.8. Valores da luminosidade (L*), das coordenadas de cromaticidade (a* e b*) e diferenças em relação ao padrão (tempo zero) para a formulação chocolate, a temperatura ambiente	183
4.9. Teste de aceitação nos tempos: 0, 15 e 30 dias, respectivamente, do estudo de vida de prateleira	186
4.10. Resultados das análises de cálcio, magnésio, zinco, selênio, vitamina B ₆ e ácido fólico no tempo inicial do teste de vida de prateleira para as formulações sem saborizante e chocolate	191
4.11. Resultados das análises de vitaminas B ₁ , C, A e E nos tempos: 0, 15 e 30 dias, respectivamente, do estudo de vida de prateleira para as formulações sem saborizante e chocolate, em temperatura ambiente e a 35 °C	194
4.12. Estimativa das perdas vitamínicas no tempo T ₃₀ em relação ao T ₀ , para as formulações sem saborizante e sabor chocolate, em temperatura ambiente e a 35 °C.....	197

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E NUTRICIONAL DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E HIDROLISADO DE COLÁGENO BOVINO

2.1. Esquema experimental do primeiro ensaio biológico com ratos Wistar durante o período de 21 dias.....	77
2.2. Esquema experimental do segundo ensaio biológico com ratos Wistar durante o período de 10 dias.....	78
2.3 Gaiolas individuais utilizadas nos ensaios biológicos, onde os animais permaneceram com comida e água <i>ad libitum</i> . a) gaiolas individuais usadas no 1° experimento e b) gaiolas metabólicas e também individuais usadas no 2° experimento.....	79
2.4. Curva padrão de leucina utilizada para a determinação do grau de hidrólise (GH) através do método do TNBS para o hidrolisado de colágeno bovino.....	90
2.5. Representação do perfil de solubilidade do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) a 25 °C, em diferentes pHs e concentrações de cloreto de sódio.....	92
2.6. Representação do perfil de solubilidade do hidrolisado de colágeno bovino (HCB) a 25 °C, em diferentes pHs e concentrações de solução de cloreto de sódio.....	95
2.7. Representação do perfil de solubilidade da mistura 60%WPI: 40%HCB em água a 25 °C com variação da quantidade da mistura em gramas.....	96
2.8. Curva de crescimento de ratos alimentados por 21 dias com dietas contendo 12% de proteína proveniente de caseína (●); WPI (■);20%WPI:80% HCB (▲); 40%WPI:60% HCB (□); 60%WPI:40%HCB (Δ); 80%WPI:20%HCB (○).....	101
2.9. Representação gráfica do balanço de nitrogênio do ensaio com ratos Wistar alimentados por 10 dias, com dietas contendo 12% de proteínas provenientes de 50%WPI: 50%HCB ; WPI; caseína e 60%WPI: 40%HCB.....	106

2.10. Representação gráfica do valor biológico aparente do ensaio com ratos Wistar alimentados por 10 dias, com dietas contendo 12% de proteínas provenientes de 50%WPI: 50%HCB; WPI; CC e 60%WPI: 40%HCB.....	108
2.11. Representação gráfica da utilização líquida da proteína do ensaio com ratos Wistar alimentados por 10 dias, com dietas contendo 12% de proteínas provenientes de 50%WPI: 50%HCB; WPI; CC e 60%WPI: 40%HCB.....	108

CAPÍTULO 3 - DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO DIETÉTICO FUNCIONAL PARA IDOSOS DESNUTRIDOS

3.1. Testes preliminares com saborizantes em água e leite desnatado	125
3.2. Análise sensorial realizada com idosos da Faculdade da 3ª Idade da UNESP no campus de São José dos Campos – SP.....	127
3.3. Histograma do ideal de doçura das formulações desenvolvidas. -4 = extremamente menos doce que o ideal; -3 = muito menos doce que o ideal; -2 = moderadamente menos doce que o ideal; -1 = ligeiramente menos doce que o ideal; 0 = ideal; 1 = ligeiramente mais doce que o ideal; 2 = moderadamente mais doce que o ideal; 3 = muito mais doce que o ideal; 4 = extremamente mais doce que o ideal	145
3.4. Histograma de intenção de compra dos provadores para as formulações desenvolvidas. 1 = certamente não compraria; 2 = provavelmente não compraria; 3 = tenho dúvidas se compraria ou não; 4 = provavelmente compraria; 5 = certamente compraria	146

CAPÍTULO 4 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E VIDA DE PRATELEIRA DO PRODUTO

4.1. Delineamento experimental realizado para os testes de vida de prateleira (estabilidade) do produto desenvolvido	162
4.2. Ilustração do dessecador com água destilada (100% de umidade) para determinação da isoterma de adsorção através do medidor portátil pa _w kit	164
4.3. Ilustração dos dessecadores com soluções saturadas, para determinação dos pontos críticos do produto	165

4.4. Isoterma de adsorção da formulação sem saborizante em temperatura ambiente (27 °C)	176
4.5. Isoterma de adsorção da formulação sabor chocolate em temperatura ambiente (27 °C)	177
4.6. Valores do ganho de peso das amostras sem saborizante e chocolate durante 32 dias de estudo	179
4.7. Alteração na cor das amostras armazenadas em 100% de umidade relativa de equilíbrio: a) com um dia de armazenamento e b) com uma semana de armazenamento	184
4.8. Valores das diferenças em relação ao padrão (tempo zero), ΔE^* , para a formulação sem saborizante e sabor chocolate, a temperatura ambiente	184
4.9. Média de aceitação dos parâmetros aroma, sabor, aparência e impressão global da análise sensorial realizada durante os testes de vida de prateleira nos tempos zero, 15 e 30 dias para a amostra sem saborizante	188
4.10. Média de aceitação dos parâmetros aroma, sabor, aparência e impressão global da análise sensorial realizada durante os testes de vida de prateleira nos tempos zero, 15 e 30 dias para a amostra sabor chocolate	188
4.11. Histograma de intenção de compra realizado no tempo zero (a); tempo 15 dias (b) e tempo 30 dias de estocagem (c) em temperatura ambiente. 1 = certamente não compraria; 2 = provavelmente não compraria; 3 = tenho dúvidas se compraria ou não; 4 = provavelmente compraria; 5 = certamente compraria	190
4.12. Valores experimentais de ganho de peso do produto sem saborizante no decorrer do tempo de estocagem, a temperatura ambiente	198
4.13. Valores experimentais de ganho de peso do produto sabor chocolate no decorrer do tempo de estocagem, a temperatura ambiente	199

RESUMO GERAL

O principal objetivo da presente pesquisa foi desenvolver um produto dietético funcional para idosos desnutridos. Para tal, realizou-se inicialmente a caracterização físico-química e nutricional das fontes protéicas: isolado protéico do soro de leite bovino (WPI) e hidrolisado de colágeno bovino (HCB), buscando-se adequar a proporção entre elas, bem como, avaliar algumas de suas propriedades físicas, composição, perfil de aminoácidos e propriedade nutricional. Posteriormente foi realizado o desenvolvimento do produto através de testes preliminares, caracterização físico-química, testes sensoriais e de vida de prateleira. Na 1^a etapa do trabalho observou-se que o componente de maior concentração foi a proteína para as duas amostras (~ 92%). A solubilidade foi elevada tanto do WPI como do HCB o que refletiu, conseqüentemente, na solubilidade da mistura dessas proteínas. O perfil de aminoácidos essenciais (EAE) do WPI atende às recomendações da Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO), no entanto o HCB apresenta deficiência em vários aminoácidos essenciais, particularmente em triptofano e aminoácidos sulfurados. Do ponto de vista nutritivo, os índices quociente de eficiência protéica (PER), utilização líquida da proteína (NPU), valor biológico aparente (VBa) e balanço de nitrogênio (BN), as misturas WPI:HCB (60:40 e 80:20) não diferiram estatisticamente entre si e do WPI ($p > 0,05$), sendo inferior ($p < 0,05$) à caseína comercial (CC) usada como referência. Em função dos resultados obtidos, optou-se pela mistura 60% WPI: 40% HCB como componente protéico na formulação do produto dietético funcional, por razões econômicas.

Nos testes preliminares avaliaram-se diferentes combinações e proporções entre os ingredientes para a obtenção da melhor formulação, principalmente em relação à solubilidade e ao aspecto sensorial. A escolha destes ingredientes, bem como a quantidade usada foi baseada em pesquisas na literatura a respeito do perfil nutricional de idosos e suas principais deficiências. Através da análise sensorial (testes de aceitação, ideal de doçura e intenção de compra) com idosos foram escolhidas as formulações sabor chocolate e sem adição de sabor dentre

seis opções, as quais receberam médias de aceitação de 6,87 e 6,60, respectivamente, numa escala de nove pontos. Essas formulações apresentaram em torno de 12% de proteína e 80% de carboidratos com adição de inulina, frutooligossacarídeos (FOS), cálcio, zinco, magnésio, selênio e as vitaminas B₁, B₆, ácido fólico, B₁₂, A, C e E. Com as formulações foi realizado estudo da vida útil do produto durante 30 dias de estocagem em temperatura ambiente e a 35 °C usando-se filme de polipropileno como material de embalagem. Realizaram-se análises de umidade, atividade de água (a_w), isoterma de adsorção, taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA), cor, avaliação sensorial e perda de vitaminas. O produto apresentou a_w inicial abaixo de 0,3, valor característico de alimentos desidratados. As isotermas de adsorção foram utilizadas para determinação dos valores de a_w crítica (0,5), umidade crítica (5,1%) e umidade inicial (~2,0%), os quais foram usados nos cálculos da estimativa da vida útil do produto. Observou-se pequena variação na cor ($\Delta E^* = 0,4$ para formulação sem saborizante e 0,6 para a formulação chocolate) durante os 30 dias de estocagem. A qualidade sensorial manteve-se satisfatória nas três avaliações (tempo zero, 15 e 30 dias), obtendo-se médias de aceitação acima de 5 para os todos atributos. Mais de 65% dos provadores tiveram intenção de compra entre “certamente compraria” e “tenho dúvidas se compraria”. Através desses resultados, constatou-se uma maior preferência pela formulação chocolate. Verificou-se uma diminuição apreciável no teor das vitaminas B₁, C, A e E ao final da estocagem. Através do ganho de peso das formulações estimou-se a vida de prateleira do produto, a qual foi de aproximadamente 4 meses. Dessa forma, recomenda-se o uso de embalagens com maior proteção, no caso de uma possível comercialização ou administração a idosos, evitando-se a degradação dos nutrientes mais sensíveis e conseqüente diminuição do valor nutricional do produto.

GENERAL SUMMARY

The main objective of the present investigation was the development of a functional dietetic product for undernourished elderly. First step was the chemical, physical and nutritional characterization of protein component, a mixture of whey protein isolate (WPI) and a bovine collagen hydrolysate (HCB) both materials containing around 92% protein and showing high solubility in water. The essential amino acid profile (EAE) of the WPI reaches all the requirements of the FAO/WHO reference standard, however the HCB is deficient in all essential amino acids, particularly in cysteine and tryptophan which is totally absent in collagen. The nutritional indices PER, NPU, VB_a and nitrogen balance (NB) of the two mixtures WPI:HCB (60:40 and 80:20) respectively, did not show statistical difference ($p > 0.05$) among themselves and with the WPI. Nevertheless they were inferior ($p < 0.05$) to a commercial casein (CC) used as reference. The choice was for the mixture WPI:HCB (60:40) for economical reasons.

The choice of ingredients, composition and concentrations in the formulation was based mainly in three criteria, i.e., solubility, sensorial aspects and nutritional deficiencies of elderly population, based on literature surveys. In sensorial tests (acceptance, ideal sweetness and buying attitude) conducted with an elderly group for six different formulations, the choice was for the formula dissolved in milk with chocolate flavor and the other with no flavouring added. The acceptance scoring was 6.87 and 6.60 respectively, for the two formulations using a 9 – point scale. The two formulations contained around 12% protein and 80% carbohydrate in addition to inuline, fructooligosaccharides (FOS), calcium, zinc, magnesium, selenium and the vitamins B₁, B₆, folic acid, B₁₂, vitamin A, C and E. A shelf life study was conducted with the two formulations during 30 days under the laboratory environmental conditions and at 35 °C. Humidity, water activity (a_w), adsorption isotherm, water vapor permeability rate (WVPR), color, sensorial evaluation, mineral and vitamin analysis were performed. Water activity at time zero (T_0) was

below 0.3, characteristic of dehydrated powder. The adsorption isotherms were used for determination of the critical a_w (0.5), critical moisture content of 5.1% and initial moisture of about 2.0%, which were used for the estimation of the product shelf life. A small color variation was observed (ΔE^* 0.4 for the formulation without flavouring and 0.6 for the chocolate formula), during the 30 days of storage. Sensorial qualities were satisfactory for all three storage time (T_0 , T_{15} and T_{30}), with an average acceptance score above 5. More than 65% of the panel demonstrated buying intention between “certainty of buying” and “doubt of buying”. Higher preference was for the chocolate formula. Appreciable losses of the vitamins B₁, C, A and E were detected during storage in both samples, independently of the storage condition. The shelf life estimated was of approximately 4 months for both formulations. It is recommended that a packaging material with more barrier to water vapor, light and oxygen must be used for product to minimize losses of the more unstable vitamins.

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, a ciência da nutrição tem demonstrado grande progresso, relacionado, em grande parte, à conceitualização e comercialização dos alimentos funcionais, que já correspondem de 5 a 7% do mercado mundial de alimentos (NBJ, 2003). Isto se deve ao crescente interesse dos consumidores, que buscam nesses alimentos, além da sua função básica de nutrir, benefícios adicionais à saúde.

Porém, a realidade brasileira não representa o mercado mundial de alimentos funcionais. A viabilidade da produção destes produtos depende, sobremaneira, da parceria entre a indústria alimentícia nacional (através de incentivo e investimento) e as instituições de ensino superior (através da comprovação científica da alegação de funcionalidade dos produtos desenvolvidos), que poderão garantir desta forma, a segurança, a eficácia e um menor custo para o consumidor brasileiro.

A literatura relata vários ingredientes alimentares com alegação funcional, os quais são utilizados no desenvolvimento de novos produtos para o mercado consumidor. Dentre eles pode-se citar os prebióticos, probióticos, peptídios e proteínas do soro de leite, oligossacarídeos, fibras dietéticas, vitaminas, minerais fitoquímicos e antioxidantes (GIESE, 1995; PSZCZOLA, 2001; SGARBIERI e PACHECO, 1999).

Conforme o *PA Consulting Group* (BRONOUS, 1997 citado por SGARBIERI e PACHECO, 1999), em nível mundial, o mercado de alimentos funcionais manufaturados está fragmentado da seguinte forma: produtos à base de fibra dietética (40%); ricos em cálcio (20%); à base de oligossacarídeos (20%); contendo bactérias lácticas (10%) e outros (10%).

É fundamental que no desenvolvimento de produtos alimentícios com propriedades funcionais, algumas etapas sejam seguidas (NATIONAL INSTITUTE OF NUTRITION, 1996): 1) identificação do alimento, de origem vegetal ou animal, com uma ou mais atividade fisiológica-funcional; 2) identificação e caracterização do(s) princípio(s) ativo(s); 3) concentração e variação na concentração do princípio ativo; 4) descrição da atividade funcional, considerando a natureza da função e sua eficácia); 5) potencial tóxico do produto ou princípio ativo; 6) disponibilidade do produto para uso como alimento ou ingrediente funcional.

No desenvolvimento de produtos para a população idosa deve-se tomar o cuidado de oferecer os nutrientes que promovam uma adequada ingestão, atendendo as recomendações para essa faixa etária, a qual por diversas alterações fisiológicas, bem como, fatores sociais e econômicos acaba tornando-se um grupo de risco para o desenvolvimento de deficiências nutricionais.

Assim, a associação do colágeno hidrolisado, proteína deficiente principalmente em triptofano e cisteína, e proteínas do soro de leite, as quais possuem esses aminoácidos em excesso, torna-se possível uma melhora significativa no equilíbrio de aminoácidos essenciais, com considerável vantagem nutricional. Também haverá vantagem econômica na associação dessas duas proteínas, uma vez que o colágeno é abundante e de baixo custo enquanto que as proteínas do soro de leite são de difícil recuperação tecnológica e de alto custo.

Dessa forma, objetivou-se desenvolver um produto dietético funcional, para idosos desnutridos, utilizando como fonte protéica um isolado de proteína de soro de leite bovino (WPI) e colágeno bovino hidrolisado (HCB) com elevado valor protéico e boas propriedades tecnológicas (solubilidade, estabilidade, aparência e aceitabilidade). Além disso, também se teve o objetivo de aumentar as propriedades fisiológicas, uma vez que as proteínas do soro de leite atuam em vários aspectos da modulação do metabolismo, particularmente do sistema imunológico, o que deverá reforçar as propriedades estruturais do colágeno

(gelatina) na saúde da pele, ossos e articulações, fundamentais para a promoção de uma melhor qualidade de vida de idosos.

Além disso, buscou-se aumentar os benefícios nutricionais e funcionais do produto através da utilização dos prebióticos inulina e frutooligossacarídeos, bem como de vitaminas e minerais essenciais para promoverem efeitos benéficos à saúde dos idosos.

Neste sentido, a adição de inulina e frutooligossacarídeos no produto deverá acarretar vários benefícios, desde o equilíbrio da microbiota intestinal, prevenção de diarreia e da constipação, a redução do colesterol plasmático, o aumento na absorção de minerais, bem como, a prevenção de determinados tipos de câncer (FORTES, 2005). Entretanto, as vitaminas e minerais apresentam propriedades funcionais por atuarem positivamente no sistema imunológico, no sistema ósseo, contra alguns tipos de câncer, nas doenças cardiovasculares, doenças de pele e artrite (SGARBIERI e PACHECO, 1999).

Optou-se por apresentar a dissertação em quatro capítulos: o Capítulo 1, apresenta uma revisão de literatura sobre envelhecimento populacional, principais alterações do envelhecimento e sua influência sobre o estado nutricional dos idosos, algumas considerações sobre alimentos e ingredientes funcionais, destacando-se as propriedades fisiológicas das proteínas do soro do leite, hidrolisado de colágeno, inulina, frutooligossacarídeos, vitaminas e minerais para a população geriátrica; no Capítulo 2 foi realizada a caracterização físico-química e nutricional do isolado protéico do soro de leite bovino (WPI) e hidrolisado de colágeno bovino (HCB), avaliando-se algumas de suas propriedades físicas, composição, perfil de aminoácidos e propriedade nutricional através de ensaios biológicos; o Capítulo 3 trata do desenvolvimento do produto dietético funcional para idosos desnutridos. Para tal, realizaram-se testes preliminares, caracterização físico-química e testes sensoriais; no Capítulo 4 determinam-se as propriedades físico-químicas e a vida de prateleira do produto, analisando-se os

seguintes parâmetros: umidade, atividade de água (a_w), isoterma de adsorção, taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA), cor, avaliação sensorial, perda de vitaminas e estimativa da vida útil do produto formulado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FORTES, R.C. Os frutooligossacarídeos, a inulina e suas implicações na indústria de alimentos. *Nutrição Brasil*, Rio de Janeiro, v.4, n.1, p. 52-61, 2005.

GIESE, J. Developments in beverage additives. **Food Technology**, Chicago, v. 49, n. 9, p. 64-72, 1995.

NBJ-Nutrition Business Journal 2003. Functional foods report. San Diego. Disponível em: www.nutritionbusiness.com . [acesso 2004 jan 24].

NATIONAL INSTITUTE OF NUTRITION. Nutraceuticals – towards consumer and market health. **Rapport**, v.11, p.4-5, 1996.

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.

PSZCZOLA, D.E. How ingredients help solve beverage problems. **Food Technology**, Chicago, v. 55, n. 10, p. 61-74, 2001.

Conclusão Geral

CONCLUSÃO GERAL

As diferentes proporções de proteínas do soro de leite (WPI) e o hidrolisado de colágeno bovino (HCB) avaliadas nos ensaios biológicos que apresentaram melhores resultados nutricionais foram 60% WPI: 40% HCB e 80% WPI: 20% HCB, as quais não diferiram estatisticamente entre si e do WPI ($p > 0,05$), sendo inferior ($p < 0,05$) à caseína comercial usada como referência. A mistura protéica escolhida para compor a formulação foi WPI : HCB (60:40), por apresentar elevado valor nutritivo e ser relativamente a mais econômica.

Na análise sensorial com idosos foram escolhidas as formulações com sabor chocolate e sem saborizante, as quais receberam as maiores médias de aceitação de 6,87 e 6,60 respectivamente, resultados que foram concordantes com os testes de ideal de doçura e intenção de compra.

Os testes de vida de prateleira permitiram estimar a vida útil do produto em aproximadamente 4 meses à temperatura ambiente, tendo-se verificado perdas consideráveis de algumas vitaminas (tiamina, ácido ascórbico, vitamina A e α -tocoferol) em função da embalagem de polipropileno usada. Sugere-se que para se evitar perdas de nutrientes mais instáveis, e também para aumentar o tempo de estocagem sem causar alterações no produto, deva-se utilizar embalagens com maior proteção, oferecendo barreira à luz, ao oxigênio e ao vapor de água. Essa preocupação torna-se fundamental no momento em que se pretenda administrar o produto desenvolvido aos idosos desnutridos, ou no caso do mesmo vir a ser comercializado.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ENVELHECIMENTO POPULACIONAL

O envelhecimento humano normal é um processo biológico natural, e não patológico, caracterizado por uma série de alterações morfo-fisiológicas, bioquímicas e psicológicas que ocorrem no organismo ao longo da vida ou, conforme alguns autores, logo depois da maturação sexual, estendendo-se até a longevidade máxima (ROLAND, 1991; WILMOTH, 1998; JECKEL NETO, 2000).

A Organização das Nações Unidas (ONU) adota para os países desenvolvidos 65 anos como ponto de corte, a partir do qual, os indivíduos seriam considerados idosos. Para os países em desenvolvimento, nos quais a expectativa de vida é inferior, adota-se 60 anos como idade de transição das pessoas para o segmento idoso da população (PASCHOAL, 1997). No Brasil, de acordo com a lei n° 8.842 de janeiro de 1994, regulamentada pelo decreto n° 1948, de 3 de julho de 1996, idosa é toda pessoa de 60 anos de idade ou mais.

O processo de envelhecimento vem manifestando-se de forma diferenciada no tempo, segundo desenvolvimento econômico, e a rapidez com que se apresenta (HEREDIA, 1999). O fenômeno do aumento progressivo da representatividade do idoso na população mundial iniciou-se no final do século XIX em alguns países da Europa Ocidental, espalhou-se pelo resto do Primeiro Mundo, no século passado, e se estendeu, nas últimas décadas, por vários países do Terceiro Mundo, inclusive o Brasil (CARVALHO e GARCIA, 2003).

Sem dúvida nenhuma o processo de envelhecimento da população mundial é um fenômeno ao mesmo tempo alvissareiro, porque as pessoas estão vivendo

mais, porém preocupante. Em 1950, o percentual populacional de maiores de 60 anos de idade era de 8,2%; em 2000 essa faixa etária alcançou 10%. As projeções para 2050 estimam 21,1% de pessoas idosas habitando o planeta. No Brasil, os índices são parecidos: em 1950, 4,9%; em 2000, 7,8%, e no ano 2050, teremos 23,6% de idosos (PESSINI, 2002; HEREDIA, 1999). O aumento será maior e mais rápido nos países em desenvolvimento, onde se espera que a população idosa seja quadruplicada durante os próximos 50 anos de acordo com o artigo n° dois da Declaração Política da II Assembléia Mundial da ONU sobre o Envelhecimento (2002). Essas projeções demonstram que o Brasil passará a ocupar o sexto lugar na esfera mundial no ano de 2025 (KALACHE et al.,1987; VERAS, 1994).

No caso brasileiro, conforme CARVALHO e GARCIA (2003), pode-se afirmar que de 1940 até 1960, a população apresentou-se como quase-estável, com distribuição etária praticamente constante. Nesse período, ocorreu um significativo declínio da mortalidade e uma leve queda da natalidade. A partir do final dos anos 60, observou-se uma rápida e generalizada queda da natalidade no país. Sua taxa de natalidade passou de 5,76 em 1970 para 2,04 filhos por mulher em 2000 (HEREDIA, 1999; Fundação IBGE, 2000).

Outro aspecto relevante é o crescente aumento na expectativa de vida ao nascer. No Brasil, em 1980, era de 57,2 anos para o homem e 64,3 para a mulher; em 1990, esses dados já eram 59,3 e 65,8 respectivamente e em 2000, essa expectativa de vida era de 64,8 para o homem e 72,5 anos para a mulher (Fundação IBGE apud PESSINI e QUEIROZ, 2002). De acordo com os resultados do Censo Demográfico 2000, manteve-se a tendência histórica de predominância feminina na composição por sexo da população brasileira (Fundação IBGE, 2000).

Assim, os idosos constituem um desafio para a sociedade civil e para o Estado que devem procurar oferecer qualidade de vida apropriada e eficiente às pessoas dessa faixa etária (HEREDIA, 1999).

2. ALTERAÇÕES NO ENVELHECIMENTO E SUA INFLUÊNCIA SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL

NOGUÉS (1995) destaca a existência de condições particulares que condicionam o estado nutricional dos idosos. Alguns desses condicionantes são devidos às alterações fisiológicas próprias do envelhecimento, enquanto outros são influenciados por doenças presentes e por fatores relacionados com a situação socioeconômica e familiar.

Já ARANHA *et al.* (2000), relata que o idoso está exposto a modificações no seu equilíbrio nutricional por razões fisiológicas, socioeconômicas, doenças, problemas dentários, diminuição da percepção sensorial, depressão ou problemas mentais, além de outras doenças que possam reduzir o apetite, diminuir a absorção e utilização dos nutrientes ou, ainda aumentar as necessidades de nutrientes, o uso de drogas que afetam a ingestão, a absorção e utilização, ou excreção de nutrientes e outras.

Dessa forma, os idosos se tornam um grupo de risco para desenvolver carências nutricionais de vitaminas, minerais, bem como de energia e proteínas, sendo conveniente uma alimentação balanceada e variada para garantir um estado nutricional adequado, que irá influenciar positivamente na qualidade de vida dessas pessoas.

2.1. Fatores socioeconômicos e psicológicos

As mudanças sociais, econômicas e psicológicas que ocorrem com o envelhecimento podem alterar negativamente o estado nutricional de idosos.

Dentre os fatores de maior destaque na nutrição inadequada das pessoas da 3ª idade, encontram-se os fatores psicossociais, como por exemplo, perda do

cônjuge, depressão, isolamento social, pobreza, integração social, capacidade de deslocamento, capacidade cognitiva e outros associados à própria enfermidade (CAMPOS *et al.*, 2000).

Uma das características de destaque da população idosa brasileira é o baixo poder aquisitivo em razão da sua exclusão do mercado de trabalho (VERAS, 1994) e também pelo recebimento de aposentadorias e/ou pensões insuficientes (NOGUÉS, 1995). Esse fato resulta na aquisição de alimentos de menor custo, contribuindo para a monotonia alimentar.

Embora se mantenha uma certa autonomia, a capacidade funcional se altera, o que dificulta a compra dos alimentos, bem como, o seu preparo e também o deslocamento de um local para o outro. Nessas condições, os alimentos são adquiridos em função do seu preço, facilidade de preparo e tempo de conservação e não em função das suas qualidades nutricionais. Isso tudo justifica a elaboração de dietas desequilibradas em nutrientes nessa etapa da vida (PALLÀS, 2002). NOGUÉS (1995) acrescenta o elevado consumo de produtos industrializados, como doces e massas, ou de fácil preparo, como chás e torradas em decorrência da solidão social, familiar e depressão.

Verifica-se que no Brasil, está ocorrendo uma diminuição do apoio familiar e comunitário na velhice, justamente nesta fase da vida em que a assistência deveria ser maior (COITINHO *et al.*, 1991).

2.2. Alterações fisiológicas

As mudanças fisiológicas que interferem no estado nutricional dos idosos são: diminuição do metabolismo basal, redistribuição da massa corporal, alterações no funcionamento digestivo, alterações na percepção sensorial e diminuição da sensibilidade à sede, conforme CAMPOS *et al.* (2000).

2.2.1. Composição corporal

A partir dos 60 anos de idade ocorre uma diminuição progressiva da altura, de maneira que se perde 1 cm ou mais por década. Esta diminuição se dá pelo encurtamento das vértebras, dos discos intervertebrais e da cifose (PALLÀS, 2002; WAITZBERG, 2001). O peso corporal normalmente aumenta até os 40-50 anos, mantém-se estável até os 70 anos, quando começa a diminuir progressivamente (PALLÀS, 2002).

Com o aumento da idade, ocorrem diversas alterações corporais no indivíduo idoso, como mudanças lentas e progressivas na massa magra e na distribuição de gordura corporal (FRISANCHO, 1984). Enquanto o tecido adiposo aumenta por aumentar a gordura visceral e diminuir a subcutânea, a massa muscular diminui em virtude da diminuição da proteína muscular, da sensibilidade à insulina e diminuição dos exercícios físicos (PALLÀS, 2002).

Há diminuição da massa óssea por causa da desmineralização dos ossos, que por sua vez é devida às mudanças do metabolismo ósseo, alterações endócrinas e pela absorção deficiente ou inadequada de cálcio (PALLÀS, 2002).

A água, principal componente da composição corpórea, corresponde a 70% do organismo na criança, a 60% no adulto jovem e a 52% no idoso. A redução verificada na 3ª idade em relação ao adulto refere-se, principalmente, ao conteúdo de água extracelular, ocasionando uma menor capacidade para manter o balanço hídrico, tornando essas pessoas mais suscetíveis à desidratação (CARVALHO FILHO, 1997; PALLÀS, 2002).

2.2.2. Modificações metabólicas

O metabolismo basal diminui cerca de 10 a 20% com o avanço da idade (FRISANCHO, 1984). De acordo com PALLÀS (2002), essa taxa de diminuição ocorre entre os 30 e 75 anos de idade, devido à menor massa muscular.

Estima-se que as necessidades energéticas de pessoas com idade entre 51-75 anos diminuam para 90% da quantidade energética necessária aos 23 anos, e para as pessoas acima de 75 anos, cerca de 75-80% dessa quantidade. É importante ressaltar que essa redução dependerá da atividade física exercida pelo indivíduo (ROLAND, 1991), o que tem como função ativar o metabolismo, particularmente muscular e ósseo.

A absorção dos carboidratos não se altera até idade muito avançada, no entanto a intolerância à lactose se apresenta devido a uma diminuição da atividade da lactase. O metabolismo das proteínas no músculo se torna menos importante no idoso por haver um incremento no fígado e no intestino. De modo geral, o *turnover* protéico encontra-se aumentado em idosos (PALLÀS, 2002).

A fonte de proteína utilizada, também é um interferente no metabolismo protéico de acordo com PANNEMANS *et al.* (1998). Estes autores demonstraram que a ingestão de proteínas de fonte predominantemente vegetal resulta em menor síntese protéica do que a ingestão de proteínas de fontes balanceadas ou de origem predominantemente animal.

ARNAL *et al.* (1999) observaram que o aproveitamento metabólico da proteína por mulheres idosas foi mais eficiente quando oferecida de forma concentrada em uma ou duas refeições, que quando distribuída em quatro refeições diárias.

De modo geral, estudos a respeito do metabolismo protéico ainda são escassos e controversos na velhice, sendo extremamente necessária a realização de novos estudos em diferentes condições (FERRIOLLI *et al.*, 2000).

2.2.3. Modificações no sistema digestivo

As mudanças no sistema gastrointestinal que ocorrem no envelhecimento estão relacionadas à capacidade de digerir e absorver os alimentos, pois há diminuição da acidez gástrica, dos sucos digestivos, do fluxo sangüíneo visceral esplênico, o que se relaciona diretamente com a alimentação (NOVAES, 1997).

Capacidade mastigatória e composição salivar

A capacidade mastigatória sofre alterações nos idosos devido ao aparecimento freqüente de cáries e doenças periodontais; às próteses totais ou parciais inadaptadas ou em péssimo estado de conservação e a ausência de dentes. Esses fatores interferem no comportamento inicial do processo digestivo, favorecendo sua inadequação, tanto no aspecto enzimático como no mecânico (NOGUÉS, 1995).

Os indivíduos com prótese dentária mastigam 75 a 85% menos eficientemente que aqueles com dentição natural, fato que pode levar ao consumo diminuído de carnes, frutas e vegetais frescos, razão pela qual idosos com próteses totais tendem a ingerir alimentos macios, facilmente mastigáveis, pobres em fibras, vitaminas e minerais (NAJAS *et al.*, 1994; CAMPOS *et al.*, 2000).

A xerostomia ou seca da boca é um problema comum na população idosa devido a uma diminuição da secreção salivar. A composição da saliva também se altera, tornando-se viscosa e espessa. Os efeitos principais dessas modificações

revertem-se em dificuldades de lubrificação, mastigação, deglutição e ingestão (PALLÀS, 2002).

Alterações no estômago e no intestino

A atrofia da mucosa gástrica no idoso resulta na menor produção de ácido clorídrico e na redução na secreção do fator intrínseco, promovendo menor absorção de vitamina B₁₂, com conseqüente instalação de anemia perniciosa (NOGUÉS, 1995; CAMPOS *et al.*, 2000).

A digestão pode tornar-se difícil como resultado de uma menor secreção de ácido clorídrico pelas células parietais (CAMPOS *et al.*, 2000).

A hipocloridria afeta a absorção de cálcio e ferro não-heme. O ácido clorídrico mantém tanto o ferro férrico quanto o cálcio solúveis por meio dos seus efeitos acidificantes, para serem absorvidos no trato gastrointestinal. Nos casos em que há baixa produção de ácido clorídrico, a absorção desses nutrientes é diminuída em razão de sua insolubilidade em pH acima de 5,0. Evidências recentes demonstram que apenas a ingestão isolada do cálcio apresenta limitada biodisponibilidade (NOGUÉS, 1995; CAMPOS *et al.*, 2000).

A saciedade na velhice ocorre mais precocemente devido a uma menor distensão do fundo gástrico e uma maior estimulação do antro, ao aumento da secreção de colecistoquinina e outros mecanismos hormonais (testosterona e leptina), conforme PALLÀS (2002).

A diminuição da motilidade, da superfície intestinal útil para a absorção, a capacidade de transporte de nutrientes e a redução do fluxo sangüíneo alteram a capacidade global de digestão e absorção (PALLÀS, 2002). Outro aspecto relacionado com a menor motilidade no intestino grosso e cólon é a ocorrência de certo grau de atrofia na mucosa e do revestimento muscular que resulta na

deficiência de absorção de nutrientes e favorece a instalação de diverticulose. Essas alterações também favorecem o aparecimento de constipação, que é freqüente na geriatria. No entanto, a constipação do idoso pode ainda estar relacionada com a baixa ingestão de líquidos e de fibras, bem como com a baixa realização de exercícios físicos (CAMPOS *et al.*, 2000).

Alterações no fígado

Morfologicamente, verifica-se diminuição do volume e do peso do fígado, correspondente à redução da massa celular hepática funcionante. No entanto, o fígado apresenta grande reserva funcional e essa redução celular não afeta o metabolismo hepático em condições basais (CARVALHO FILHO, 1997).

Por outro lado, tem sido evidenciado que em nível citoplasmático, tem-se registrado mudanças que interferem na biotransformação dos fármacos, na síntese protéica, no metabolismo lipoprotéico e na secreção da bile, como também na redução da tolerância a outros agentes excretados por esse órgão (CAMPOS *et al.*, 2000).

2.2.4. Alterações na percepção sensorial

A visão, a gustação, olfato, audição e tato diminuem com a idade. Essas mudanças sensoriais interferem na palatabilidade dos diferentes alimentos e pode modificar os hábitos alimentares na 3^a idade (NOGUÉS, 1995; CAMPOS *et al.*, 2000; PALLÀS, 2002).

A atrofia das papilas gustativas (processo que inicia ao redor dos 50 anos) produz mudanças na sensibilidade dos sabores doces e salgados, o que leva ao consumo de alimentos fortemente salgados e adocicados (NOGUÉS, 1995;

PALLÀS, 2002). Já RUSSEL (1992) relata que além da redução do sabor doce e do salgado, também há diminuição do amargo e do ácido, o que acarreta um decréscimo do limiar de detecção e identificação do “flavor” em consequência do envelhecimento.

As condições patológicas e de origem nutricional que promovem alterações na percepção do gosto de acordo com SCHIFFMAN (1993) são: câncer, doenças renais crônicas, doenças hepáticas (inclusive cirrose), deficiência de niacina, queimaduras e deficiência de zinco.

Outro fator que exerce importante função na sensibilidade aos sabores é o sentido olfativo. Os quimiorreceptores olfativos, localizados na parte interna do nariz, são responsáveis pela sensação de percepção do estímulo causado por substâncias voláteis. Embora alguns autores relatem a diminuição da audição em idosos, RUSSEL (1992) destaca que ainda existem poucos relatos associados às alterações decorrentes na geriatria.

A perda de sensibilidade dos sentidos do gosto e olfato é importante na vida do idoso, pois esses sentidos controlam em grande parte funções metabólicas relacionadas à alimentação. Essas perdas podem alterar a escolha e ingestão de alimentos e, conseqüentemente, exacerbar estados de doença, prejudicando o estado nutricional e a imunidade e promovendo perdas de peso do indivíduo (CORWIN *et al.*, 1995).

2.2.5. Efeitos secundários dos fármacos

Devido às modificações que ocorrem no organismo com o envelhecimento, os idosos acabam usando medicamentos, sob prescrição ou através da automedicação, que têm efeitos adversos no estado nutricional, seja pelo efeito das drogas sobre o alimento ou vice-versa. É importante levar em consideração a

questão dos medicamentos na alimentação da 3ª idade, uma vez que seu efeito pode ocorrer em nível de ingestão, absorção, metabolismo ou excreção dos alimentos (NOVAES, 1997).

Os principais medicamentos utilizados em geriatria e os seus efeitos metabólicos adversos mais freqüentes conforme CAMPOS *et al.* (2000) são:

- tranqüilizantes e psicofármacos: favorecem o relaxamento e diminuem a absorção intestinal;

- diuréticos e laxantes: promovem desidratação e depleção de eletrólitos como magnésio, potássio e zinco;

- antibióticos: alteram a absorção intestinal por destruição da microbiota. Desencadeiam má absorção de carboidratos, vitamina B₁₂, cálcio, ferro, magnésio e cobre e inibem a síntese protéica;

- glicocorticóides: predispõem à gastrite, osteoporose e hiperglicemia;

- analgésicos: favorecem o desenvolvimento de gastrites e úlceras.

A polifarmácia em idosos aumenta a incidência de efeitos colaterais e interações medicamentosas e o seu uso inadequado, freqüentemente, provoca sérias complicações.

VERAS (1994) estudou a situação de idosos residentes no Rio de Janeiro e encontrou que 80,19% dos entrevistados faziam uso regular de medicamentos de prescrição médica.

Um outro estudo realizado por TEIXEIRA e LEFÈVRE (2001), veio confirmar que pacientes idosos são beneficiários da farmacoterapia moderna. Mais de 80% tomam no mínimo um medicamento diariamente e o consumo médio de medicamentos por idoso foi de 3,6.

2.2.6. Alterações do sistema imunológico

Além das alterações morfo-fisiológicas normais do envelhecimento, o desenvolvimento de doenças infecciosas, crônicas e neuro-degenerativas e doenças cardiovasculares tem sido relacionadas também ao declínio da resposta imune em idosos.

As modificações do sistema imunológico nesses indivíduos estão associadas principalmente à imunidade mediada por células (células T) e de forma menos acentuada à resposta humoral (células B). Essa disfunção imune relacionada à idade pode ser particularmente prevenida ou retardada por intervenção dietética conforme HIGH (1999). Outro fator, apontado por KRAUSE *et al.* (1999), associado ao declínio da imunidade é a desnutrição e a deficiência energética e protéica, já LESOURD (1997) e CHANDRA (1997) sugerem a inadequação de alguns elementos traços e vitaminas como responsáveis pela desregulação imunológica.

Além disso, tem sido observado que, na população idosa, a suplementação com alguns micronutrientes (β -caroteno, vitaminas E, B₆ e C, Zn, Se) melhora alguns aspectos da função imune, como o teste de hipersensibilidade (DTH), resposta proliferativa linfocitária e função das células NK (Natural Killer), aumento na produção de IL-2 e resposta humoral após vacinação, KEMP *et al.* (2002); GIRODON *et al.* (1999) e RAVAGLIA *et al.* (2000).

Mais recentemente, o estudo da nutrição e a imunidade foram além da ligação básica do status nutritivo adequado e da função imune apropriada. Os pesquisadores começaram a estudar os efeitos da função imune realçando o potencial de nutrientes específicos, tais como Zn, Se, Fe, vitamina A, C, E, B₆ e ácido fólico (CHANDRA, 1997; REINHARD, 2004).

Conforme BELL e HIGH (1997) vitaminas que desempenham um papel importante na imunidade no envelhecimento incluem as vitaminas A, C, D, E, B₆ e B₁₂. Minerais incluem o zinco, ferro, selênio e cobre.

Outra questão a ser considerada é a alta produção de auto-anticorpos que tem sido associada à menor resistência dessa população contra doenças infecciosas. A eficácia da imunização de idosos é significativamente menor quando comparada a de adultos jovens, o que é visualizado pelo menor número de anticorpos produzidos por idosos após imunização (WEKSLER e GOODHARDT, 2002).

3. ALIMENTOS E INGREDIENTES FUNCIONAIS

Atualmente, a preocupação com a alimentação e a saúde, bem como suas interações, tem aumentado em nossa sociedade. O consumidor tem mostrado preferência cada vez maior por alimentos que possam trazer algum benefício adicional em relação ao produto tradicionalmente comercializado. Desta forma, um grande número de alimentos transformados surgiu no mercado, através da indústria de alimentos (BELLO, 1995). A União Européia (UE), em 1996, desenvolveu um número considerável de novos produtos, incluindo 447 novos produtos panificados, 914 novas bebidas, e 338 novos sorvetes e sobremesas (KATZ, 1999).

Estes alimentos, comumente chamados alimentos funcionais, podem ser diferenciados dos demais, conforme definição da American Dietetic Association (ADA, 1999), por possuírem concentração de um ou mais ingredientes naturais, manipulados ou modificados para incrementar seu efeito benéfico à saúde.

Segundo ROBERFROID (1999), para um alimento vir a ser funcional, esse deve ter a concentração aumentada (fortificação) em algum (ns) componente (s) que tenha (m) efeito de melhoria, naturalmente presente (s); eliminado componente (s) indesejável (is); adicionado algum (ns) componente (s) de interesse; substituído componente (s) usualmente presente (s) e aumento da biodisponibilidade ou estabilidade de um componente para produzir efeito funcional ou reduzir risco de doença.

Para NEUMANN *et al.* (2000), alimento funcional é todo alimento ou constituintes de alimentos e bebidas que ofereçam efeito saudável, além de seu valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel vantajoso na prevenção e tratamento de doenças.

O mercado mundial de alimentos funcionais foi estimado em \$47,6 bilhões em 2001, obtendo um crescimento significativo quando comparado aos quase \$30,0 bilhões obtidos em 1995 (NBJ, 2003). Os Estados Unidos possuem o maior mercado nesse segmento, com um aumento de 8,5% em 2001, uma estimativa de crescimento de 7,5% para 2005 e em torno de 4,6% para 2010. Os produtos líderes nessas estimativas são as bebidas, seguidas pelos panificados e grãos (SLOAN, 2002). Da mesma forma, na UE novas bebidas funcionais foram introduzidas no mercado em maior quantidade do que qualquer outra categoria. (KATZ, 1999). Já no Japão, o mercado de bebidas funcionais está estabilizado, como resultado do interesse e incentivo do governo federal movido nas décadas de 80 e 90 (HOLLINGSWORTH, 1997).

A prática de alimentar-se saudavelmente é uma tendência atual, como demonstrado em uma pesquisa que revelou que 86% das pessoas compram alimentos porque eles contêm ingredientes nutricionais desejáveis, 80% porque eles não contêm ingredientes indesejáveis, e 76% escolhem alimentos fortificados com substâncias nutricionais específicas (HEALTH FOCUS *apud* Sloan, 2002).

Estudos têm demonstrado que probióticos, além de lipídios, peptídios e proteínas do leite e outros compostos possuem funcionalidade fisiológica. Outras substâncias apresentam potencial para pesquisas, como oligossacarídeos, esfingolipídios, ácido linoléico conjugado, concentrado de proteína do soro, imunoglobulinas, α -lactalbumina, lactoferrina, lactoperoxidase e um número de peptídios derivados das proteínas do leite (PSZCZOLA, 2001).

Já para GIESE (1995), os ingredientes alimentares funcionais mais freqüentemente usados no desenvolvimento de produtos são as fibras dietéticas, oligossacarídeos, ácido láctico, proteínas, minerais, vitaminas, fitoquímicos e antioxidantes.

3.1 Proteínas

Dentre os alimentos e ingredientes funcionais conhecidos atualmente, as proteínas constituem um grupo importante na formulação de alimentos e bebidas. Neste trabalho duas fontes protéicas de grande interesse tanto na área industrial de alimentos como nas áreas médica, farmacêutica e cosmética foram utilizadas: proteínas do soro de leite bovino, em sua forma de isolado de proteína do soro (WPI, do inglês *Whey Protein Isolate*) e do colágeno de origem bovina em sua forma hidrolisada.

3.1.1. Proteínas do soro de leite bovino

As proteínas do soro de leite vêm sendo usadas freqüentemente devido ao seu alto valor nutritivo e pelo constante incentivo da indústria de laticínios que visa o aproveitamento destas proteínas, uma vez que estas constituem um subproduto de seu processo produtivo. É importante destacar que as mesmas possuem um

excedente de aminoácidos essenciais como lisina, treonina, metionina e isoleucina (SLOAN, 2002).

A alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada, particularmente leucina e isoleucina, está relacionada com o aumento do tecido muscular e com a regeneração tecidual em traumas múltiplos (SGARBIERI *et al.*, 2000).

As proteínas do leite e do soro são completas e de qualidade excepcional. Elas contêm em quantidades variáveis e na proporção correta todos os aminoácidos que o organismo humano necessita. As proteínas do soro se destacam também pela excelente digestibilidade e por serem completamente biodisponíveis.

De acordo com EIGEL *et al.* (1984), as proteínas do soro são universalmente definidas como as proteínas que permanecem na fração líquida do leite após a coagulação da caseína em pH 4,6 a 20 °C e, conforme FOEGEDING *et al.* (2002) o soro fluido remanescente contém aproximadamente 0,6% de proteína e 93% de água. Quantitativamente, as principais proteínas do soro representam em torno de 20% do total de proteínas do leite bovino e, consistem basicamente, de β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina do soro bovino e imunoglobulinas (IMAFIDON *et al.*, 1997; MLEKO e GUSTAW, 2002). Também possui glicomacropéptidos e fatores de crescimento que podem afetar o sistema imune (MERCIER *et al.*, 2004).

A indústria tem dispendido grande esforço no decorrer dos últimos 30 anos para desenvolver processos em escala comercial para a produção de concentrados de proteína do soro (WPC) e isolado de proteína do soro (WPI), altamente funcionais, adequados para o uso em alimentos e ingredientes alimentares. A diferença entre ambos está na composição, sendo que o WPI contém uma maior concentração de proteínas ($\geq 90\%$) e, proporcionalmente, menor concentração de lactose e minerais que o WPC, o qual contém entre 50 a

80% de proteínas (MORR e HA, 1993) ou conforme FOEGEDING *et al.* (2002), entre 25 a 80%. A composição protéica do WPC e do WPI pode ser melhor avaliada através da Tabela 1.1.

Estudos demonstram que o WPI e o WPC apresentam como propriedades nutricionais e tecnológicas um excelente conteúdo de aminoácidos essenciais, elevada digestibilidade, boa solubilidade, capacidade emulsificante, geleificante e de retenção de água, adequada viscosidade e adesividade, além da habilidade de formação de espuma (HUFFMAN, 1996).

Cabe ressaltar, que as proteínas do soro de leite apresentam além das propriedades acima descritas, relevantes propriedades fisiológicas. Essas propriedades podem influenciar o metabolismo e o sistema imunológico, proporcionando ao indivíduo maior eficiência metabólica, condições adequadas para uma vida mais saudável, aumento na longevidade e prevenção de doenças, sendo assim, de grande interesse sua utilização pela população idosa (SGARBIERI, 2004).

TABELA 1.1. Composição protéica do WPC e do WPI comerciais (%).

Proteínas	WPC ^a	WPI ^b
Imunoglobulinas	3,8 – 15,4	5,9 – 7,5
Albumina do soro bovino	5,8 – 19,6	7,2 – 10,9
β -lactoglobulina	40,4 – 76,9	67,6 – 74,8
α -lactalbumina	14,5 – 24,8	8,3 – 17,5

^a N = 8; ^b N = 3

Adaptado de MORR e FOEGEDING (1990).

Propriedades fisiológicas das proteínas do soro de leite bovino

Atividade anticancerígena

As teorias para explicar a origem do câncer levam em consideração fatores multifatoriais incluindo fatores genéticos e ambientais, dentre os quais a alimentação desempenha papel preponderante (SGARBIERI, 1999). Adicionalmente, sugeriu-se que exista forte correlação entre os mecanismos associados ao envelhecimento e ao aparecimento do câncer, uma vez que a incidência de câncer em seres humanos e em animais aumenta, consideravelmente, com a idade. Além disso, as teorias do envelhecimento baseiam-se na existência de um acúmulo de lesões, assim como a teoria dos radicais livres e outras que explicam a origem de certos tumores. Outros atribuem o aumento na incidência de câncer associado à idade ao maior tempo de exposição aos agentes promotores da doença ao longo do tempo (RICHIE, 1992; BOUNOUS, 1997).

BOUNOUS (2000) discute o papel do concentrado de proteínas do soro de leite bovino (WPC) no tratamento de câncer através do seu potencial antitumoral. Conforme esse autor, os aminoácidos precursores da glutathiona (seu estímulo é o mecanismo primário na modulação do sistema imune) disponíveis no soro de leite podem em 1º lugar aumentar a concentração de glutathiona em tecidos relevantes, em 2º estimular o sistema imune e em 3º desintoxicar carcinógenos potenciais.

Um estudo, utilizando um sistema modelo com ratos, investigou a capacidade de várias fontes protéicas dietéticas comuns (proteínas do soro de leite bovino, caseína, carne e soja) no retardamento ou inibição do desenvolvimento de câncer de cólon. Os animais receberam injeções subcutâneas do carcinógeno dimetilhidrazina. Os resultados demonstraram que as proteínas do soro de leite bovino retardaram significativamente o desenvolvimento de câncer de cólon quando comparadas com as demais proteínas testadas. Somente 30% dos

animais desse grupo desenvolveram tumores, comparado com 55% nos animais que receberam dieta com proteínas da carne e 60% nos que receberam proteína de soja (REGESTER *et al.*, 1996). Já DIAS (2004) comprovou a capacidade do WPC em inibir o desenvolvimento de câncer de cólon induzido por azoximetano, em ratos.

Outro estudo *in vitro* demonstrou que o isolado de proteínas do soro de leite bovino (WPI), quando comparado com a caseína, aumentou a síntese de glutathione e protegeu as células da próstata em humanos contra oxidantes que induzem a morte celular (MARSHALL, 2004). Esse mesmo autor descreve outro trabalho em que a albumina do soro bovino inibiu o crescimento de células cancerígenas de mama humana *in vitro*.

Aspectos imuno estimulatórios

De acordo BRINK (1996), as proteínas do soro de leite são capazes de elevar os níveis de glutathione celular, sendo a glutathione um tripeptídeo composto por cisteína, ácido glutâmico e glicina, atuando como um potente agente antioxidante e desintoxicante.

Essas proteínas parecem proteger o organismo através de dois mecanismos gerais principais: 1) modulação da resposta imunitária, aparentemente através do aumento da concentração de glutathione nos tecidos; 2) promover a metilação do DNA através do metabolismo do dipeptídeo cisteína-metionina (MCINTOSH *et al.*, 1998).

Estudos realizados por SGARBIERI *et al.* (2000) e DIAS (2004) demonstraram a propriedade do WPC e seus hidrolisados enzimáticos de estimularem a síntese de glutathione em vários órgãos de ratos e camundongos,

bem como, estimularem a produção de anticorpos (IgM) em camundongos após desafio com hemácias de carneiro (SRBC).

Pesquisadores avaliaram os efeitos de diferentes fontes protéicas dietéticas (caseína, proteínas da soja e isolado protéico do soro de leite-WPI) na modulação do colesterol oxidado, observando as mudanças no metabolismo dos lipídios e na função imune em ratos jovens (4 semanas) e ratos adultos (8 meses). Os autores concluíram que o WPI pode amenizar alterações na função imune ocasionados pela oxidação do colesterol em ambas as idades estudadas (MINEHIRA *et al.*, 2000).

As proteínas do soro do leite em sua forma de concentrado (WPC) ou de hidrolisado demonstraram possuir um maior efeito estimulatório do sistema imune que a caseína. Uma alta correlação foi verificada entre a resposta de estímulo do sistema imune de células do baço e o conteúdo de glutathione no tecido hepático. O WPC apresenta uma série de propriedades fisiológicas relacionadas ao estímulo do sistema imune, as quais podem ser benéficas para pessoas com síndromes de deficiência imune, doenças infecciosas, doenças neurodegenerativas e em idade avançada (SGARBIERI *et al.*, 2000).

A diminuição dos níveis de glutathione está associada com a diminuição da resposta imune. A glutathione intracelular está diretamente relacionada à habilidade dos linfócitos em responder a estímulos imunogênicos em animais. A resposta imune humoral, envolvida na produção de anticorpos, requer rápida síntese de proteínas que, por sua vez, requer uma adequada ingestão dietética de aminoácidos essenciais encontrados em proteínas como as do soro de leite (BOUNOUS; GOLD, 1991).

Saúde cardiovascular

Um crescente conjunto de evidências científicas revelam que as proteínas do soro do leite bovino contêm vários componentes bioativos que podem ter efeitos positivos para a saúde cardiovascular. Certos peptídeos bioativos podem proteger contra a hipertensão através da inibição da enzima conversora de angiotensina (ACE) e de peptídios com atividade opióide. Os peptídios bioativos do soro do leite bovino também podem estar envolvidos na inibição da agregação plaquetária e na diminuição dos níveis de colesterol. Outros componentes do soro de leite como cálcio, magnésio, zinco, vitaminas do complexo B e certas frações de lipídios podem ajudar na redução do risco de doenças cardíacas (GERDES e HARPER, 2003).

Vários estudos realizados com ratos hipertensos demonstraram que as proteínas do leite podem reduzir significativamente a pressão sangüínea. Por outro lado, um número limitado de estudos em humanos tem associado os peptídeos derivados das proteínas do soro do leite bovino com efeitos hipotensores (diminuição da pressão sistólica e diastólica) com significância estatística (FITZGERALD, MURRAY e WALSH, 2004).

Pesquisas têm encontrado que a ingestão de leite e seus derivados diminuem a pressão arterial e reduzem o risco de hipertensão. Um estudo, em particular, foi realizado com um grupo de 20 homens adultos saudáveis para investigar o efeito da suplementação de leite fermentado (*Lactobacillus casei* e *Streptococcus thermophilus*) com adição de WPC, nas taxas de lipídios e na pressão arterial. Depois de 8 semanas, o grupo que recebeu diariamente 200 mL de leite fermentado com uma adição de WPC teve aumento significativo dos níveis de HDL e diminuição dos triglicerídeos e da pressão sangüínea sistólica, o que não foi verificado no grupo placebo KAWAS et al. (2000).

Os efeitos das proteínas do soro de leite e da caseína nos níveis séricos e hepáticos de lipídios em ratos foram estudados por NAGAOKA, KANAMARU e KUZUIA (1991) e por JACOBUCCI *et al.* (2001). Os autores verificaram que as proteínas do soro apresentaram efeito hipocolesterolêmico, comparadas à caseína. Essa maior redução nos níveis de colesterol promovida pelas proteínas do soro de leite, foi atribuída, principalmente, à diminuição do LDL-colesterol.

BARTFAY *et al.* (2003) realizaram um trabalho com camundongos e constataram que o grupo de animais que recebeu ferro com suplementação de proteínas do soro de leite teve significativamente maiores níveis cardíacos de atividade de glutathione peroxidase e glutathione em comparação ao grupo de camundongos que foi tratado apenas com ferro. Os autores ressaltam que pesquisas adicionais são necessárias para verificar os exatos mecanismos através dos quais as proteínas do soro de leite protegem o coração.

Ajuda na sarcopenia

A sarcopenia é definida na literatura como a redução involuntária da massa muscular esquelética e da força muscular, bem como, da queda de resistência que ocorre com o envelhecimento, sendo considerada uma das maiores causas da incapacidade, fragilidade e perda da independência dos idosos (DORRENS e RENNIE, 2003; LAURETANI *et al.*, 2003; NICOLAS *et al.*, 2001; ROLLAND *et al.*, 2003). Adicionalmente, a sarcopenia também pode aumentar o risco de quedas nessa população (NICOLAS *et al.*, 2001).

Pessoas entre 70-80 anos de ambos os sexos experimentam um decréscimo de 20-40% na força muscular. Já para os indivíduos de 90 anos ou mais esse decréscimo na força pode chegar a 50% ou mais (DOHERTY, 2003).

Em um experimento com 833 idosos do sexo masculino e feminino realizado no Novo México, uma prevalência de sarcopenia de 13-24% foi verificada em pessoas com menos de 70 anos de idade e de 43-60% naquelas pessoas acima de 80 anos (BAUMGARTNER et al., 1998).

A etiologia da sarcopenia é composta por muitos fatores, dentre os quais um declínio na síntese protéica, inadequada nutrição (diminuição na ingestão de proteínas e no total calórico), inatividade física, alterações hormonais e mediadores inflamatórios (DOHERTY, 2003; DORRENS e RENNIE, 2003).

MILLWARD et al. (1997) compararam a utilização protéica pós-prandial em indivíduos jovens e idosos e verificaram que não houve diferença no efeito geral na utilização de proteínas relacionado com a idade. No entanto, estudos recentes com idosos sugerem que as proteínas do soro de leite bovino estimulam a síntese protéica pós-prandial e limitam a perda de proteínas corporais de forma mais efetiva que a caseína (DANGIN et al., 2002).

Em outro estudo foram avaliadas duas diferentes fontes protéicas (proteínas do soro de leite e caseína) em relação a sua velocidade de digestão e conseqüente síntese de proteínas em homens idosos e jovens. Os autores concluíram que durante o processo de envelhecimento, o ganho protéico foi maior com as proteínas do soro de leite (rápida digestão) do que com a caseína (lenta digestão) e sugerem que as proteínas do soro seriam mais benéficas que as caseínas para limitar a perda protéica durante o envelhecimento (DANGIN et al., 2003).

Os efeitos positivos da atividade física e da proteína dietética sobre a sarcopenia são acumulativos. Os aminoácidos essenciais parecem ser o determinante primário do efeito estimulatório da proteína dietética sobre a síntese protéica muscular em idosos (VOLPI et al., 2003). WOLFE (2002) relata que a ingestão de aminoácidos não essenciais não é necessária para estimular essa

síntese. De acordo com KREIDER (2004) depois da atividade física, a ingestão de 3-6 gramas de aminoácidos essenciais ou 10-20 gramas de proteína do soro de leite bovino podem melhorar a síntese protéica em indivíduos jovens e idosos.

Saúde óssea

Com o avançar da idade ocorrem perdas na massa óssea dos indivíduos. Os fatores que favorecem essa alteração são: diminuição da ingestão e da absorção intestinal de cálcio (CURIATI e ALENCAR, 1994; PALLÁS, 2004; PICO, 1989; RUSSELL, 2000), diminuição da ingestão e da síntese de vitamina D (CURIATI e ALENCAR, 1994; PALLÁS, 2004; PICO, 1989) devido o decréscimo no número de receptores da vitamina D na mucosa intestinal e da menor exposição dos idosos a luz solar (RUSSELL, 2000), desnutrição protéico-energética, diminuição da atividade física e déficit de estrógenos na menopausa (PICO, 1989).

BELL e WHITING (2002) verificaram que o aumento na ingestão de proteínas reduziu a perda mineral dos ossos e o risco de fraturas em mulheres idosas. Embora a alta ingestão protéica leve a uma maior excreção urinária de cálcio, estudos realizados com adultos saudáveis indicaram que o aumento na ingestão de proteínas de 0,7 a 2,1g/Kg foi acompanhado por um significativo aumento na absorção intestinal desse mineral (KERSTETTER, O'BRIEN e INSOGNA, 2003).

O leite tem sido proposto como um alimento nutricional que ajuda na prevenção de osteoporose devido seu conteúdo de cálcio biodisponível (MARSHALL, 2004). Lembrando-se que o cálcio é freqüentemente recomendado para ajudar na manutenção da massa óssea e que as proteínas do soro de leite bovino suprem em torno de 500-800 mg de cálcio por 100 g de proteína (KREIDER, 2004).

Em estudos inicialmente *in vitro* e depois com animais verificaram-se que as proteínas básicas do leite (lactoferrina, lactoperoxidase e outras em menor concentração), componentes das proteínas do soro de leite possuem capacidade de estimular a proliferação e a diferenciação de células osteoblásticas, bem como reprimir a reabsorção óssea (TOBA, TAKADA, YAMAMURA *et al.*, 2000).

Longevidade

Um estudo verificou a influência de diferentes concentrações (10, 20 e 30%) de proteína do soro e do uso de dietas comerciais na longevidade em hamsters adultos e filhotes. Os animais alimentados com proteína do soro viveram significativamente mais tempo do que os animais que receberam dieta comercial. Os animais do grupo que recebeu dieta comercial chegaram a 88 semanas de idade, por outro lado àqueles que receberam proteínas do soro viveram 140 semanas, representando aumento na longevidade de 60%. Enquanto nenhum animal em dieta comercial chegou a dois anos de vida, os animais alimentados com a proteína do soro chegaram a viver quase três anos, superando a expectativa de vida de hamsters e sugerindo um efeito positivo contra o envelhecimento (BIRT; BAKER; HRUZA, 1982).

3.1.2. Hidrolisado de colágeno bovino

Outro ingrediente alimentar empregado na formulação de vários alimentos é a gelatina e os seus derivados. De acordo com ADLER-NISSEN (1985), o uso da gelatina na indústria de alimentos como agente clarificante, estabilizante e como revestimento é realizado há muito tempo, principalmente em sobremesas, doces, produtos panificados, sorvetes e produtos lácteos.

Atualmente, a elucidação das propriedades funcionais do colágeno hidrolisado em vários modelos alimentares e a busca por novas funcionalidades através de modificações físicas, químicas e biológicas possibilitam sua ampla utilização como fonte protéica. Sua molécula conter 18 aminoácidos, destacando-se a glicina, alanina, prolina e hidroxiprolina, porém o aminoácido essencial triptofano está completamente ausente no colágeno hidrolisado, fazendo com que o mesmo não possa suprir o requerimento completo de aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas teciduais. Entretanto, o colágeno hidrolisado possui algumas funções biológicas benéficas, o que justifica seu uso em alimentos, segundo DJAGNY *et al.* (2001).

O valor nutricional da gelatina, bem como, do colágeno hidrolisado só é estabelecido quando consumido em combinação com outra proteína ou misturas de proteínas, usados com a finalidade de suplemento protéico, aumentando seu valor nutritivo.

Conforme DJAGNY *et al.* (2001), a gelatina é uma proteína solúvel em água de alto interesse econômico e valor biológico, possuindo a capacidade de formar géis transparentes sob condições específicas. Geralmente obtida por aquecimento em pH alcalino ou ácido e pela hidrólise parcial do colágeno, apresenta estrutura variável com diferentes propriedades físicas e químicas devido às diferentes fontes de colágeno e técnicas de preparação. Segundo GIESE (1994) dois tipos de gelatina são produzidos, denominados tipo A e tipo B, o primeiro é produzido por processamento ácido do material bruto de colágeno, possuindo ponto isoelétrico entre pH 7 e 9, já o segundo, é processado por tratamento alcalino, possuindo ponto isoelétrico entre pH 4,8 e 5,2.

Sua composição é de 85-90% de proteína, aproximadamente 2% de sais minerais e água. Já a forma hidrolisada (colágeno hidrolisado) contém em torno de 95% de proteína pura (KRANS e SCHWARZ, 2001).

A introdução de hidrolisados protéicos em alimentos iniciou há muito tempo, obtendo-se o primeiro hidrolisado enzimático protéico produzido comercialmente em 1914, porém em uma aplicação não relacionada com alimentos. As proteínas utilizadas mais comumente em produtos contêm hidrolisados de caseína, proteína do soro de leite e proteína de soja. Outras fontes têm sido usadas, incluindo gelatina, arroz, batata, peixe e albumina do ovo (LAHL e BRAUN, 1994). Somente com COOPERMAN e JOHNSON *apud* Djagny *et al.* (2001) em 1973, é que hidrolisados de gelatina foram produzidos para utilização em shampoo e cuidados com os cabelos. Entretanto, quando seu perfil nutricional foi plenamente entendido, os hidrolisados de gelatina passaram a ser usados na área de alimentos. Por outro lado, os hidrolisados produzidos a partir de caseína ou de proteínas do soro têm sido obtidos há várias décadas devido ao seu notável valor nutricional, composição de aminoácidos, disponibilidade em larga quantidade e custo moderado (CLEMENTE, 2000).

Reconhecido por conter vários aminoácidos essenciais, o hidrolisado enzimático de gelatina foi inicialmente combinado com hidrolisado de caseína, com o objetivo de produzir uma bebida nutricionalmente adequada, sendo posteriormente utilizado em dietas de emagrecimento. Também foi demonstrado por DJAGNY *et al.* (2001), que esses hidrolisados contêm quantidades consideráveis de alguns aminoácidos, mostrando grande potencial para aplicação como ingredientes alimentares. DJAGNY *et al.* (2001) relataram que frações de gelatina contêm tirosina, histidina, metionina e ainda boa concentração de ferro e cálcio. Desta forma, o hidrolisado de gelatina altamente purificado é administrado com alguns produtos para compensar a deficiência durante o crescimento infantil e do adolescente, na gravidez e na lactação ou no tratamento da deficiência de cálcio associada com osteoporose em idosos.

Propriedades fisiológicas do hidrolisado de colágeno

A ingestão de gelatina, principalmente em sua forma hidrolisada, produz como efeitos benéficos ao organismo o fortalecimento e estímulo do crescimento de unhas, cabelos e pele, tornando-os mais saudáveis (BRODIE, 1984; MORGANTI, 1990), bem como, o fortalecimento da estrutura óssea contribuindo para o tratamento da artrose e da osteoporose, conforme KRANS e SCHWARS (2001); MOSKOWITZ (2000); DJAGNY *et al.* (2001), entre outros benefícios.

Digestibilidade

A gelatina e sua forma hidrolisada apresentam excelente digestibilidade. Ao contrário do que se pensava, que a gelatina e seus derivados eram completamente digeridos pelo trato gastrointestinal antes da absorção, hoje sabe-se que os mesmos passam pela parede intestinal antes de serem totalmente hidrolisados, sendo incorporados e armazenados pela cartilagem (KRANS e SCHWARZ, 2001). Essa propriedade aumenta muito a biossíntese e a restauração do colágeno e dos proteoglicanos no tecido conjuntivo da matriz extracelular.

Saúde dos cabelos, pele e unhas

Foi comprovado que o consumo de gelatina e do colágeno hidrolisado regularmente aumentam o diâmetro do fio de cabelo e também a sua densidade, colaborando para que a pele se torne mais lisa e elástica contribuindo, também para que unhas frágeis fiquem mais resistentes e até mesmo ajudam a amenizar algumas doenças, como eczema de unha (BRODIE, 1984; MORGANTI, 1990; KRANS e SCHWARZ, 2001).

Proteção e elemento estrutural para ossos e articulações

Foram realizados diversos estudos na Alemanha para investigar o efeito do colágeno hidrolisado em diversos grupos de pacientes, como atletas, idosos com problemas nas articulações e pacientes que freqüentavam consultórios de medicina esportiva. Os pacientes receberam 10g de colágeno hidrolisado por dia ou um preparado placebo, por um período de seis meses. Foi concluído que os pacientes tratados com colágeno hidrolisado sentiram bem menos dor e experimentaram uma melhora da mobilidade das articulações (KRANS e SCHWARZ, 2001).

Um estudo com quase 400 pacientes com artrose de joelho de 20 hospitais nos EUA, no Reino Unido e na Alemanha foi realizado da seguinte forma: metade dos pacientes foi tratada com colágeno hidrolisado e a outra metade com placebo, durante um período de seis meses. Na Alemanha, 93% dos pacientes concluíram o tratamento. Após apenas dois meses de tratamento, os pacientes do grupo do colágeno hidrolisado sentiram, consideravelmente, menos dor e demonstraram melhora da mobilidade (MOSKOWITZ, 2000).

Durante três anos, 92 mulheres participaram de uma pesquisa, na qual metade recebeu um preparado de cálcio e a outra metade colágeno hidrolisado. O grupo do colágeno não recebeu outros medicamentos. Os resultados foram considerados inesperados pelo autor: a concentração das substâncias indicadoras da degradação do colágeno e dos ossos foi mais baixa no grupo que recebeu colágeno hidrolisado. Isso quer dizer que o mesmo atua mais efetivamente contra a degradação da cartilagem óssea do que o cálcio. Outra questão surpreendente foi o fato de que o colágeno hidrolisado reduziu em muito o índice de fraturas ósseas (KRANS e SCHWARZ, 2001).

Através dos resultados desses estudos pode-se concluir que o colágeno hidrolisado é uma substância excelente para o tratamento de artrose e de osteoporose (KRANS e SCHWARZ, 2001).

Antitumoral

Um trabalho recente realizado por ITO *et al.* (2002) demonstrou que certas preparações de colágeno apresentaram efeito antitumoral “in vitro”, inibindo o crescimento e a proliferação de células cancerígenas (apoptose).

3.2. Prebióticos

Conforme sua classificação, os frutooligossacarídeos (FOS) e a inulina são considerados:

I) alimentos funcionais, uma vez que, produzem efeitos metabólicos e fisiológicos importantes para o organismo, quando ingeridos regularmente na dieta usual (LIU, 2003; ARABBI, 2001).

II) alimentos prebióticos, por não sofrerem hidrólise ou absorção no intestino delgado; atingindo o cólon, são metabolizados promovendo uma microbiota bacteriana saudável (GIBSON e ROBERFROID, 1995; ROBERFROID, VAN LOO e GIBSON, 1998).

III) fibras alimentares solúveis (BORGES, 1997).

A inulina e os frutooligossacarídeos ou oligofrutose são ingredientes, presentes, naturalmente, em determinados alimentos. São oligossacarídeos resistentes, ou seja, carboidratos complexos de configuração molecular que os torna resistentes à ação hidrolítica da enzima salivar e intestinal e, assim, atingem o cólon, onde são degradados por bactérias intestinais, principalmente as

bifidobactérias, podendo exercer efeitos benéficos no hospedeiro (BORGES, 1997; TOMOMATSU, 1994).

A inulina é obtida através de extração da raiz da chicória ou produzida industrialmente a partir da sacarose e pode ser hidrolisada, dando origem aos FOS. Estes por sua vez, além de serem originados pela hidrólise enzimática (inulinase) parcial da própria inulina (KRUGER *et al.*, 2003), podem ser obtidos industrialmente, sendo sintetizados a partir da sacarose, por ação da frutossiltransferase ou β -frutofuranosidase (BORGES, 2000).

O uso dos FOS na saúde e nutrição se dá em diversas áreas. Experimentos têm ressaltado seu uso como um agente bifidogênico, estimulador do sistema imunológico, reguladores do trato gastrointestinal, melhorador do metabolismo lipídico, redutor da incidência de câncer de cólon, redutor da síntese de triglicerídeos, dentre outros (KAUR e GUPTA, 2002).

Como agentes bifidogênicos, os FOS são facilmente fermentados pelas bactérias intestinais encontradas no cólon, aumentando o número e a atividade destas, principalmente das bifidobactérias. Este processo é altamente seletivo para oligofrutoses com ligações osídicas β 1-2 (ROBERFROID, GIBSON e DELZENNE, 1993).

As reações ocorridas durante a fermentação são de tal intensidade que o valor do pH é reduzido facilmente a partir de 7,0-7,5 para 6,0-6,5, estando esse fator associado à melhora na absorção de íons positivos e, a temperatura pode aumentar em até 0,7°C (MÁRQUEZ, 1999).

Estudos laboratoriais demonstraram que a absorção de minerais como cálcio, magnésio e fósforo aumenta após a ingestão de FOS, e que ocorre redução significativa de processos inflamatórios decorrentes da deficiência de magnésio (PASSOS e PARK, 2003).

TAGUCHI *et al.* (1995) demonstraram que uma pequena adição de frutooligosacarídeos (cerca de 2,5 à 5%) na dieta de ratas ovariectomizadas, que são um modelo bem aceito de mulheres na fase pós-menopausa, impediram a perda óssea. SCHOLZ-AHRENS e SCHREZENMEIR (2002), acrescentam que comparado à inulina, a oligofrutose estimula a absorção de cálcio de uma forma sensivelmente mais efetiva. KRUGER *et al.* (2003) mostraram ainda que os FOS com diferentes graus de polimerização tem diferentes efeitos na absorção e retenção de cálcio, na densidade óssea e na excreção de colágeno.

Em outro estudo realizado com ratas ovariectomizadas, avaliou-se a biopotência dos FOS, bem como, da terapia de reposição hormonal (TRH) no metabolismo do cálcio desses animais. Verificou-se que a administração conjunta de FOS e da TRH foi mais eficaz na deposição de cálcio e na recuperação da estrutura óssea das ratas castradas quando comparados aos mesmos tratamentos administrados isoladamente (NETTO, 2005).

Os FOS e a inulina também apresentam um papel importante na prevenção da diarreia e da constipação conforme a literatura. De acordo com BORGES (2000), estudos demonstraram que a administração de 8g/dia de FOS a idosos, com fezes liquefeitas, por um período de 8 dias, melhorou a consistência das fezes e reduziu a frequência e o número de evacuações em todos os indivíduos. Por outro lado, a administração de 3 a 10g/dia de FOS em pacientes constipados promoveu melhora significativa da evacuação em todos os pacientes (TOMOMATSU, 1994).

Outros autores administraram inulina em idosos constipados, o que resultou em efeito laxativo, com alívio significativo da constipação em todos os sujeitos e aumento da contagem de bifidobactérias (TAPER e ROBERFROID, 1999).

Em ensaios com ratos, nos quais administrou-se na dieta 10% de inulina ou FOS, verificou-se uma redução na síntese hepática de triglicerídios, lipoproteína

de muito baixa densidade (VLDL), fosfolípidios e colesterol sérico (DELZENNE, 1999).

A inclusão de frutooligosacarídeos e inulina na dieta acarreta diversos benefícios à saúde, no entanto a sua maior contribuição diz respeito à melhoria na composição da microbiota intestinal e o aumento do número de bifidobactérias colônicas.

3.3. Vitaminas e Minerais

No envelhecimento ocorrem numerosas causas que favorecem o aparecimento de déficits vitamínicos e minerais, segundo (NOVARTIS, 1998):

- Insuficiente aporte energético e dietas excessivamente restritas em lípidios;
- Baixa ingestão de frutas e verduras;
- Diminuição do apetite;
- Má preparação e conservação dos alimentos;
- Excessivo uso de laxantes;
- Polifarmácia;
- Patologias agudas e/ou crônica.

No estudo SENECA (*Survey in Europe on Nutrition and the Elderly, a Concerted Action*) realizado com indivíduos entre 74 a 79 anos de idade, os autores encontraram uma ingestão inadequada de um ou mais nutrientes em 23,9% dos homens idosos e 46,8% das mulheres idosas, evidenciando que o ferro e a riboflavina foram os nutrientes que estavam mais inadequados na ingestão dessas pessoas (GROOT *et al.*, 1999).

As vitaminas que possuem difícil ajuste na população geriátrica conforme PÀLLAS (2002) são:

- Vitamina D: a menor capacidade de síntese nos idosos e a escassa exposição solar faz com que os níveis de vitamina D e, conseqüentemente, de cálcio sejam insuficientes para a conservação dos ossos e em muitos casos se faça necessário à suplementação dessa vitamina.

- Vitaminas antioxidantes: as vitaminas E e C devem estar presente na dieta de idosos, devido seu efeito antioxidante benéfico e por preservar de forma especial o bom funcionamento do sistema imune.

- Ácido fólico, vitamina B₆ e B₁₂, quando em déficit, estão relacionados com níveis anormais de homocisteína no sangue, que induz o aparecimento de doença coronariana, doença cerebrovascular e demência.

Conforme PÀLLAS (2002), existem alguns minerais que por possuírem um papel crítico na idade geriátrica, devem ser tratados de maneira particular:

- Cálcio: com a idade sua absorção diminui em virtude da diminuição da secreção ácida gástrica e dos níveis mais baixos de vitamina D. Adicionalmente, a redução na atividade física e a menopausa favorecem a perda de massa óssea. Como existe uma alta prevalência de osteoporose em idosos, se a dieta não consegue suprir as recomendações, aconselha-se à suplementação desse mineral.

- Ferro: a população geriátrica não é um grupo de risco para o desenvolvimento de ferropenia, no entanto, existem vários fatores que predispõem a sua carência, como por exemplo, doenças inflamatórias, digestivas, entre outras.

- Zinco: nutriente antioxidante de difícil ajuste, principalmente quando a ingestão energética é baixa. Sua carência está associada à diminuição da função imune, da cicatrização de feridas da percepção gustativa, assim como da inapetência ou anorexia e a degeneração macular.

- Selênio: nutriente antioxidante que previne a formação de radicais livres, pode estar diminuído em idosos por uma redução na ingestão de alimentos protéicos como a carne.
- Magnésio: está relacionado com a prevenção de eventos cardiovasculares, presença de diabetes e aparecimento de osteoporose, pode ocorrer déficit devido algumas enfermidades e medicamentos como diuréticos.
- Cromo: co-fator da função insulínica, imprescindível no metabolismo da glicose e dos lipídios, cujo aporte pode ser insuficiente na dieta dos idosos.

WARNER e KIM (1994) relatam que a ingestão de certos micronutrientes essenciais pode minimizar os efeitos do envelhecimento. Dentre eles, destacam-se:

- Vitamina C: reduz a incidência de resfriados, é antioxidante para o stress oxidativo;
- Vitamina E: reduz no sangue a peroxidação lipídica, redução da catarata, da osteoartrite associada com dor e redução do câncer oral, está relacionada com a manutenção da imunidade na velhice, aumento da produção da interleucina-2, além de ser um antioxidante potencial importante na manutenção da função celular;
- Ferro: pode ser um fator crítico na isquemia do coração, mas não na degeneração devido ao stress oxidativo das proteínas, por ser o ferro componente da hemoglobina, citocromos, transferrina e ferritina.

DAWSON et al. (1999), em estudos com ratos, verificaram que se as relações observadas no modelo animal podem ser aplicadas a humanos, estes

dados sugeririam que idosos que consomem habitualmente dietas com baixo teor de vitamina A poderiam ter um risco aumentado de infecção ou neoplasias.

Uma pesquisa realizada com 88 indivíduos com idade superior a 65 anos, não institucionalizados, investigou a suplementação com 60, 200 e 800mg de vitamina E por 235 dias. Os resultados indicaram que as maiores dosagens dessa vitamina aumentaram clinicamente a função das células T-mediadas em idosos saudáveis (MEYDANI; MEYDANI e BLUMBERG, 1997).

LESOURD (1997) verificou que altas doses farmacológicas de um único micronutriente, como o zinco ou a vitamina E, podem ser utilizadas para melhorar a resposta imunológica de idosos não institucionalizados, reduzindo os riscos de infecção.

Em relação ao ácido ascórbico, RUSSEL (1992) apresentou pesquisas que sustentam um consumo diário dessa vitamina de 140mg/dia; essa quantidade alcançaria níveis satisfatórios de saturação dos tecidos orgânicos, garantindo seu efeito antioxidante.

Estudos americanos indicaram a existência de correlação entre elevadas concentrações de homocisteína como fator de risco para doenças cardiovasculares quando associadas ao envelhecimento orgânico. Esta verificação é enfatizada pelos autores, uma vez que deficiências subclínicas para as vitaminas B₆, B₁₂ e ácido fólico podem ocorrer não só pelo processo de envelhecimento, mas também por problemas renais característicos da idade ou por patologias (MOUSTAPHA, ROBINSON e HIGH, 1998).

Adequar e prevenir inadequações dietéticas de vitaminas e minerais é uma prática fundamental, a fim de oferecer à população idosa orientações nutricionais capazes de auxiliar na integridade da saúde durante o processo de envelhecimento e alcançar uma melhor qualidade de vida na idade avançada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION - ADA. Position of the American Dietetic Association: functional foods, v. 99, n. 10, p. 1278-1285, 1999.

ADLER-NISSEN, J. Enzymic hydrolysis of food proteins. **Elsevier Applied Science Publishers Ltd:** London and New York, 1985.

ARNAL, M.A.; MOSONI, L.; BORIE, Y.; HOULIER, M.L.; MORIN, L.; VERDIER, E.; RITZ, P.; ANTOINE, J.M.; PRUGNAUD, J.; BEAUFRÈRE, B.; MIRAND, P.P. Protein pulse feeding improves protein retention in elderly woman. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.69, n.6, p.1202-1208, 1999.

ARABBI, P.R. Alimentos funcionais – aspectos gerais. **Nutrire**, São Paulo, v.21, n.7, p.87-102, 2001.

ARANHA, F.Q.; BARROS, Z.F.; MOURA, L.S.A.; GONÇALVES, M.C.R.; BARROS, J.C.; METRI, J.C.; SOUZA, M.S. O papel da vitamina C sobre as alterações orgânicas no idoso. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.2, p.89-97, 2000.

BARTFAY, W.J.; DAVIS, M.T.; MEDVES, J.M.; LUGOWSKI, S. Milk whey protein decreases oxygen free radical production in a murine model of chronic iron-overload cardiomyopathy. **The Canadian Journal of Cardiology**, Oakville, v. 19, n. 10, p. 1163-1168, 2003.

BAUMGARTNER, R.N.; KOEHLER, K.M.; GALLAGHER, D.; ROMERO, L.; HEYMSFIELD, S.B.; ROSS, R.R.; GARRY, P.J.; LINEMAN, R.D. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. **American Journal of Epidemiology**. Baltimore, v. 147, n.8, p. 755-763, 1998.

BELL, J.; WHITING, S.J. Elderly woman need dietary protein to maintain bone mass. **Nutrition Reviews**. Baltimore, v. 60, n. 10, p. 337-341, 2002.

BELL, R.A.; HIGH, K. P. Alterations of immune defense mechanisms in the elderly: The role of nutrition. **Infections in Medicine**. New York, v.14, n.5. p. 415-424, 1997.

BELLO, J. Los alimentos funcionales o nutraceuticos:nueva gama de productos en la industria alimentaria. **Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos**. España, n. 267, p. 25-30, 1995.

BIRT; D.F.; BAKER; P.Y.; HRUZA, D.S. Nutritional evaluations of three dietary levels of lactalbumin throughout the lifespan of two generation of Syrian hamsters. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.112, n.11, p.2151-2160, 1982.

BORGES, V.C. Oligossacarídeos x fibras alimentares. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v.12, n.4, p. 161-164, 1997.

_____. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: **Waitzberg, D.L. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. São Paulo: Atheneu, p.1495-1509, 2000.

BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v.14, n.4, p.271-278, 1991.

_____.The fascinating story behind a health-promoting product-patented milk serum (whey) protein concentrate. Scottsdale: Immunotec Clinical Foundation,1997, 15 p.

_____. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, Athens, v. 20, n. 6C, p. 4785-4792, 2000.

BRASIL. Lei nº 8.842 de 4 de janeiro de 1994. Dispõe sobre a política nacional do idoso, cria o conselho nacional do idoso e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, v. 132, n. 3, p. 77, 1994.

BRASIL. Decreto nº 1948 de 4 de julho de 1996. Regulamenta a Lei nº 8.842, de 4 de janeiro, que dispõe sobre a política nacional do idoso e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, v. 128, p. 12277-12279, 1996.

BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. **Life Extension Report**, Chicago, v.1, p. 21-28, 1996.

BRODIE, J.M. Hair growth benefits from dietary cystine-gelatine supplementation. **Journal Applied Cosmetology**, Roma, v. 2, p. 15-27, 1984.

CAMPOS, M.T.F.S; MONTEIRO, J.B.R.; ORNELAS, A.P.R.C. Fatores que afetam o consumo alimentar e a nutrição do idoso. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 3, p.157-165, 2000.

CARVALHO FILHO, E.T. Fisiologia do envelhecimento. In: PAPALÉO NETTO, M. **Gerontologia**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 1997.

CARVALHO, J.A.M; GARCIA, R.A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 725-733, 2003.

CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 66, n.2, p. 460S-463S, 1997.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, New York, v. 11,n.7, p. 254-262, 2000.

COITINHO, D.C.; LEÃO, M.M.; RECINE, E.S.R.; SICHIERI, R. **Condições nutricionais da população brasileira: adultos e idosos**. Brasília, INAN, 1991. [Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição].

CORWIN, J.; LOURY, M.; GILBERT, A.N. Workplace, age, and sex as mediators of olfactory function: data from the National Geographic Smell Survey. **The Journal of Gerontology and Psychological Sciences and Social Sciences**, New York, v.50, n.4, p.179-186, 1995.

CURIATI, J.A.E.; ALENCAR, Y.M.G. Nutrição e envelhecimento. In: CARVALHO FILHO, E.T.; PAPALÉO NETTO, M. **Geriatría, fundamentos, clínica e terapêutica**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu,1994.

DANGIN, M.; BOIRIE, Y.; GUILLET, C.; BEAUFRERE, B. Influence of the protein digestion rate on protein turnover in young and elderly subjects. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, n. 10, p. 3228S-3233S, 2002.

_____; GUILLET, C.; GARCIA-RODENAS, C.; GACHON, P.; BOUTELOUP-DEMANGE, C.; REIFFERS-MAGNANI, K.; FAUQUANT, J.; BALLÈVRE, O.; BEAUFRERE, B. The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans. **Journal of Physiology**, London, v. 549, n.2, p. 635-644, 2003.

DAWSON, H.D.; LI, N.Q.; DECICCO, K.L.; NIBERT, J.A.; ROSS, A.C. Chronic marginal vitamin A status reduces natural killer cell number and function in aging Lewis rats. **The Journal of Nutritional**, Philadelphia, v. 129, n.8, p.1510-1517, 1999.

DECLARAÇÃO POLÍTICA DA II ASSEMBLÉIA MUNDIAL DA ONU SOBRE O ENVELHECIMENTO. **O Mundo da Saúde**, Madri, v. 26, n. 4, p. 539-541, 2002.

DELZENNE, N.M. KOK, N.N. Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129 (S), p.1467-1470, 1999.

DIAS, N.F.G.P. “Estudo comparativo de propriedades imunoestimulatória e antitumoral de concentrados protéicos de soro de leite bovino de caseína e de um isolado protéico de soja comerciais”. **Tese de Doutorado**, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas-SP, 2004.

DJAGNY, K.B.; WANG, Z. e XU, S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton , v. 41, n. 6, p. 481-492, 2001.

DOHERTY, T.J. Invited review: aging and sarcopenia. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 95, n. 4, p. 1717-1727, 2003.

DORRENS, J.; RENNIE, M.J. Effects of aging and human whole body and muscle protein turnover. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, Copenhagen, v. 13,n. 1, p. 26-33, 2003.

EIGEL, W.N.; BUTLER, J.E.; ERNSTROM, C. A.; FARRELL, H.M.; Jr. HARWALKER, V.R.; JENNESS, R.; WHITNEY, R. McL. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 67, n. 8, p. 1599-1886, 1984.

FERRIOLLI, E.; MORIGUTI, J.C.; PAIVA, C.E.; MIRANDA, S.C.; TANNUS, A.E.S.; RIGO, R.; MARCHINI. Aspectos do metabolismo energético e protéico em idosos. **Nutrire**, São Paulo, v. 19/20, n. 2, p. 19-30, 2000.

FITZGERALD, R.J.; MURRAY, B.A.; WALSH, D.J. Hypotensive peptides from milk proteins. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia., v. 134, n. 4, p. 980S-988S, 2004.

FOEGEDING, E.A.; DAVIS, J.P.; DOUCET, D.; MCGUFFEY. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, New York, v. 13, n. 5, p. 151-159, 2002.

FRISANCHO, A.R. New standards of weight and body composition by frame size and height for assessment of nutritional status of adults and the elderly. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 40, n.4, p. 808-819, 1984.

FUNDAÇÃO IBGE. **Censo demográfico: Brasil, 2000**. Rio de Janeiro: IBGE.

GERDES, S.K.; HARPER, W.J. Whey proteins in cardiovascular health. In: **Reference Manual for U.S. whey and lactose products**. Ed. MILLER, G. U.S. Dairy Export Council. Washington D.C. pp 68-79, 2003.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Critical review. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 50-60, 1994.

_____. Developments in beverage additives. **Food Technology**, Chicago, v. 49, n. 9, p. 64-72, 1995.

GIRODON, F.; GALAN, P.; MONGET, A.; BOUTRON-RUAULT, M.; BRUNEL-LECOMTE, P.; PREZIOSI, P.; ARNAUD, J.; MAUGUERRA, J.; HERCEBERG, S. Impact of trace elements and vitamin supplementation on immunity and infections in institutionalized patients: a randomized controlled trial. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 159, n. 7, p. 748-754, 1999.

GROOT, C.P.G.M.; BROEK, T.V.D.; STAVEREN, W.V. Energy intake and micronutrient intake in elderly Europeans: seeking the minimum requirement in the SENECA study. **Age and Ageing**, London, v. 28, n. 5, p. 469-474, 1999.

HEREDIA, O.C. Características demográficas da terceira idade na América Latina e no Brasil. **Estudos Interdisciplinares no Envelhecimento**, v. 2, p. 7-21, 1999.

HIGH, K.P. Micronutrient supplementation and immune function in the elderly. **Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**. Chicago, v. 28, p. 717-722, 1999.

HOLLINGSWORTH, P. Beverages: redefining new age. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 8, p. 44-51, 1997.

HUFFMAN, L.M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 49-52, 1996.

IMAFIDON, G.I.; FARKYE, N.Y.; SPANIER, A.M. Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 37, n. 7, p. 663-688, 1997.

ITO, N.; KOJIMA, T.; NAGATH, H.; OZEKI, N.; YOSHIDA, Y.; NONAMI, T. Apoptosis induced by culturing MH134 cells in the presence of porcine skin gelatin

in vitro. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceutical**, Larchmont, v. 17, n. 4, p. 379-384, 2002.

JACOBUCCI, H.B.; DIAS, N.G.P.; SGARBIERI, V.C.; BORGES, P.Z.; TANIKAWA, C. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and protein, and liver cholesterol. **Nutrition Research**, Los Angeles, v.21, p.905-915, 2001.

JECKEL NETO, E. Gerontologia: desafio para o século XXI. In: JECKEL NETO, E; CRUZ, I.B.M. (Org.). **Aspectos biológicos e geriátricos do envelhecimento II**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2000.

KALACHE, A.; VERAS, R.P.; RAMOS, L.R. O envelhecimento da população mundial: um novo desafio. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 21, n. 3, p. 200-210, 1987.

KATZ, F. Top product development trends in Europe. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 38-42, 1999.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Bioscience**, Bangalore, v.27, n.7, p.703-714, 2002.

KAWAS, M.; HASHIMOTO, H.; HOSODA, M.; MORITA, H.; HOSONO, A. Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. **Journal Dairy Science**, Lancaster, v. 83, n. 2, p. 255-263, 2000.

KEMP, F.W.; DECANDIA, J.; LI, W.; BRUENING, K.; BAKER, H.; RIGASSIO, D.; BENDICH, A.; BOGDEN, J.D. Relationships between immunity and dietary and serum antioxidants, trace metals, B vitamins, and homocysteine in elderly men and women. **Nutrition Research**, Los Angeles, v. 22, n. 1-2, p. 45-53, 2002.

KERSTETTER, J.E.; O'BRIEN, O.; INSOGNA, K.L. Dietary protein, calcium metabolism, and skeletal homeostasis revisited. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 78, n.3, p. 584S-592S, 2003.

KRANS, C.; SCHWARS, E. Osteoporose-artrose: aspectos nutricionais e fisiológicos em relação à prevenção e ao acompanhamento terapêutico. **Proteva Food AG**, Höchst, Alemanha, 2001, 60 p.

KRAUSE, D.; MASTRO, A.M.; HANDTE, G.; SMICIKLAS-WRIGHT, H.; MILES, M.P.; AHLUWALIA, N. Immune function did not decline with aging in apparently healthy, well-nourished women. **Mechanisms of Ageing and Development**, Lausanne, v. 112, n. 1, p. 43-57, 1999.

KREIDER, R.B. **Whey proteins and seniors nutrition**. Ed. LLOYD, B. Published by U.S. Dairy Export Council. Arlington: EUA, p.1-8, 2004.

KRUGER, M.; BROWN, K.; COLLET, G.; LAYTON, L.; CHOLLUM, L. The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. **Experimental Biology and Medicine**, Basel, v.228, n.6, p.683-688, 2003.

LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 68-71, 1994.

LAURETANI, F.; RUSSO, C.R.; BANDINELLI, S.; BARTALI, B.; CAVAZZINI, C.; DI IORIO, A.; CORSI, A. M.; RANTANEN, T.; GURALNIK, J.M.; FERRUCCI, L. Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. **Canadian Journal of Applied Physiology**, Champaign, v. 95, n.5, p. 1851-1860, 2003.

LESOURD, B.M. Nutrition and immunity in the elderly: modification of immune responses with nutritional treatments. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.66, n.2, p.478-484S, 1997.

LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.78 (S), p. 517-520, 2003.

MÁRQUEZ, L.R. **A fibra terapêutica**. São Paulo: Americana de Publicações, 1999. 132p.

MARSHALL, N.D. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review: a journal of clinical therapeutic**, Sandpoint, v. 9, n. 2, p. 136-156, 2004.

MCINTOSH, G.H.; ROYLE, P.J.; LE LEU, R.K.; REGESTER, G.º JOHNSON, M.A. GRINSTED, R.L.; KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey proteins as a functional food ingredients? **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n.5-6, p. 425-434, 1998.

MERCIER, A.; GAUTHIER, S.F.; FLISS, I. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. **International Dairy Journal**, Barking, v.14, n.3, p. 175-183, 2004.

MEYDANI; S.N.; MEYDANI, M.; BLUMBERG, J.B. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 277, n.17, p.1380-1386, 1997.

MILLWARD, D.J.; FEREDAY, A.; GIBSON, N.; PACY, P.J. Aging, protein requirements, and protein turnover. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 66, n.4, p. 774-786, 1997.

MINEHIRA, K.; INOUE, S.; NONAKA, M.; OSADA, K.; YAMADA, K.; SUGANO, M. Effects of dietary protein type on oxidized cholesterol-induced alteration in age-related modulation of lipid metabolism and indices of immune function in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1483, n. 1, p. 141-153, 2000.

MLEKO, S.; GUSTAW, W. Rheological changes due to substitution of total milk protein by whey proteins in dairy desserts. **Journal of Food Science Technology**, USA, v. 39, n. 2, p. 170-172, 2002.

MORGANTI, P. The effect of gelatin-glycine on skin hydration. **Journal of Applied Cosmetology**, v. 8, p. 81-88, 1990.

MORR, C.V.; FOEGEDING, F.A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates: a status report. **Food Technology**, Chicago, v. 44, n. 4, p.100-122, 1990.

_____; HA, E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

MOSKOWITZ, R. W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, Chicago, v. 30, n.2, p. 87-99, 2000.

MOUSTAPHA, A.; ROBINSON, K. High plasma homocysteine: a risk factor for vascular disease in the elderly. **Coronary Artery Disease**, Philadelphia, v.9, n.11, p.725-730, 1998.

NAGAOKA, S.; KANAMARU, Y.; KUZUIA, Y. Effects of whey protein and casein on the plasma and liver lipids in rats. **Agriculture and Biological Chemistry**, Tokyo, v.55, n.3, p. 813-818, 1991.

NAJAS, M.S.; ANDREZZA, R.; SOUZA, A.L.M.; SACHS, A.; GUEDES, L.R.S.; RAMOS, L.R.; TUDISCO, E.S. Padrão alimentar de idosos de diferentes estratos socioeconômicos residentes em localidade urbana da Região Sudeste, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 187-191, 1994.

NBJ - Nutrition Business Journal, 2003. Functional foods report., San Diego. Disponível em: www.nutritionbusiness.com . [acesso 2004 jan 24].

NETTO, C.C. **Avaliação da biopotência dos frutooligosacarídeos (FOS) e da terapia de reposição hormonal (TRH) no metabolismo de cálcio de ratas ovariectomizadas**. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2005.

NEUMANN, A.I.C.P.; ABREU, E.S.; TORRES, E.A.F.S. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimento, nutracêuticos... Você já ouvir falar? **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 71, p. 19-23, 2000.

NICOLAS, A.S.; ANDRIEU, S.; NOURHASHEMI, F.; ROLLAND, Y; VELLAS, B. Successful aging and nutrition. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v. 59, n. 8, S88-S92, 2001.

NOGUÉS, R. Factores que afectan la ingesta de nutrientes en el anciano y que condicionan su correcta nutrición. **Nutrición Clínica**, v. 15. n. 2, p. 39-44, 1995.

NOVAES, V.L.S.S. Padrão dietético de idosos de 80 anos e mais, atendidos em ambulatório de geriatria na capital de São Paulo, **Dissertação de Mestrado**, Curso de Pós-Graduação Interunidades em Nutrição Humana Aplicada, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 1997.

NOVARTIS. **Requerimientos nutricionales en la tercera edad**. Barcelona: Editado por Novartis Consumer Health S.A., 1998.

PALLÀS, M.C. Importancia de la nutrición en la persona de edad avanzada. Novartis. Barcelona: Novartis Consumer Health S.A., 2002. Disponível em <http://www.novartismedicalnutrition.com/es> [2004 Jun 28].

PANNEMANS, D.L.; WAGENMAKERS, A.J.; WESTERTERP, K.R.; SCHAAESMA, G.; HALLIDAY, D. Effect of protein source and quantity on protein metabolism in elderly woman. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.68, n.6, p. 1228-1235, 1998.

PASCHOAL, S.M.P. Epidemiologia do envelhecimento. In: PAPALÉO NETTO, M. **Gerontologia**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 1997.

PASSOS, M.L.P.; PARK, Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.2, p. 385-390, 2003.

PESSINI, L. Envelhecimento e saúde: ecos da II Assembléia Mundial sobre o envelhecimento. **O Mundo da Saúde**, Madri, v. 26, n. 4, p. 457-463, 2002.

_____; QUEIROZ, Z.V. Envelhecimento e saúde: desafios para o novo século. **O Mundo da Saúde**, Madri, v. 26, n. 4, p. 455-456, 2002.

PICO, A. Nutrição geriátrica. **Geriátricos**, Minneapolis, v. 5, n. 9, p. 81-83, 1989.

PSZCZOLA, D.E. How ingredients help solve beverage problems. **Food Technology**, Chicago, v. 55, n. 10, p. 61-74, 2001.

RAVAGLIA, G.; FORTI, P.; MIOLI, F.; BASTAGLI, L.; FACCHINI, A.; SAVARINO, L.; SASSI, S.; CUCINOTTA, D.; LENZA, G. Effect of micronutrient status on natural killer cell immune function in healthy free-living subjects aged ≥ 90 y. **The American Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 71, n.2, p. 590-598, 2000.

REGESTER, G.O; MCINTOSH, G.H.; LEE, V.W.K.; SMITHERS, G.W. Whey proteins as nutritional and functional food ingredients. **Food Australia**, Australia, v. 48, n. 3, 123- 127, 1996.

REINHARD, T. Diet and Immune Function. **Coordinated Program in Dietetics**, Wayne State University. Disponível em: <http://dietitian.science.wayne.edu/immune.htm> >[Acesso em 20 jul. 2004].

RICHIE, J.P. The role of glutathione in aging and cancer. **Experimental Gerontology**, Oxford, v. 27, n. 5-6, p. 615-626, 1992.

ROBERFROID, M. B.; GIBSON, G. R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v.51, n.5, p.137-146, May. 1993.

_____; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, n.1, p. 11-19, 1998.

_____. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, n.129, p. 1398S – 1401S, 1999.

ROLAND, D.A. Nutrição na idade adulta e na velhice. In: KRAUSE, M.V.; MAHAN, L.K. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 7ª ed. São Paulo: Editora Roca, 1991.

ROLLAND, Y.; LAUWERS-CANCES, V.; COURNOT, M.; NOURHASHEMI, F.; REYNISH, W.; RIVIÈRE, D.; VELLAS, B.; GRANDJEAN, H. Sarcopenia, calf circumference, and physical function of elderly women: a cross-sectional study. **Journal of the American Geriatrics Society**, New York, v. 51, n.8, p. 1120-1124, 2003.

RUSSEL, R.M. Micronutrient requirements of the elderly. **Nutrition Research**, Los Angeles, v.50, n.12, p.463-466, 1992.

_____. The aging process as a modifier of metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 72, n. 2, p. 529S-532S, 2000.

SCHIFFMAN, S.S. Perception of taste and smell in elderly persons. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Durham, USA, v.33, n.1, p.17-26, 1993.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; SCHREZENMEIR J. Inulin, oligofructose and mineral metabolism - experimental data and mechanism. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.87, Supl. 2, p.179-186 (2002).

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: **Annals IV World Conference of Food Science and Technology**, Wuxi, China, 2000, p. 196-210.

_____. Propriedades fisiológicas-funcionais das roteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.4, p.397-409, 2004.

_____. The role of dietary energy and macro components of foods in modulating carcinogenesis (an overview). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.51, n.2, p.104-121, 1999.

SLOAN, A.E. The top 10 functional food trends: the next generation. **Food Technology**, Chicago, v. 56, n. 4, p. 32-57, 2002.

TAGUCHI, A.; OHTA, A.; ABE, M.; BABA, S.; OHTSUKI, M.; TAKIZAWA, T.; YUDA, Y.; ADACHI, T. Effects of fructooligosaccharides on bone and mineral absorption in the rat model with ovariectomised osteoporosis. **Meiji Seika Kenkyu Nenpo**, Japan, v.33, p. 37-43, 1995.

TAPER, H.S.; ROBERFROID, M. Influence of inulin and oligofructose on breast cancer and tumor growth. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129 (S), p. 1488-1499, 1999.

TEIXEIRA, J.J.V.; LEFÈVRE, E.F.A. A prescrição sob a ótica do paciente idoso a. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 2, p. 207-213, 2001.

TOBA, Y.; TAKADA, Y.; YAMAMURA, J.; [TANAKA, M.](#); [MATSUOKA, Y.](#); [KAWAKAMI, H.](#); [ITABASHI, A.](#); [AOE, S.](#); [KUMEGAWA, M.](#) Milk basic protein: a novel protective function of milk against osteoporosis. **Bone**, Elmsford: New York, v. 27, n.3, p. 403-408, 2000.

TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 61-65, 1994.

VERAS, R.P. **País jovem com cabelos brancos: a saúde do idoso no Brasil**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Relume Dumará, 1994, 224p.

VOLPI, E.; KOBAYASHI, H.; SHEFFIELD-MOORE, M.; MITTENDORF, B.; WOLFE, R.R. Essencial amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults, **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.78, n.2, 250-258, 2003.

WAITZBERG, D.L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.** 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

WARNER, H. R.; KIM, S.K. Dietary factors modulating the rate of aging. In: GOLDBERG, I. **Functional Foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals.** 1^a ed. New York: Chapman & Hall, 1994. p. 109-125.

WEKSLER, M.E.; GOODHARDT, M. Do age-associated changes in “physiologic” autoantibodies contribute to infection, atherosclerosis and Alzheimer’s disease? **Experimental Gerontology**, Oxford, v. 37, n.8-9,p. 971-979, 2002.

WILMOTH, J.R. The future of human longevity: a demographer’s perspective. **Science**, Washington, v. 280 (5362), p. 395-397, 1998.

WOLFE, R.R. Regulation of muscle protein by amino acids. **The American Society for Nutritional Sciences**, USA, v.132, n. 10, 3219S-3224S, 2002.

Capítulo 2

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E NUTRICIONAL DE
ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E HIDROLISADO DE
COLÁGENO BOVINO**

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E NUTRICIONAL DE ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE E HIDROLISADO DE COLÁGENO BOVINO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi adequar a proporção entre o isolado protéico do soro de leite (WPI) e o hidrolisado de colágeno bovino (HCB) e avaliar algumas de suas propriedades físicas, composição, perfil de aminoácidos e propriedade nutricional. Observou-se que o componente de maior concentração foi a proteína para as duas amostras (em torno de 92%). A solubilidade do WPI foi maior em pH 8 e 0,05 e 0,1M de NaCl ($99,3 \pm 0,1$ e $99,7 \pm 0,9$ respectivamente). Já para o HCB a maior solubilidade ocorreu em solução 0,15M de NaCl, em todos os valores de pH testados. Obteve-se elevada solubilidade da mistura 60% WPI: 40%HCB a 2,5; 5 e 10% de concentração. O perfil de aminoácidos essenciais (AAE) do WPI atende às recomendações da FAO/WHO, no entanto o HCB apresenta deficiência em vários AAE, particularmente em triptofano e AA sulfurados. Em relação ao ganho de peso, os animais que receberam 80% WPI: 20%HCB como única fonte de proteína foram os únicos que não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) do padrão de caseína AIN-93G. Já a mistura 60% WPI: 40%HCB apresentou resultados superiores aos demais tratamentos quanto ao NPR (quociente de eficiência líquida da proteína) e PER_{op} (quociente de eficiência protéica operacional), porém não diferiu estatisticamente da caseína, WPI e da mistura 80% WPI: 20%HCB. A maior digestibilidade ($p < 0,05$) foi para HCB, HCS e 60% WPI: 40% HCB. Os valores de PDCAAS (escore químico corrigido pela digestibilidade verdadeira) foram inferiores ao do padrão para todas as misturas protéicas usadas. O BN (balanço de nitrogênio) foi positivo para todos os tratamentos. Caseína, 60%WPI:

40% HCB e WPI apresentaram elevado VB_a (valor biológico aparente) e NPU (utilização líquida da proteína). Em função dos resultados obtidos, optou-se pela mistura 60% WPI: 40% HCB como componente protéico na formulação do produto dietético para idosos.

1. INTRODUÇÃO

O leite constitui uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e de humanos de todas as idades. Pode ser considerado o alimento mais completo da natureza e o único que satisfaz às necessidades dos recém-nascidos, de cada espécie, nos primeiros meses de vida (SGARBIERI, 1996).

De acordo com EIGEL *et al.* (1984), as proteínas do soro são universalmente definidas como as proteínas que permanecem na fração líquida do leite após a coagulação da caseína em pH 4,6 a 20 °C e, conforme FOEGEDING *et al.* (2002) o soro fluido remanescente contém aproximadamente 0,6% de proteína e 93% de água.

Estudos demonstram que o WPI, cuja concentração protéica é igual ou superior a 90%, apresenta como propriedades tecnológicas e nutricionais um excelente conteúdo de aminoácidos essenciais, fácil digestibilidade, boa solubilidade, capacidade emulsificante, geleificante e de retenção de água, adequada viscosidade e adesividade, além da habilidade de formação de espuma (HUFFMAN, 1996).

Cabe ressaltar, que as proteínas do soro de leite apresentam além de suas propriedades tecnológicas e nutricionais, importantes propriedades funcionais, as quais podem influenciar o metabolismo e o sistema imunológico, proporcionando ao indivíduo maior eficiência metabólica, condições adequadas para uma vida mais saudável, aumento na longevidade e prevenção de doenças. De acordo BRINK (1996), as proteínas do soro de leite, também, são capazes de elevar os níveis de glutathione celular, sendo a glutathione um tripeptídeo composto por cisteína, ácido glutâmico e glicina, atuando como um potente agente antioxidante, desintoxicante e modulador imunológico.

Conforme DJAGNY *et al.* (2001), o hidrolisado de colágeno é uma proteína solúvel em água de alto interesse econômico, possuindo a capacidade de formar géis transparentes sob condições específicas. Geralmente apresenta estrutura variável com diferentes propriedades físicas e químicas, devido às diferentes fontes de colágeno e técnicas de preparação. Sua utilização, especialmente na indústria de alimentos, deve-se às suas funções físico-químicas e tecnológicas de dispersão, geleificação, adequada solubilidade aquosa, relativa viscosidade e capacidade de formação de espuma e de filme comestível. Adicionalmente, a ingestão de colágeno, principalmente em sua forma hidrolisada, produz como efeitos benéficos ao organismo o fortalecimento e estímulo do crescimento de unhas, cabelos e pele, tornando-os mais saudáveis (BRODIE, 1984), bem como, o fortalecimento da estrutura óssea e cartilagens contribuindo para o tratamento da artrose e da osteoporose, entre outros benefícios conforme KRANS e SCHWARS (2001); MOSKOWITZ (2000); DJAGNY *et al.* (2001).

Assim, a associação de hidrolisado de colágeno, proteína deficiente principalmente em triptofano e cisteína, e proteínas do soro de leite, as quais possuem aminoácidos essenciais em grande quantidade, possibilita uma melhora significativa no equilíbrio de aminoácidos essenciais, com considerável vantagem nutricional. Também, haverá vantagem econômica na associação dessas duas proteínas, uma vez que o colágeno é abundante e de baixo custo enquanto que as proteínas do soro de leite são de difícil recuperação tecnológica e de alto custo.

Portanto, o objetivo deste capítulo foi obter uma proporção adequada entre o isolado protéico do soro de leite bovino e o hidrolisado de colágeno bovino e avaliar sua composição, propriedades físico-químicas, perfil de aminoácidos essenciais e aspecto nutricional (avaliação com ratos).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria-Prima

Utilizaram-se isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) - ALACEN 895, adquirido da empresa NZMP (NEW ZEALAND MILK PRODUCTS), São Paulo e hidrolizado de colágeno bovino (HCB), fornecido pela empresa GELITA SOUTH AMERICA, Cotia, SP.

2.2. Métodos

2.2.1. Caracterização físico-química

Composição centesimal

- **Umidade, sólidos totais, cinzas e proteína:** foram determinados de acordo com os procedimentos descritos no AOAC (1990). Os sólidos totais foram obtidos pela diferença entre o peso total da amostra e o conteúdo em umidade, secagem em estufa a 105 °C até peso constante. A proteína bruta foi obtida multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 6,38 para o isolado protéico de soro de leite bovino e 5,55 para o hidrolizado de colágeno bovino. Determinou-se o nitrogênio total da dieta, fezes e urina dos grupos experimentais.

- **Lipídios Totais:** foram determinados pelo método descrito por BLIGH e DYER (1959), empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água (nas proporções 10, 20, e 8 mL, respectivamente) para extração dos lipídios.

- **Carboidratos totais:** estimados por diferença, subtraindo-se de 100% a soma dos valores obtidos para as determinações anteriores.

Determinação do grau de hidrólise (GH)

O GH foi definido segundo Adler-Nissen (1986), como o número de ligações peptídicas clivadas ou número de grupos amino livres formados durante o processo de hidrólise, expresso em equivalente de hidrólise. O GH foi calculado segundo a expressão:

$$\text{GH} = \frac{h}{h \text{ total}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de ligações peptídicas clivadas}}{\text{n}^\circ \text{ total de ligações peptídicas}} \times 100$$

Onde:

h = grupamentos amínicos livres liberados na hidrólise e calculados a partir da curva padrão de L-leucina.

h total = número de equivalente de ligações peptídicas por unidade de massa protéica, cujo valor é de 11,1 mM/g de proteína, para a gelatina e derivados.

Para a determinação do grau de hidrólise (GH) foi utilizado o método proposto por Adler-Niessen (1979), que consiste na medida espectrofotométrica do cromóforo formado pela reação entre o ácido trinitro-benzenosulfônico (TNBS) e grupos amino sob condições alcalinas. Após 1 hora de incubação a reação foi interrompida por abaixamento do pH (HCl 0,1N). A amostra foi dispersa em dodecil sulfato de sódio (SDS) e a reação ocorreu em presença de tampão fosfato 0,2125M e pH 8,2. Como padrão utilizou-se a L-leucina (0 a 2,0 mM). A leitura foi efetuada a 340 nm.

O método do TNBS não pode ser empregado para o acompanhamento da hidrólise, pois após a retirada da alíquota para análise, além do tempo requerido para a pipetagem, o método requeria 1 hora de incubação a 50°C e 30 min. à temperatura ambiente após a reação, para proceder à leitura no espectrofotômetro.

Solubilidade (%SP)

A solubilidade protéica (%SP) foi determinada de acordo com o método de MORR *et al.* (1985) que consistiu em uma modificação do método de determinação do índice de nitrogênio solúvel. Foram estudados os efeitos do pH (faixa de 2 a 8), e da força iônica produzida por cloreto de sódio (NaCl) em diferentes concentrações (0,00 - 0,20M) para o WPI e para o HCB. Já para a mistura selecionada dessas proteínas foi realizada a solubilidade em água em diferentes concentrações (1,25%; 2,5%; 5%; 10% ; 15% e 20%).

Suspendeu-se 0,5g de amostra e ajustou-se o pH com NaOH ou HCl 0,1N. As suspensões foram agitadas por uma hora com controle do valor de pH, e após centrifugação das suspensões, foi determinada a proteína solúvel no sobrenadante pelo método de Kjeldahl (semi-micro), onde a % proteína = % nitrogênio x 6,38 para WPI e 5,5 para HCB (AOAC, 1990). A porcentagem de proteína solúvel foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ SP} = \frac{\text{concentração de proteína no sobrenadante (mg/mL)} \times 50}{\text{peso da amostra (mg)} \times \frac{\text{conteúdo de proteína da amostra (\%)}}{100}}$$

Determinação de aminoácidos totais

Para identificação e quantificação dos aminoácidos, as amostras foram hidrolisadas com HCl 6N em tubos de hidrólise, seladas à vácuo e mantidas a 110°C por 22 horas. Após a incubação, o ácido clorídrico foi então evaporado e fez-se a recuperação da amostra em tampão citrato pH 2,2. Uma alíquota de 25µL foi injetada no analisador (Dionex Dx-300), para separação dos aminoácidos em coluna de troca catiônica e reação colorimétrica pós-coluna com ninidrina (SPACKMAN *et al.*, 1958). Solução padrão de aminoácidos Pierce (EUA) foi utilizada como referência. O aminoácido triptofano, que é destruído durante a

hidrólise ácida, foi quantificado segundo SPIES (1967). Esta determinação foi realizada pelo Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas-SP, nas seguintes amostras: WPI, HCB e na mistura de 60% WPI: 40% HCB.

2.2.2. Avaliação nutricional em ratos – protocolo experimental

A realização de ensaios biológicos executados com ratos, conforme descrito por SGARBIERI (1996) para avaliação nutricional, teve como objetivo a obtenção de uma mistura protéica adequada (elaborada a partir de diferentes proporções de WPI e de HCB), quanto ao perfil de aminoácidos essenciais e sua influência no crescimento e desenvolvimento dos animais.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ensaio Biológicos do Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP), Campinas-SP. Foram utilizados para o primeiro experimento 54 ratos e para o segundo 32 ratos, machos da linhagem Wistar livres de patógenos específicos (SPF), recém-desmamados, com 21 dias de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

O primeiro ensaio com ratos teve a duração de 3 semanas (21 dias), utilizou-se 9 grupos com 6 animais, cada um recebendo dieta contendo 12% de proteína fornecida pelas diferentes fontes (caseína, WPI, hidrolisado de colágeno suíno (HCS), hidrolisado de colágeno bovino (HCB), mistura de 20% WPI: 80% HCB, mistura de 40% WPI: 60% HCB, mistura de 60% WPI: 40% HCB, mistura de 80% WPI: 20% HCB e um grupo em dieta sem proteína (aprotéica), conforme ilustrado na Figura 2.1. Este último grupo serviu para determinação da perda de peso corporal durante todo o experimento, dado necessário para o cálculo do NPR (quociente de eficiência líquida da proteína), assim como para o cálculo de nitrogênio fecal endógeno (origem corporal) utilizado na transformação do índice

de digestibilidade aparente da proteína em digestibilidade verdadeira. Através desse ensaio também obteve-se o valor do PER (quociente de eficiência protéica), o escore de aminoácidos essenciais (EAE) e PDCAAS (*Protein Digestibility Corrected Amino Acid Scoring*).

No segundo ensaio os ratos foram distribuídos em 4 grupos com 8 animais, cada um recebeu dieta com 12% de proteína fornecidas pelas diferentes fontes (caseína, WPI, a mistura 40% HCB : 60% WPI e a mistura 50%HCB : 50% WPI), de acordo com a Figura 2.2. O experimento teve a duração de 10 dias e teve como objetivo a obtenção do nitrogênio urinário e fecal para o cálculo do balanço de nitrogênio, da digestibilidade aparente, do valor biológico aparente e da utilização líquida da proteína (NPU).

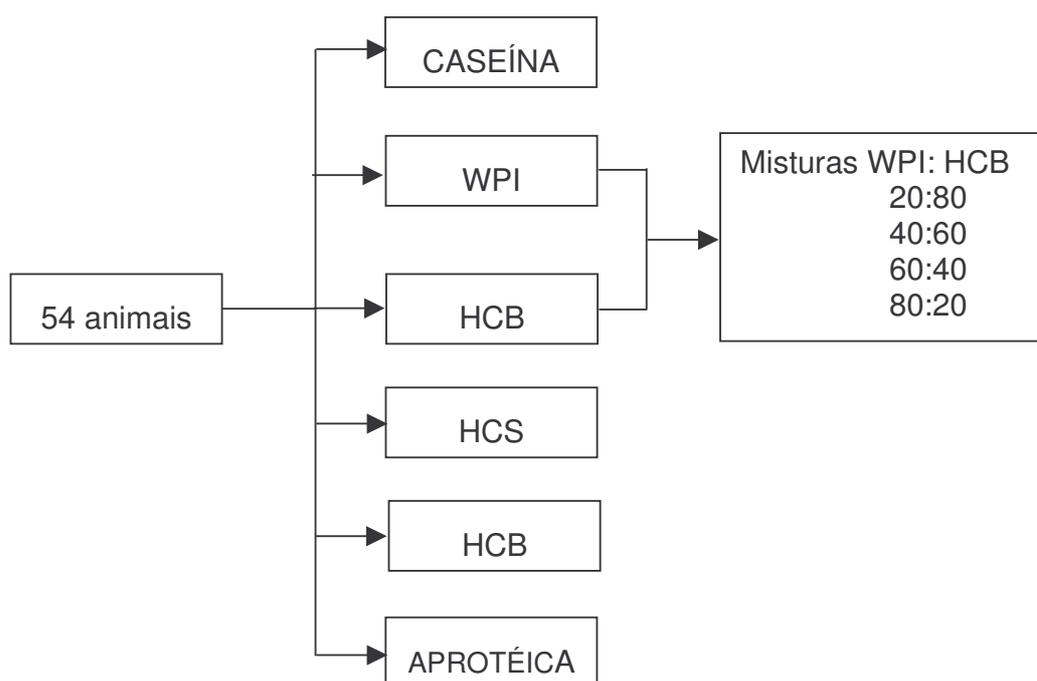


FIGURA 2.1 Esquema experimental do primeiro ensaio biológico com ratos Wistar durante o período de 21 dias.

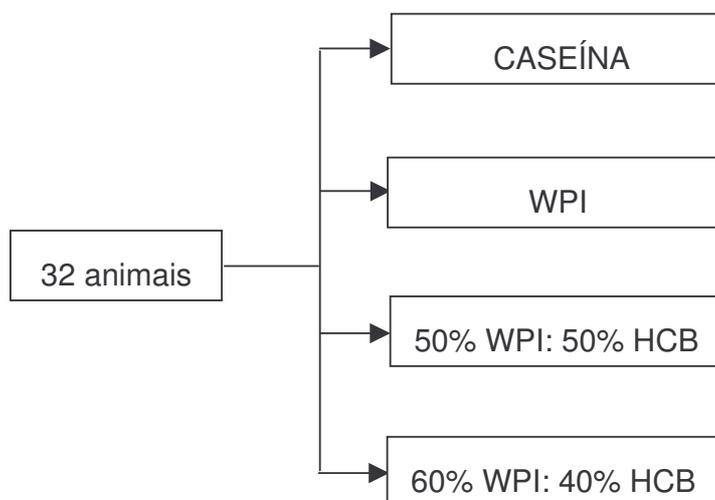


FIGURA 2.2 Esquema experimental do segundo ensaio biológico com ratos Wistar durante o período de 10 dias.

Após a pesagem inicial, os animais foram mantidos em gaiolas individuais contendo dieta e água à vontade (Figura 2.3). Os ratos foram divididos em grupos e mantidos com dieta comercial (*ad libitum*) por um período de aclimatização de 6 dias para o 1º ensaio e de 4 dias para o 2º. Após esse período utilizou-se nos ensaios as dietas experimentais formuladas conforme REEVES; NIELSEN e FAHEY (1993). As condições ambientais do biotério foram controladas a fim de manter a temperatura em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e períodos alternados de claro e escuro de 12 horas.

O critério para distribuição dos animais aos grupos foi feito de acordo com o peso. Todos os animais foram pesados antes do início do experimento e os animais de maior e menor pesos (extremos) foram excluídos. Realizou-se o sorteio de forma aleatória dos grupos e dos seus respectivos animais até completar o número desejado.



FIGURA 2.3 Gaiolas individuais utilizadas nos ensaios biológicos, onde os animais permaneceram com comida e água *ad libitum*. **a)** gaiolas individuais usadas no 1º experimento e **b)** gaiolas metabólicas e também individuais usadas no 2º experimento.

Composição e preparo das dietas

Todas as dietas foram preparadas segundo as especificações da AIN-93 G (REEVES; NIELSEN e FAHEY, 1993), exceto pela concentração de proteína, a qual foi mantida em 12% para todos os grupos e, pelo uso de L-cistina apenas no grupo que recebeu dieta padrão (caseína comercial). A compensação para 100% foi feita pelo aumento de 5% de carboidrato.

A L-cistina é utilizada na AIN-93 G para complementar a quantidade de aminoácidos sulfurados, os quais estão presentes na caseína em quantidades inferiores as recomendações. Nos demais grupos experimentais não se usou L-cistina com a finalidade de verificar se o isolado protéico de soro de leite bovino, rico em aminoácidos sulfurados, conseguiria melhorar o perfil nutricional do

hidrolisado de colágeno bovino, o qual é pobre nesses aminoácidos. A composição da dieta padrão está representada na Tabela 2.1.

TABELA 2.1 Composição básica da dieta, segundo AIN-93 G para ratos em crescimento.

Componentes	g/Kg
Amido de milho	397,5
Fonte de Proteína (17%)	200,0
Amido dextrinizado	132,0
Sacarose	100,0
Óleo de soja	70,0
Fibra	50,0
Mistura mineral	35,0
Mistura vitamínica	10,0
L- cistina	3,0
Bitartarato de colina	2,5
Tert-butil-hidroquinona	0,014

Fonte: REEVES; NIELSEN e FAHEY (1993).

A caseína utilizada como fonte protéica da dieta padrão era proveniente da empresa M. Cassab Ltda - SP, e continha 79,7% de proteína bruta no 1º ensaio biológico e 79,1% no 2º ensaio. O amido de milho era proveniente de Corn Products Brasil 3408; o amido dextrinizado de Corn Products Brasil 1910; a sacarose foi o Açúcar União®; o óleo de soja era da marca Soya®; a fibra celulose Arbocel; a L-cistina Synth; o bitartarato de colina Sigma; o tert-butilhidroquinona Sigma. As misturas vitamínicas (M. Cassab Ltda, SP) e minerais (Roche) foram preparadas segundo as especificações da AIN-93 G e estão descritas nas Tabelas 2.2 e 2.3, respectivamente.

TABELA 2.2 Formulação da mistura vitamínica AIN-93 VX

Componentes	g/Kg
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	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-rac- α -tocoferol (E) (500 UI/g)	15,00
Palmitato de all-trans-retinol (A) (500.000 UI/g)	0,800
Colicalciferol (D ₃) (400.000 UI/g)	0,250
Filoquinona (vitamina K)	0,075
Sacarose	974,655

Fonte: REEVES; NIELSEN e FAHEY (1993).

TABELA 2.3 Mistura mineral AIN G -MX

Componentes	g/Kg
<i>Elementos Minerais Essenciais</i>	
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; 60,665 Cl	74,00
Sulfato de potássio - 44,87% K; 18,39% S	46,60
Óxido de magnésio – 60,32% Mg	24,00
Citrato Férrico – 16,5% Fe	6,06
Carbonato de zinco – 52,14% Zn	1,65
Carboanto de manganês – 47,70% Mn	0,63
Carbonato de cobre – 57,47% Cu	0,30
Iodeto 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
<i>Elementos minerais potencialmente benéficos</i>	
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 – 42,24% F	0,0635
Carbonato de níquel – 45% Ni	0,0318
Vanadato de amônio – 43,55% V	0,0066
Sacarose	221,026

Fonte: REEVES; NIELSEN e FAHEY (1993).

Determinação do valor nutritivo da proteína

Fez-se o controle do consumo de dieta para os cálculos de dosagem de nitrogênio e os dados de consumo e ganho de peso das 3 semanas foram utilizadas para o cálculo de PER_{op} (PER operacional) e NPR. As fezes foram coletadas a partir da segunda semana do experimento, as quais foram utilizadas para o cálculo da digestibilidade da proteína. Em ambos experimentos, a coleta das fezes foi cuidadosamente realizada, separando-as de possíveis contaminantes (partículas de alimento, pêlos etc.) secas em estufa à temperatura de 105 °C para moagem posterior e análises.

Para os cálculos do balanço de nitrogênio (BN), valor biológico aparente (VB_a) e utilização líquida da proteína (NPU) os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais com controle da ingestão da dieta para obtenção do nitrogênio ingerido e para coletar separadamente a urina e as fezes (nitrogênio excretado), sendo que esses materiais só foram recolhidos a partir do 5º dia do experimento.

Cada gaiola metabólica foi preparada com um tecido de malha bem estreita para evitar a contaminação das fezes e da urina com a dieta, bem como, gaze levemente umedecida com água na ponta dos funis das gaiolas com o mesmo objetivo. Para a coleta de urina utilizou-se ácido sulfúrico a 20% como conservante para evitar o crescimento de microrganismo e a fermentação da urina durante o período de coleta.

- Determinação da curva de crescimento dos animais

Inicialmente, todos os cochos foram pesados e tarados com posterior adição de dieta. A cada dois dias esses cochos eram retirados das gaiolas, pesados e recolocava-se mais dieta, tomando-se o cuidado de considerar as

perdas nas bandejas, que também foram pesadas no início do experimento. Assim, foi realizado o controle da ingestão pelos animais, os quais eram pesados de dois em dois dias, para o acompanhamento dos seus ganhos de peso e posterior elaboração da curva de crescimento durante o 1º experimento.

- Quociente de eficiência protéica (PER)

O PER mede o quociente do ganho de peso em gramas pela quantidade de proteína ingerida também em gramas, de um grupo de animais submetidos à dieta contendo a proteína em estudo conforme a expressão abaixo:

$$PER = \frac{\text{ganho de peso(g)}}{\text{proteína consumida (g)}}$$

A metodologia convencional recomenda ensaio de 4 semanas para o PER. Portanto, neste ensaio, realizado com 3 semanas, o PER deve ser interpretado como operacional (PER_{op}).

- Quociente de eficiência líquida da proteína (NPR)

Este método constitui apenas uma modificação do PER e consiste em somar ao ganho de peso do grupo que recebe a dieta protéica a perda de peso de um grupo equivalente que recebeu dieta aprotéica. A relação que permite o cálculo do NPR é a seguinte:

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

Onde:

GI = grupo em dieta protéica

GII = grupo em dieta aprotéica

- Digestibilidade aparente (D_a) e verdadeira (D_v)

A digestibilidade é a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos ou qualquer outro composto nitrogenado. A expressão utilizada no cálculo para a D_a foi a seguinte:

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

Onde:

D_a = Digestibilidade aparente

NI = Nitrogênio ingerido

NF = Nitrogênio fecal

A digestibilidade verdadeira é determinada pela medida do nitrogênio ingerido com a dieta e o nitrogênio eliminado nas fezes, levando-se em consideração o nitrogênio proveniente do próprio animal que é excretado nas fezes juntamente com a proteína de origem alimentar não digerida. A D_v é calculada segundo a expressão:

$$D_v = \frac{NI - NFa}{NI} \times 100$$

Onde:

$NFa = NF - NFe$

D_v = Digestibilidade verdadeira

NI = Nitrogênio ingerido

NFa = Nitrogênio fecal de origem alimentar

NFe = Nitrogênio fecal de origem endógena

- Balanço nitrogenado (BN)

Os animais são colocados em gaiolas metabólicas individuais para fazer a coleta de fezes e urina isentas de contaminação.

Na fase inicial, considerada de adaptação à dieta, não se coleta material para análise. Na fase final, determina-se a quantidade de nitrogênio ingerido, através do consumo da dieta ao mesmo tempo em que se coletam fezes e urina para determinação do nitrogênio excretado. O BN é obtido pela expressão:

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

Onde:

BN = Balanço de Nitrogênio

NI = Nitrogênio ingerido

NF = Nitrogênio fecal total

NU = Nitrogênio urinário total

- Valor biológico aparente (VB_a)

É um dos índices mais antigos empregados na determinação do valor nutritivo de proteína, sendo obtido através da equação:

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

- Utilização líquida da proteína (NPU)

O NPU é definido pela equação:

$$\text{NPU} = \frac{\text{N retido}}{\text{NI}} \times 100$$

Onde:

N retido = NA – NU

NA = NI – NF

NA = Nitrogênio absorvido

- Escore químico

O escore químico de aminoácidos essenciais (EAE) foi determinado relacionando a concentração de cada um dos aminoácidos essenciais das frações protéicas em estudo com os aminoácidos padrão de referência da FAO/WHO (1990), de acordo com a metodologia de HENLEY e KUSTER (1994), pela seguinte expressão:

$$\text{EAE} = \frac{\text{mg de aminoácidos / g proteína teste}}{\text{mg de aminoácidos / g proteína padrão ou referência}}$$

Segundo SGARBIERI (1996), este quociente indicará: I) ordem dos aminoácidos limitantes na proteína em estudo, em relação à referência ou proteína padrão; II) o valor encontrado para o aminoácido mais limitante é uma estimativa do valor biológico da proteína em estudo em relação à referência ou proteína padrão.

- Escore químico corrigido pela digestibilidade verdadeira (PDCAAS)

Este índice descrito por HENLEY e KUSTER (1994) avalia a qualidade da proteína em estudo, através do produto entre o escore de aminoácidos essenciais (EAE) do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), do hidrolisado de colágeno bovino (HCB), da mistura de 20% WPI: 80% HCB, da mistura de 40% WPI: 60% HCB, da mistura de 60% WPI: 40% HCB e da mistura de 80% WPI: 20% HCB, pela digestibilidade verdadeira (D_v), através da seguinte fórmula:

$$PDCCAS = EAE \times D_v$$

Onde:

D_v = digestibilidade verdadeira

EAE = escore químico de aminoácidos essenciais

2.2.3. Análise estatística

Todos os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias, pelo teste de Tukey (GOMES, 1982), utilizando-se o programa “*Statística: Basic Statistics and Tables*”.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição centesimal

Na Tabela 2.4 está apresentada a composição centesimal dos produtos estudados. Pode-se observar que o componente de maior concentração foi a proteína para as duas amostras, em torno de 92%, não diferindo estatisticamente.

TABELA 2.4 Composição centesimal do isolado protéico do soro de leite bovino (WPI) e do hidrolisado de colágeno bovino (HCB).

<i>Componentes</i> (%)	<i>WPI</i>	<i>HCB</i>
Proteína bruta (N x F) ¹	92,36 ± 0,42 ^a	91,00 ± 0,29 ^a
Lipídios totais	0,70 ± 0,12	ND
Cinzas	1,58 ± 0,04 ^a	0,39 ± 0,09 ^b
Umidade	5,09 ± 0,13 ^b	6,98 ± 0,10 ^a
Carboidrato ²	0,27	ND

¹F: WPI = 6,38; HCB = 5,55. ² Calculado por diferença = 100 – (proteína + lipídios totais + cinzas + umidade). ND = Não Determinado. Resultados são média de 3 determinações analíticas. Médias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A quantidade de proteína, lipídios e carboidrato do WPI está de acordo com a literatura, a qual caracteriza esse produto como isolado protéico por apresentar uma concentração protéica igual ou superior a 90% (MORR e HA, 1993), baixos valores de lipídios (0,5 – 1,0%) e carboidrato, principalmente na forma de lactose (máximo de 1%) de acordo com U.S. DAIRY EXPORT COUNCIL (1997).

Além disso, observa-se que a concentração de minerais no WPI é superior estatisticamente a encontrada no HCB, podendo-se justificar através de sua

constituição, a qual apresenta cálcio (600mg/100g); potássio (300mg/100g); sódio (250mg/100g); fósforo (210mg/100g) e ferro (9,3mg/100g), quantidades significativas, perfazendo um total que varia entre 2,0 a 3,0% conforme U.S. DAIRY EXPORT COUNCIL (1997).

SCHOTT (1998) descreve o hidrolisado de colágeno bovino como um produto com alto conteúdo protéico (84 – 86%) e, praticamente, isento de lipídios e carboidratos. Dessa forma, verifica-se que o produto avaliado possui um teor protéico levemente superior, mas condizente com a literatura. Por apresentar apenas traços de lipídios e carboidratos, os mesmos não foram determinados.

3.2 Determinação do grau de hidrólise (GH)

Na Figura 2.4 está representada a curva padrão de L-leucina utilizada para a determinação do grau de hidrólise (GH) através do método do TNBS e na Tabela 2.5 estão os valores obtidos do GH para o hidrolisado de colágeno bovino.

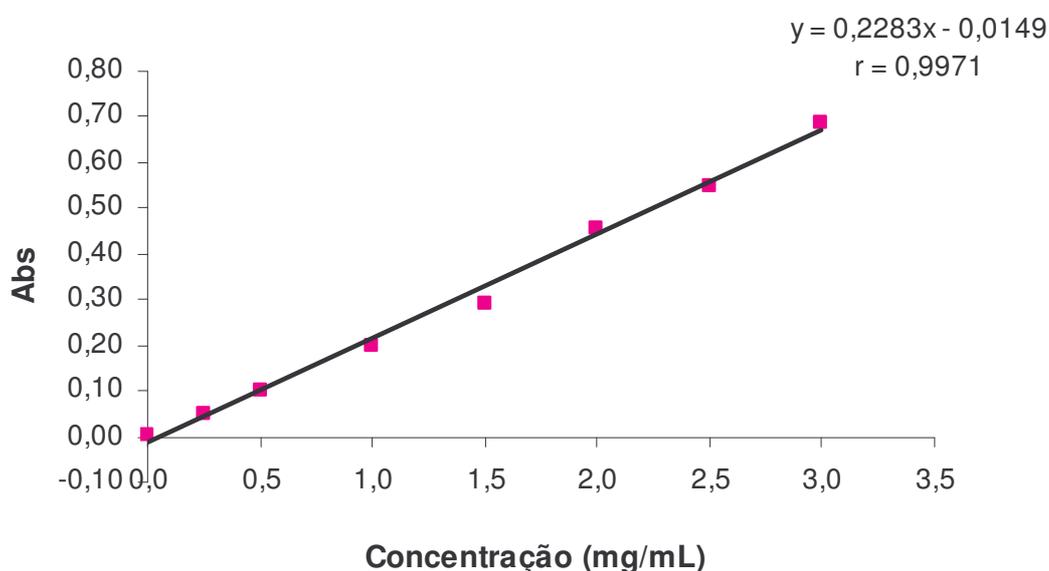


FIGURA 2.4 Curva padrão de leucina utilizada para a determinação do grau de hidrólise (GH) através do método do TNBS para o hidrolisado de colágeno bovino.

Segundo PANYAM e KILARA (1996), uma das principais conseqüências da hidrólise enzimática é o aumento da solubilidade e, normalmente, este aumento está associado ao aumento do grau de hidrólise. Dessa forma, a utilização de uma fonte protéica hidrolisada é mais indicada para a formulação de um produto em pó para ser reconstituído devido sua maior solubilidade.

TABELA 2.5 Determinação do grau de hidrólise (%GH) pelo método do TNBS

Amostra	Ptn bruta mg/mL *%ptn	Abs	GH (NH ₂ /g/11,1)*100	Média (%)
HCB	0,4550	0,1046	10,364	10,99
	0,4550	0,1190	11,613	

Resultados apresentados como média de duas repetições. Para determinação do GH utilizou-se a equação da Figura 2.4, onde y representa os valores de absorbância e x representa a concentração de grupos NH₂ equivalentes. O valor 11,1 mM/g representa o número de equivalentes de ligações peptídicas por unidade de massa protéica para a gelatina.

O valor do grau de hidrólise do HCB fornecido pelo fabricante foi de 13,0% e o valor encontrado pelo método TNBS foi de 10,99%, caracterizando um produto de grau de hidrólise médio.

3.3. Solubilidade

A solubilidade é considerada uma propriedade física e tecnológica muito importante na formulação de alimentos, além de influenciar as demais propriedades das proteínas.

Segundo HUFFMAN (1996) o WPI apresenta boa solubilidade em uma larga faixa de pH, temperatura, concentração de proteína, atividade de água e força iônica. Dessa forma, testou-se a influência do pH e força iônica na solubilidade dessa proteína e pode-se verificar a pequena influência dessas variáveis, pois a solubilidade manteve-se elevada variando de 91,1 à 99,7% conforme a Tabela 2.6 e Figura 2.5.

Esses altos valores de solubilidade encontrados no presente estudo para o WPI estão de acordo com a literatura, a qual evidencia que a solubilidade dos isolados com alto teor de proteína nativa é superior a 90% (LAW e LEAVER, 1999).

TABELA 2.6 Valores obtidos para a solubilidade do isolado protéico de soro de leite bovino a 25 °C com variação do pH e da concentração de sal (NaCl).

pH	NaCl 0,00M	NaCl 0,05M	NaCl 0,10M	NaCl 0,15 M	NaCl 0,20M
2	96,05±1,31 ^{Aa}	95,47±1,15 ^{Ba}	95,24±0,98 ^{Ba}	96,55±0,66 ^{Ba}	94,38±0,61 ^{ABa}
4	95,07±1,07 ^{Ab}	96,51±0,45 ^{Bb}	96,96±1,42 ^{Bab}	99,24±0,31 ^{Aa}	91,12±1,70 ^{Cc}
6	95,96±1,00 ^{Aa}	97,42±1,04 ^{ABa}	96,57±1,61 ^{Ba}	96,46±1,57 ^{Ba}	96,64±0,75 ^{Aa}
8	93,83±0,81 ^{Ab}	99,31±0,99 ^{Aa}	99,70±0,87 ^{Aa}	93,50±1,53 ^{Cb}	92,37±1,10 ^{BCb}

Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

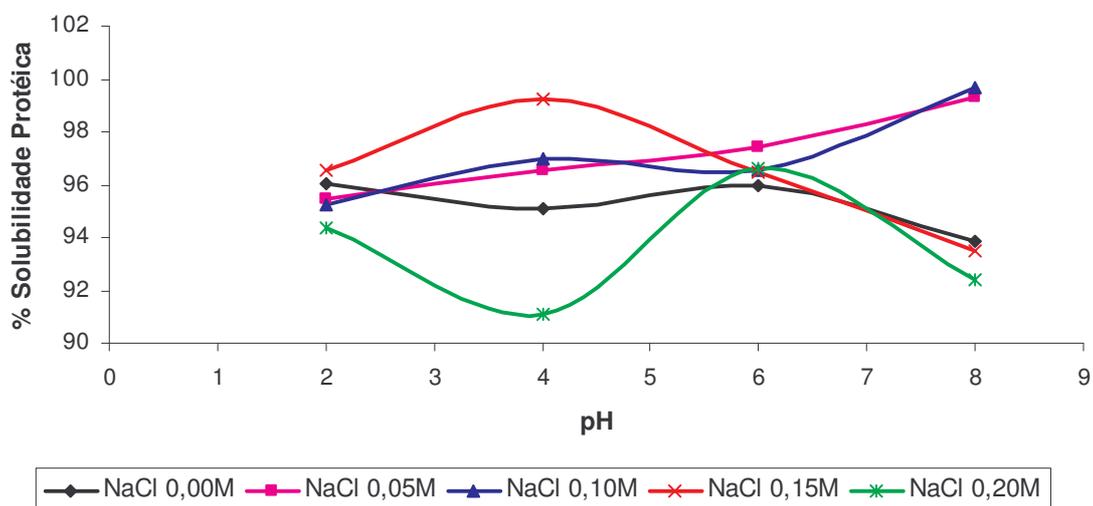


FIGURA 2.5 Representação do perfil de solubilidade do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) a 25 °C, em diferentes pHs e concentrações de cloreto de sódio.

Em um estudo realizado por MORR (1992), avaliando a solubilidade de três isolados protéicos de soro de leite comerciais com teor de proteína variando de 88,6 a 92,7%, o autor encontrou valores de solubilidade em pH 7,0 iguais ou superiores a 98%.

As proteínas do soro permanecem solúveis em torno do seu ponto isoelétrico (pI), ou seja, na faixa de pH entre 4 e 5 segundo MORR e HA (1993) ou conforme GIESE (1994) entre 4 e 6. Pode-se verificar através da Figura 2.5 que na faixa de pH entre 4 a 6 não houveram diminuições dos valores de solubilidade encontrados para todos os tratamentos, exceto para NaCl 0,15M que foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) no pH 4 (99,24%) e 0,20M (91,12%), embora todos os valores permaneçam elevados.

A solubilidade em água do WPI não sofreu influência significativa na faixa de pH testada (2,0 a 8,0). Nos tratamentos com NaCl 0,05M e 0,1M observou-se uma elevação na solubilidade com o aumento do pH, com os maiores valores em pH 8 ($99,3 \pm 0,1$ e $99,7 \pm 0,9$, respectivamente). Já nos tratamentos com concentração salina de 0,15M e 0,2M verificou-se que a solubilidade diminuiu em pH 8.

Com força iônica ou concentração salina baixa, a solubilidade das proteínas tende a aumentar, fenômeno conhecido como 'salting in'; porém, à medida que se eleva à concentração salina além de certos limites, as proteínas tendem a se insolubilizar e a precipitar ('salting out') (SGARBIERI, 1996). Pode-se observar que o aumento da concentração salina até 0,2M não foi suficiente para que ocorresse o fenômeno de "salting out" e conseqüentemente a diminuição da solubilidade das duas amostras protéicas testadas no presente estudo. Conforme VOJDANI (1996), o "salting out" ocorre em concentrações salinas superiores a 1M devido ao aumento de interações hidrofóbicas e também pela competição da proteína e dos íons salinos pela água.

Na Tabela 2.7 e Figura 2.6 estão representadas os valores de solubilidade do hidrolisado de colágeno bovino com as respectivas variações de pH e concentração salina. Pode-se verificar que embora elevados, os valores de solubilidade do HCB são inferiores aos encontrados para o WPI na maioria dos pHs e concentrações de NaCl testadas.

No entanto, quando se compara uma fonte protéica nativa e sua forma hidrolisada verifica-se um aumento da solubilidade dos hidrolisados. Isso provavelmente ocorre devido à diminuição do tamanho da molécula e correspondente aumento da exposição de grupos amino e carboxil ionizáveis com incremento concomitante na hidrofiliabilidade, bem como, da carga líquida da molécula (MAHMOUD, 1994; DAS e KINSELLA, 1990). MAMANI (2004) observou baixos valores de solubilidade (18-42%) para a gelatina nativa em função de diferentes valores de pH testados (3,0 a 8,0). Depois de hidrolisar a gelatina (GH) com tripsina, obteve 100% de solubilidade em todos os valores de pH estudados.

TABELA 2.7 Valores obtidos para solubilidade do hidrolisado de colágeno bovino em água a 25 °C com variação do pH e da concentração de sal (NaCl).

pH	NaCl 0,00M	NaCl 0,05M	NaCl 0,10M	NaCl 0,15 M	NaCl 0,20M
2	86,03±0,86 ^{Ab}	81,57±2,18 ^{Cc}	84,35±1,47 ^{Bbc}	91,43±1,52 ^{Aa}	93,27±0,50 ^{Aa}
4	85,99±0,82 ^{Ac}	87,49±4,58 ^{Bbc}	84,76±3,08 ^{Bc}	94,73±1,31 ^{Aa}	91,65±0,51 ^{Aab}
6	84,43±2,97 ^{Ab}	92,35±2,67 ^{Aa}	84,90±2,07 ^{Bb}	93,62±1,48 ^{Aa}	91,51±0,45 ^{Aa}
8	84,24±1,00 ^{Ab}	92,62±1,23 ^{Aa}	94,02±2,18 ^{Aa}	94,91±1,20 ^{Aa}	92,64±1,01 ^{Aa}

Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim como para o WPI, a solubilidade em água do HCB não sofreu influência significativa na faixa de pH testada (2,0 a 8,0). O mesmo aconteceu com os tratamentos de NaCl 0,15M e NaCl 0,2M. Já com as concentrações salinas

mais baixas (0,05M e 0,1M) verificou-se um aumento estatisticamente significativo na solubilidade com a elevação do pH.

No entanto, para o HCB a maior solubilidade deu-se em NaCl 0,15M, em todos os valores de pH testados conforme pode ser verificado através da Figura 2.6.

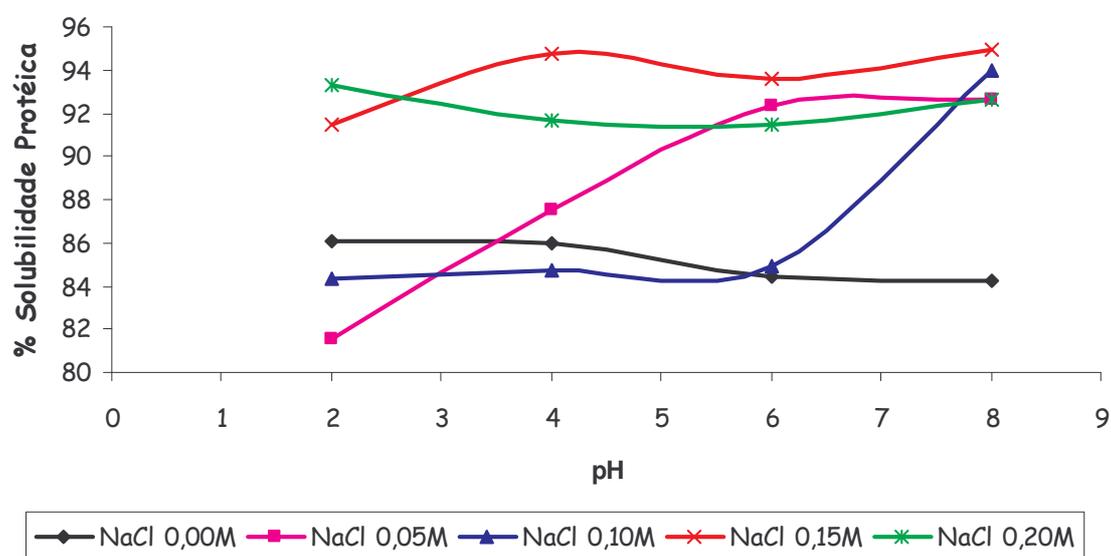


FIGURA 2.6 Representação do perfil de solubilidade do hidrolisado de colágeno bovino (HCB) a 25 °C, em diferentes pHs e concentrações de solução de cloreto de sódio.

Para a mistura protéica de 60%WPI: 40%HCB optou-se por verificar a influência da concentração de proteínas na solubilidade, uma vez que tanto o WPI como o HCB obtiveram excelente solubilidade nos valores de pH e concentrações iônicas testadas. Os resultados estão representados na Tabela 2.8 e Figura 2.7.

Obteve-se elevada solubilidade da mistura 60%WPI: 40%HCB a 2,5; 5 e 10% de concentração, que não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Embora

as demais concentrações testadas tenham sido inferiores estatisticamente, todos os valores de solubilidade foram elevados, variando de 94,2 – 99,7%.

TABELA 2.8 Valores obtidos para a solubilidade da mistura 60%WPI: 40%HCB em água a 25 °C com variação da concentração da mistura em porcentagem.

<i>Concentração da Mistura (%)</i>	<i>%SP</i>
1,25	94,17±0,55 ^c
2,5	99,93±2,38 ^a
5	99,57±1,55 ^a
10	99,68±1,67 ^a
15	96,98±0,92 ^b
20	97,88±0,64 ^{ab}

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

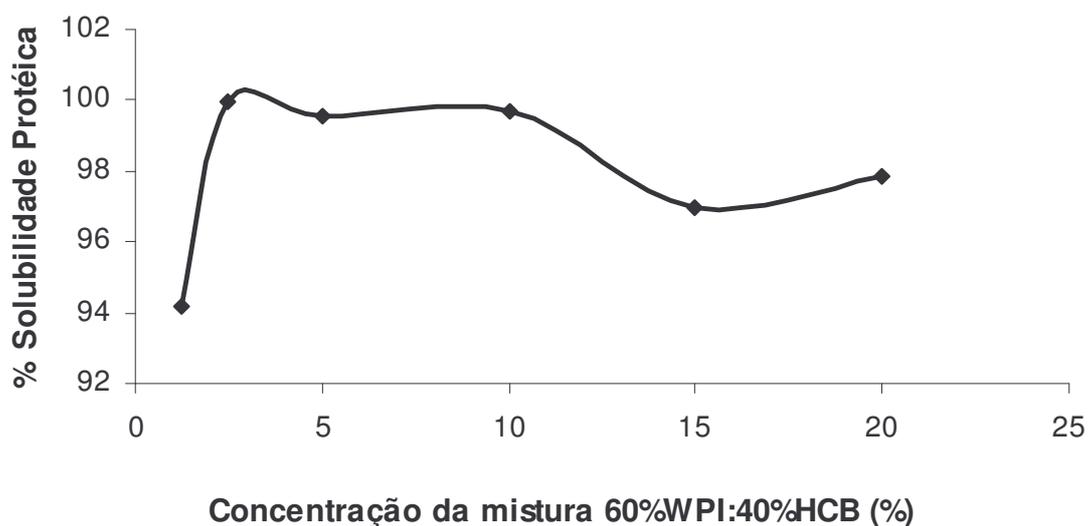


FIGURA 2.7 Representação do perfil de solubilidade da mistura 60%WPI: 40%HCB em água a 25 °C com variação da quantidade da mistura em gramas.

3.4. Composição de aminoácidos

Na Tabela 2.9 estão representados os valores dos perfis de aminoácidos totais (g por 100g de proteína) do WPI e HCB.

TABELA 2.9 Valores obtidos para os aminoácidos totais (g por 100g de proteína) do isolado protéico do soro de leite bovino (WPI) e hidrolisado de colágeno bovino (HCB).

Aminoácidos (g/100g de proteína)	WPI	HCB
Ac. Aspártico	11,46	8,43
Treonina	4,72	2,28
Serina	3,76	3,71
Ac. Glutâmico	17,62	11,32
Prolina	4,11	13,33
Glicina	1,62	24,52
Alanina	5,26	9,65
Cistina	3,07	não detectado
Valina	4,77	2,82
Metionina	2,53	0,21
Isoleucina	4,99	1,7
Leucina	12,81	3,67
Tirosina	3,45	0,72
Fenilalanina	3,36	2,16
Lisina	10,23	4,03
Histidina	2,0	0,65
Triptofano	2,82	0,02
Arginina	2,36	8,15

As proteínas do soro de leite vêm sendo utilizadas freqüentemente devido ao seu alto valor nutritivo, uma vez que as mesmas possuem proporcionalmente

maior teor de aminoácidos sulfurados que a caseína e um excedente de aminoácidos essenciais como lisina, treonina, metionina e isoleucina (Tabela 2.10), os quais estão constantemente limitados em proteínas vegetais (SLOAN, 2002).

Já o hidrolisado de colágeno contém 18 aminoácidos, destacando-se a glicina, alanina, prolina e hidroxiprolina, porém essa proteína apresenta deficiências em alguns aminoácidos essenciais, fazendo com que a mesma não possa suprir o requerimento completo desses aminoácidos para a síntese de proteínas teciduais DJAGNY *et al.* (2001).

Segundo FRIEDMAN (1996), a disponibilidade de alguns aminoácidos pode ser alterada quando a integridade química e/ou estrutural da proteína é modificada. Esta modificação conformacional pode estar relacionada com a resistência ao calor durante o processamento, altos valores de pH e reação de oxidação. Estes tratamentos podem limitar a disponibilidade da proteína com relação a certos aminoácidos como a lisina, treonina, metionina e triptofano, e assim interferir no valor da proteína em questão.

Na Tabela 2.10 encontram-se os valores dos perfis de aminoácidos essenciais (g por 100g de proteína) do WPI e HCB, comparados com o padrão da FAO/WHO (1990), bem como das misturas em diferentes proporções entre o WPI e o HCB. Pode-se verificar através dessa tabela que as proteínas do soro de leite bovino são de elevada qualidade nutricional, pois contêm em quantidades variáveis e em proporção adequada todos os aminoácidos que o organismo humano necessita, obtendo-se um EAE acima de 1,0.

Por outro lado, o hidrolisado de colágeno é considerado uma proteína incompleta, pois é deficiente no aminoácido essencial triptofano, contendo quantidades muito baixas dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) e tirosina. Dessa forma, o valor nutricional do hidrolisado de colágeno só é

estabelecido quando consumido em combinação com outra proteína ou misturas de proteínas, o que ocasiona um aumento no seu valor nutritivo.

O EAE observado nas misturas protéicas aumenta com a maior proporção de WPI, aproximando-se do ideal com 80% WPI: 20% HCB.

TABELA 2.10 Escore de aminoácidos essenciais (EAE) calculados com base no padrão de referência da FAO/WHO (1990).

AA essenciais (g/100g proteína)	Padrão ¹ FAO/WHO	WPI	HCB	WPI:HCB 20:80	WPI:HCB 40:60	WPI:HCB 60:40	WPI:HCB 80:20
Treonina	3,4	4,7	2,3*	2,8*	3,3*	3,6	4,23
Met.+ Cistina	2,5	5,6	0,2*	1,3*	2,4*	3,6	4,52
Valina	3,5	4,8	2,8*	3,2*	3,6	3,8	4,38
Leucina	6,6	12,8	3,7*	5,5*	7,3	9,0	10,98
Isoleucina	2,8	5,0	1,7*	1,7*	3,0	3,6	4,33
Fenil. + Tirosina	6,3	6,8	3,1*	3,8*	4,6*	5,1*	6,07*
Lisina	5,8	10,2	4,0*	5,3*	6,5	7,7	8,99
Histidina	1,9	2,0	0,6*	0,9*	1,2*	1,4*	1,7*
Triptofano	1,1	2,8	0,0	0,6*	1,1	1,7	2,26
EAE*	-	1,0	0,0	0,5	0,7	0,8	0,9

Aminoácido limitante; EAE, escore de aminoácidos essenciais (aminoácido mais limitante); WPI, isolado protéico do soro de leite bovino; HCB, hidrolisado de colágeno bovino; WPI:HCB, diferentes proporções das duas proteínas, ¹ Referência (FAO/WHO, 1990).

3.5. Avaliação Nutricional

A caracterização nutricional tanto do WPI como do HCB foi feita com base na composição de aminoácidos, no escore de aminoácidos essenciais tendo por padrão de referência o perfil recomendado pela FAO/WHO (1990) e no ensaio com animais em que foram determinados digestibilidade aparente (D_a) e verdadeira (D_v), quociente de eficiência da proteína (PER), quociente de eficiência

líquida da proteína (NPR), do balanço de nitrogênio (BN), do valor biológico aparente (VB_a) e da utilização líquida da proteína (NPU), tendo como referência a caseína comercial (M. Cassab Ltda).

3.5.1 Parâmetros avaliados no 1º ensaio biológico: Curvas de crescimento, quociente de eficiência da proteína (PER), quociente de eficiência líquida da proteína (NPR) e digestibilidade verdadeira (D_v)

Determinou-se uma perda de peso média (27,8%) dos animais em dieta aprotéica, 16,4% e 19,3% respectivamente nos grupos que receberam como única fonte de proteína hidrolisado de colágeno suíno ou bovino. Embora esses percentuais sejam mais baixos que o ocorrido com o grupo em dieta aprotéica, esses valores de perda são significativos e salientam a importância de não se usar exclusivamente colágeno e seus derivados como única fonte protéica, já que os mesmos praticamente não apresentam o aminoácido essencial triptofano, o que afeta a síntese de proteínas e conseqüentemente o crescimento e desenvolvimento adequado dos animais.

O registro do ganho de peso realizado três vezes por semana dos grupos de animais utilizados no 1º ensaio e que receberam WPI ou diferentes combinações de WPI e HCB, durante o período de 21 dias, foi utilizado para a construção de curvas de crescimento médio, ilustradas na Figura 2.8. Nesta figura não constam os dados dos grupos HCS, HCB e do aprotéico, pois nestes casos ocorreram perdas ao invés de ganho de peso.

A dieta de caseína promoveu o maior ganho de peso, seguido das misturas 80% WPI: 20% HCB, 60% WPI: 40% HCB e WPI 100%. As misturas com 60% e 80% HCB apresentam resultados inferiores. Os animais que receberam 80% WPI: 20% HCB foram os únicos que não diferiram do padrão caseína, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Verificou-se também que a mistura 60%WPI: 40%HCB e WPI foram estatisticamente iguais em promover o crescimento dos animais. Portanto, a ordem de capacidade de promover crescimento em ratos foi caseína (CC) igual a 80%WPI: 20%HCB, sendo que WPI ou 60%WPI: 40%HCB não diferiram entre si porém diferiram da caseína ($p < 0,05$).

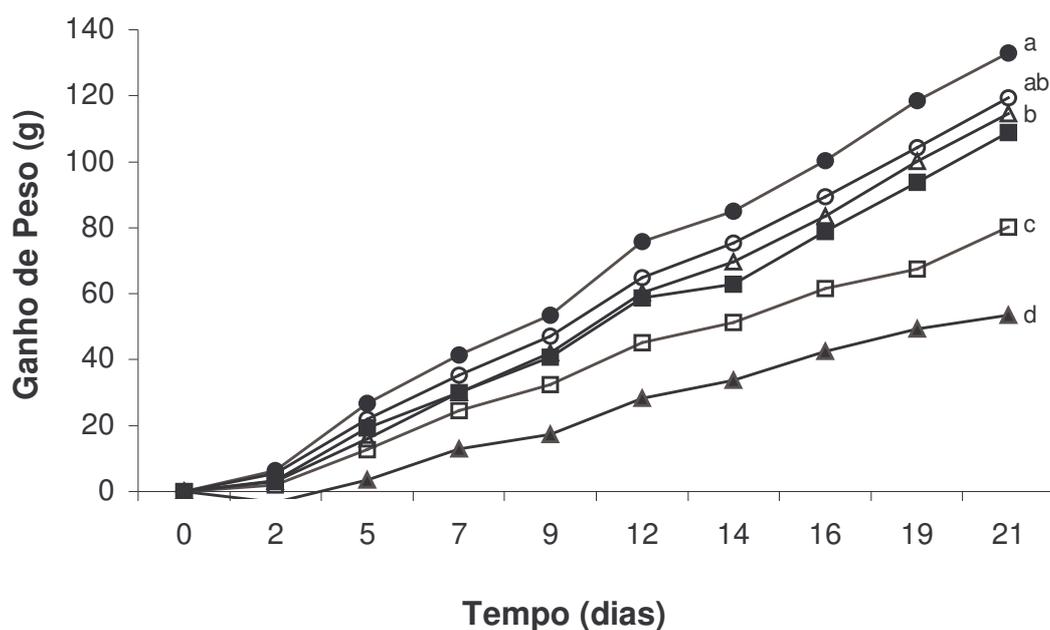


FIGURA 2.8 Curva de crescimento de ratos alimentados por 21 dias com dietas contendo 12% de proteína proveniente de caseína (●); WPI (■); 20%WPI:80% HCB (▲); 40%WPI:60% HCB (□); 60%WPI:40%HCB (△); 80%WPI:20%HCB (○). Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os dados referentes à ingestão de dieta, ingestão de proteína, PER_{op} e NPR avaliados durante o ensaio biológico estão apresentados na Tabela 2.11.

Os resultados obtidos na Tabela 2.11 apresentaram não haver diferença significativa ($p > 0,05$) na ingestão da dieta entre os seguintes tratamentos: caseína; 80% WPI: 20% HCB; WPI e 60% WPI: 40% HCB. Uma ingestão intermediária da dieta foi verificada nos grupos de animais que receberam maior

proporção de hidrolisado de colágeno bovino (60 e 80%). No entanto, quanto à ingestão de proteínas, o tratamento padrão com caseína apresentou-se estatisticamente superior aos demais. Já para os grupos tratados apenas com hidrolisados de colágeno observou-se o menor consumo da dieta e conseqüentemente de proteína, os quais não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

TABELA 2.11 Ingestão de dieta, ingestão de proteína, PER (operacional) e NPR para ratos em dietas com 12% proteína de diferentes fontes.

Fonte Protéica	Ingestão Dieta (g)	Ingestão Proteína (g)	PER operacional	NPR
CC	352,0 ± 19,54 ^a	53,0 ± 2,94 ^a	2,5 ± 0,13 ^{ab}	3,0 ± 0,14 ^a
WPI	329,3 ± 22,11 ^a	45,8 ± 3,08 ^b	2,4 ± 0,12 ^{ab}	2,9 ± 0,12 ^a
HCS	128,1 ± 15,79 ^c	16,7 ± 2,05 ^d	-0,9 ± 0,34 ^d	0,6 ± 0,32 ^d
HCB	113,4 ± 21,74 ^c	15,0 ± 2,87 ^d	-1,1 ± 0,51 ^d	0,6 ± 0,63 ^d
WPI:HCB 20:80	273,3 ± 44,96 ^b	36,4 ± 5,99 ^c	1,4 ± 0,19 ^c	2,1 ± 0,12 ^c
WPI:HCB 40:60	278,9 ± 35,57 ^b	37,6 ± 4,80 ^c	2,1 ± 0,15 ^b	2,8 ± 0,13 ^a
WPI:HCB 60:40	308,9 ± 22,19 ^{ab}	42,1 ± 3,00 ^{bc}	2,7 ± 0,18 ^a	3,3 ± 0,17 ^a
WPI:HCB 80:20	332,4 ± 10,70 ^a	45,8 ± 1,47 ^b	2,6 ± 0,12 ^a	3,2 ± 0,13 ^a

Média de 6 ratos ± desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. CC, caseína comercial; WPI, isolado protéico do soro de leite bovino; HCS, hidrolisado de colágeno suíno; HCB, hidrolisado de colágeno bovino; WPI:HCB, diferentes proporções das duas proteínas (%).

Quanto aos valores de PER_{op} e NPR a dieta contendo 60% WPI: 40%HCB apresentou valores maiores, porém não diferiram estatisticamente dos seguintes

tratamentos: 80% WPI: 20% HCB; caseína comercial e WPI. Os valores mais baixos ($p < 0,05$) foram das dietas com HCS e HCB.

FRIEDMAN (1996), considera de alto valor nutritivo, proteínas com valor de PER acima de 2,0. Dessa forma, as proteínas do soro de leite bovino são consideradas de ótimo valor nutricional.

Existem alguns fatores que podem influenciar os valores de PER, dentre eles, a concentração lipídica da dieta e a concentração protéica. Segundo SGARBIERI (1996), a concentração de proteína ideal para análise do índice de PER está no intervalo de 9 a 12% para a proteína de alto valor nutritivo, onde esta proteína será mais utilizada por estar limitante para o rato em crescimento e assim deve ser preferencialmente utilizada para a síntese de proteínas corporais.

Na Tabela 2.12 estão representados os valores obtidos para nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal, digestibilidade verdadeira e PDCAAS.

TABELA 2.12 Valores obtidos para nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal, digestibilidade verdadeira e PDCAAS para ratos em dietas com 12% proteína de diferentes fontes.

Tratamento	N ingerido (g)	N fecal (g)	D _v (%)	PDCAAS (%)
CC	8,48 ± 0,47 ^a	0,92 ± 0,35 ^a	90,54 ± 4,11 ^b	90,54 ^a
WPI	7,19 ± 0,48 ^b	0,69 ± 0,12 ^{ab}	92,07 ± 1,47 ^b	92,07 ^a
HCS	3,00 ± 0,37 ^c	0,25 ± 0,06 ^{cd}	95,50 ± 1,55 ^a	0,00 ^e
HCB	2,70 ± 0,52 ^c	0,16 ± 0,06 ^d	98,45 ± 2,85 ^a	0,00 ^e
WPI:HCB 20:80	6,39 ± 1,05 ^b	0,58 ± 0,08 ^b	92,69 ± 1,65 ^b	46,34 ^d
WPI:HCB 40:60	6,41 ± 0,82 ^b	0,54 ± 0,21 ^{bc}	93,42 ± 2,84 ^b	65,39 ^c
WPI:HCB 60:40	6,98 ± 0,50 ^b	0,38 ± 0,14 ^{bc}	96,23 ± 2,25 ^a	76,89 ^b
WPI:HCB 80:20	7,38 ± 0,24 ^{ab}	0,62 ± 0,19 ^{ab}	93,18 ± 2,36 ^b	83,86 ^a

Resultados são média de 6 animais por tratamento ± desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quanto ao nitrogênio ingerido e o excretado (fecal) apenas a mistura 80% WPI: 20%HCB não diferiu estatisticamente do padrão.

A maior digestibilidade ($p < 0,05$) foi das proteínas HCB, HCS e 60% WPI: 40% HCB, sendo que a mesma variou entre 90,5% e 98,5%. Esses altos valores encontrados estão de acordo com a literatura que evidencia a excelente digestibilidade tanto dos hidrolisados de colágeno como do WPI.

O PDCCAS (escore químico corrigido pela digestibilidade verdadeira) indica a proporção em que determinada fonte protéica é utilizada pelo organismo de

acordo com o padrão. Como o escore químico de aminoácidos essenciais está de acordo com o padrão da FAO/WHO (1990) observa-se que o valor do PDCCAS será igual ao da digestibilidade da proteína para a caseína comercial e o WPI, os quais não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). Já os valores de PDCAAS foram inferiores ao padrão para todas as misturas protéicas utilizadas devido ao baixo EAE apresentado pelas mesmas.

A mistura protéica selecionada para compor o produto dietético foi 60% WPI: 40% HCB por não diferir do WPI nos testes biológicos e por oferecer maior economicidade em função da maior proporção do HCB.

Analisando o perfil de aminoácidos essenciais (Tabela 2.10) pode-se notar que as combinações 60% WPI: 40% HCB e 80% WPI: 20% HCB não atingem o escore ideal, sendo que a combinação escolhida (60% WPI: 40% HCB) ainda se apresenta 12% deficiente em aminoácidos aromáticos (Phe + Tyr) e 26% em histidina. Como a histidina é considerada essencial apenas para recém-nascidos e crianças, essa deficiência não diminui o valor protéico da formulação utilizada por ser destinada a pessoas idosas.

3.5.2 Parâmetros avaliados no 2º ensaio biológico: Balanço de Nitrogênio (BN), Digestibilidade aparente (D_a), Valor Biológico aparente (VB_a) e Utilização Líquida da Proteína (NPU)

Os valores do balanço de nitrogênio (BN) encontrados para os grupos experimentais: 50%WPI: 50%HCB, WPI, caseína comercial (CC) e 60%WPI: 40%HCB estão representados na Figura 2.9.

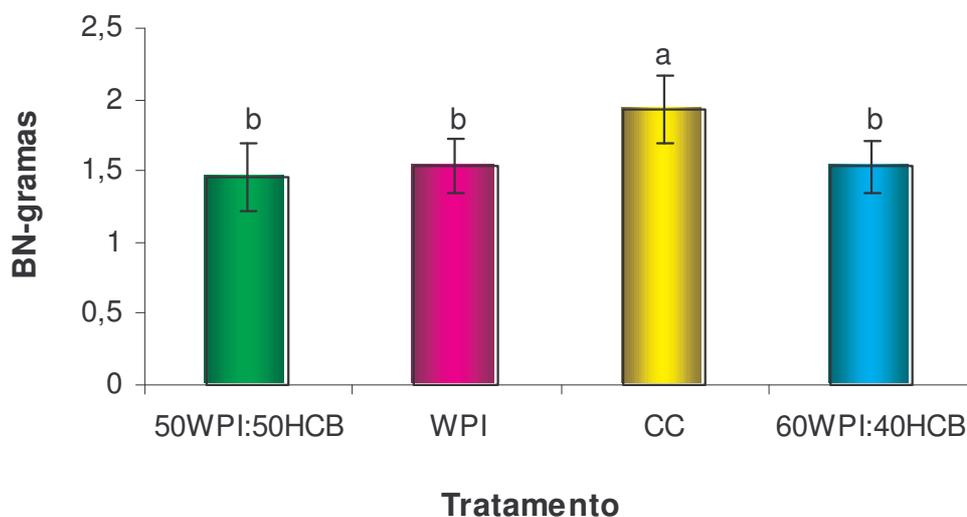


FIGURA 2.9 Representação gráfica do balanço de nitrogênio do ensaio com ratos Wistar alimentados por 10 dias com dietas contendo 12% de proteínas provenientes de 50%WPI: 50%HCB; WPI; caseína e 60%WPI: 40%HCB.

Com a dieta padrão de caseína, obteve-se o maior BN (1,93g). Os demais tratamentos não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Todos os tratamentos apresentaram BN positivo, o que era esperado para ratos em crescimento e proteína de boa qualidade.

Na Tabela 2.13 estão representados os valores obtidos para nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal, nitrogênio urinário e digestibilidade aparente para os tratamentos realizados no 2º ensaio biológico.

Pode-se verificar que o nitrogênio ingerido foi superior estatisticamente na dieta padrão quando comparado com as demais dietas experimentais. Já para o nitrogênio fecal apenas o WPI foi inferior estatisticamente aos demais tratamentos. Em relação ao nitrogênio urinário não se observou diferença estatística entre os tratamentos avaliados.

Como na digestibilidade verdadeira, a digestibilidade aparente do WPI não diferiu em relação à caseína. Em relação às misturas, a digestibilidade não diferiu entre si ($p > 0,05$), contudo ambas foram inferiores à CC e ao WPI ($p < 0,05$).

TABELA 2.13 Valores de para nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal, nitrogênio urinário e digestibilidade aparente para a caseína comercial (CC), isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), mistura de 50% WPI: 50% HCB e mistura de 60% WPI: 40% HCB.

Tratamento	N ingerido (g)	N fecal (g)	N urinário (g)	D _a (%)
CC	2,14 ± 0,26 ^a	0,11 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,06 ^a	95,10 ± 0,71 ^{ab}
WPI	1,79 ± 0,19 ^b	0,08 ± 0,02 ^b	0,19 ± 0,05 ^a	95,75 ± 0,87 ^a
WPI:HCB 50:50	1,77 ± 0,28 ^b	0,10 ± 0,02 ^{ab}	0,21 ± 0,09 ^a	94,37 ± 0,63 ^{bc}
WPI:HCB 60:40	1,80 ± 0,18 ^b	0,11 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,10 ^a	93,64 ± 1,42 ^c

Resultados são média de 6 animais por tratamento ± desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na Figura 2.10 estão representadas as porcentagens de valor biológico aparente encontradas para os grupos experimentais: 50%WPI: 50%HCB, WPI, CC e 60%WPI: 40%HCB.

Os tratamentos com CC, 60%WPI: 40%HCB e WPI não diferiram ($p > 0,05$) entre si, apresentando elevados valores biológicos aparentes (94,6%; 90,7% e 88,8% respectivamente). O VB_a da mistura 50% WPI: 50% HCB foi inferior ao da caseína ($p < 0,01$) igualando-se entretanto aos demais tratamentos (Figura 2.10).

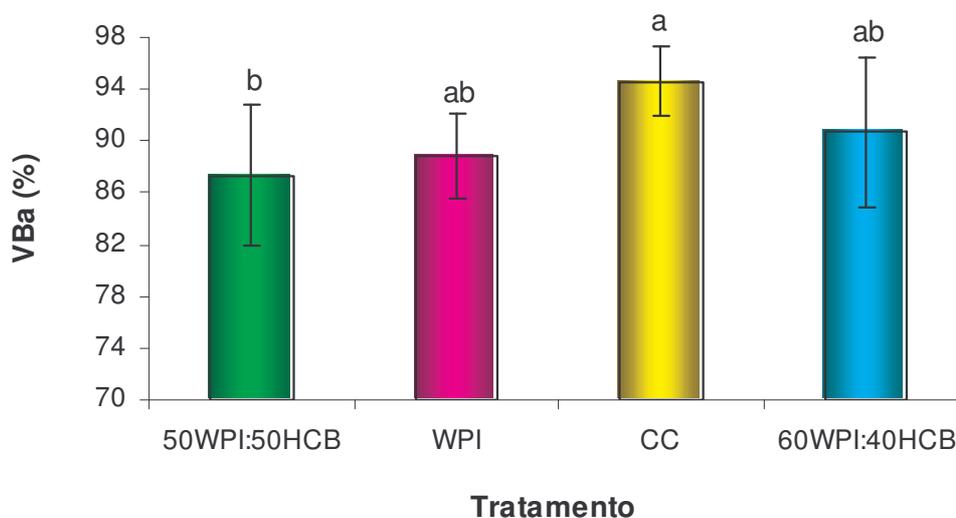


FIGURA 2.10 Representação gráfica do valor biológico aparente do ensaio com ratos Wistar alimentados por 10 dias, com dietas contendo 12% de proteínas provenientes de 50%WPI: 50%HCB; WPI; CC e 60%WPI: 40%HCB.

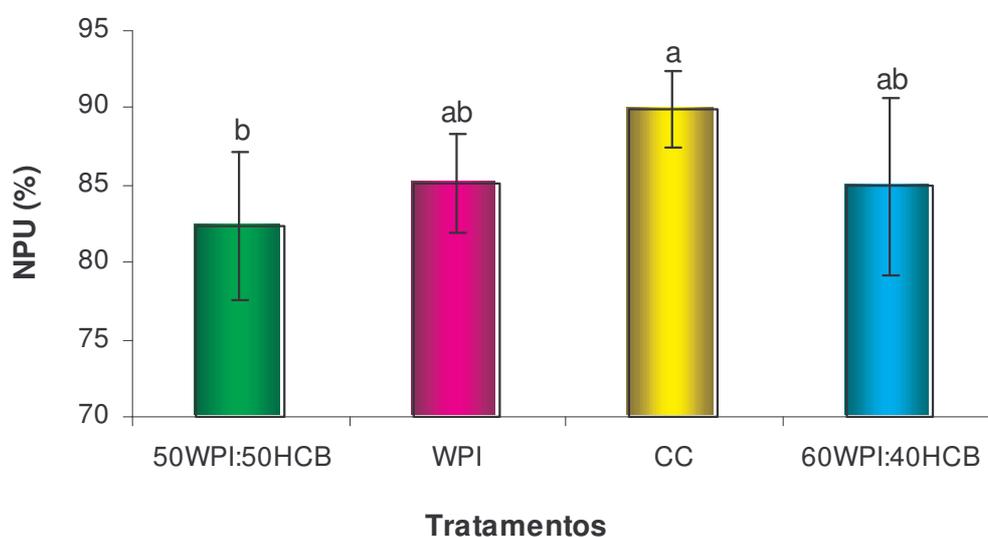


FIGURA 2.11 Representação gráfica da utilização líquida da proteína do ensaio com ratos Wistar alimentados por 10 dias, com dietas contendo 12% de proteínas provenientes de 50%WPI: 50%HCB; WPI; CC e 60%WPI: 40%HCB.

Na Figura 2.11 estão representados os valores da utilização líquida da proteína NPU (%) encontrados para os grupos experimentais: 50%WPI: 50%HCB, WPI, CC e 60%WPI: 40%HCB. O mesmo comportamento pode ser verificado para o NPU, no qual apenas a mistura 50%WPI: 50%HCB foi diferente estatisticamente do padrão (caseína).

É importante observar que os vários índices utilizados para se estimar o valor protéico (nutritivo) de uma proteína como NPR, NPU, VB, EAE, PDCAAS e outros, nem todos dão valores concordantes (superiores ou inferiores) a outras proteínas comparativamente avaliadas. É preciso executar comparativamente vários testes, e, o conjunto dos testes é que permitirá fazer melhor juízo de qual a proteína mais nutritiva. Essa afirmativa parece ficar bem demonstrada ao se analisar o conjunto dos índices nutricionais apresentados e discutidos neste capítulo, bem como uma série de dados reportados na literatura (SGARBIERI *et al.*, 2000).

. CONCLUSÕES

A composição centesimal das duas proteínas (WPI e HCB) foi bastante semelhante em relação ao teor protéico (~ 92%), com pequenas variações nos componentes minerais, umidade e carboidrato.

A solubilidade tanto do HCB como do WPI em água, foi bastante elevada (85-100%) tendo sido mais influenciada pela concentração de NaCl (força iônica) que pelo pH, na faixa de 2 a 8.

O perfil de aminoácidos do HCB mostrou-se deficiente em todos os aminoácidos essenciais particularmente, completa ausência do triptofano. Em relação aos aminoácidos não essenciais o HCB é particularmente rico em prolina, glicina, alanina e arginina. O WPI satisfaz todas as recomendações em aminoácidos essenciais (FAO/WHO, 1990) sendo particularmente rico em ácido glutâmico, sulfurados (cisteína, metionina) e leucina. As misturas WPI:HCB (60:40 e 80:20) apresentaram escore de aminoácidos essenciais (EAE) 0,82 e 0,96, respectivamente. Já os valores de PDCAAS encontrados para essas misturas foram de 78,91% e 89,45%, respectivamente.

Em relação ao ganho de peso, os animais que receberam 80% WPI: 20% HCB foram os únicos que não diferiram estatisticamente do padrão.

Do ponto de vista nutritivo, PER, NPU, VB_a e BN, as duas últimas misturas não diferiram estatisticamente entre si e do WPI ($p > 0,05$), sendo inferior ($p < 0,05$) a CC usada como referência.

Dessa forma, optou-se pela mistura 60% WPI: 40% HCB para a elaboração do produto dietético funcional para idosos desnutridos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis, W. Horwitz (ed.), 15th edition, Washington, D.C., 1141p., 1990.

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Washington, v.27, n.6, p.1256-1262, 1979.

_____. Enzymic hydrolysis of food proteins. London: Elsevier Applied Science, 1986, 426 p.

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.8, p. 911-917, 1959.

BRINK, W. The life extension protein:that fights disease and extends lifespan. **Life Extension Report**, Chicago, v.1, p. 21-28, 1996.

BRODIE, J.M. Hair growth benefits from dietary cystine-gelatine supplementation. **Journal Applied Cosmetology**. Roma, v. 2, p. 15-27, 1984.

DAS, K.P.; KINSELLA, J.E. Stability of food emulsions: physicochemical role of protein and non protein emulsifiers. **Advances in Food and Nutrition Research**, Lincoln, v. 34, p. 81-129, 1990.

DJAGNY, K.B.; WANG, Z. e XU, S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v. 41, n. 6, p. 481-492, 2001.

EIGEL, W.N.; BUTLER, J.E.; ERNSTROM, C. A.; FARRELL, H.M.; Jr. HARWALKER, V.R.; JENNESS, R.; WHITNEY, R. McL. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision, **Journal of Dairy Science**, EUA, v. 67, n. 8, p. 1599-1603, 1984.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nation / World Health Organization. Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation, 1990, Bethesda, USA.

FOEGEDING, E.A.; DAVIS, J.P.; DOUCET, D.; MCGUFFEY. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 13, n.5, p. 151-159, 2002.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Whashington, v.44, n.1, p.6-29, 1996.

GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Technology**. Chicago, v.48, n.10, p. 50-60, 1994.

GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 10 ed., São Paulo: Nobel, 430p., 1982.

HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino scoring. **Food Technology**. Chicago, v.48, n.4, p. 74-77, 1994.

HUFFMAN, L.M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**. Chicago, v. 50, n. 2, p. 49-52, 1996.

KRANS, C.; SCHWARS, E. Osteoporose-artrose: aspectos nutricionais e fisiológicos em relação à prevenção e ao acompanhamento terapêutico. **Proteva Food AG**, Höehst, Alemanha, 2001, 60 p.

LAW, A.J.R.; LEAVER, J. Factors affecting the heat denaturation of whey proteins in cow's milk. **International Dairy Journal**, Melbourne, v.9, n.3-6, p. 407-408, 1999.

MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n.10, p. 89-95, 1994.

MAMANI, H.N.C. **Desenvolvimento de filmes a partir da caseína e gelatina modificadas enzimaticamente com tripsina e transglutaminase**. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 41-42p., 2004.

MORR, C.V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.P.; BUREN, V.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. Collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**. Chicago, v.50, n.6, p. 1715-1718, 1985.

_____. Improving the texture and functionality of whey protein concentrate. **Food Technology**, Chicago, v.46, n.1, p. 110-113, 1992.

_____; HA, E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

MOSKOWITZ, R. W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. Philadelphia, v. 30, n.2, p. 87-99, 2000.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**. Cambridge, v.7, n.4, p.120-125, 1996.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, J.G.C. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the formulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.123, n. 11, p.1939-1951, 1993.

SCHOTT, A. Healthful Foods with Gelatin – The nutritional value of gelatin and some ideas for modern food applications. **Nutrition Today**. Philadelphia, p. 60-62, 1998.

SLOAN, A.E. The top 10 functional food trends: the next generation. **Food Technology**. Chicago, v. 56, n. 4, p. 32-57, 2002.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996, 517 p.

_____; RANGEL, H.A.; ZINSLY, P.F.; PACHECO, M.T.B.; PEREIRA DIAS, N.F.G. Novel nutritional and physiological functions of milk proteins. In: Food of 21st Century – Food and Resource, Technology, Environment (II). **4th International Conference of Food Science and Technology**, Wuxi, China, China Light Industry Press, 2000, p. 196-210.

SPACKMAN, D.C.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. **Analytical Biochemistry**. New York, v. 30, n. 9, p. 1190-1206, 1958.

SPIES, J.R. Determination of tryptofan in proteins. **Analytical Chemistry**, Arlington, v.39, n.12, p.1412-1415, 1967.

U.S. DAIRY EXPORT COUNCIL. **Manual de referência para produtos de soro dos EUA**. Arlington: EUA, 1997.

VOJDANI, F. Solubility. In: Hall, G.M. (Ed). **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic and Professional, 1996, p. 11-61.

Capítulo 3

DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO DIETÉTICO FUNCIONAL PARA IDOSOS DESNUTRIDOS

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO DIETÉTICO FUNCIONAL PARA IDOSOS DESNUTRIDOS

RESUMO

O objetivo deste capítulo foi desenvolver um produto dietético para idosos. Para tal, realizaram-se testes preliminares, caracterização físico-química e testes sensoriais. Nos testes preliminares foram avaliadas diferentes combinações e proporções entre os ingredientes para a obtenção da melhor formulação, principalmente em relação à solubilidade e ao aspecto sensorial. A escolha destes ingredientes, bem como a quantidade usada foi baseada em pesquisas na literatura, a respeito do perfil nutricional de idosos e suas principais deficiências. Através da análise sensorial (testes de aceitação, ideal de doçura e intenção de compra), os idosos avaliaram seis opções de formulação, das quais três foram preparadas com leite desnatado (sem saborizante, sabor chocolate e sabor café) e três com água (morango, laranja e limão). Dentre essas, foram escolhidas as formulações sabor chocolate e sem saborizante, as quais receberam médias de aceitação de 6,87 e 6,60 respectivamente. Os testes de ideal de doçura e intenção de compra foram concordantes com os resultados encontrados no teste de aceitação para essas duas formulações. Essas formulações apresentaram em torno de 12% de proteína, sendo o maior constituinte os carboidratos (~ 80%).

1. INTRODUÇÃO

A alimentação em relação aos idosos tem sido enfatizada devido ao aumento desta população em nível mundial, inclusive no Brasil, demonstrando a preocupação em proporcionar qualidade de vida, diminuir os custos no setor de saúde, demonstrar cientificamente que a dieta pode alterar a prevalência da doença e sua evolução, e proporcionar a educação nutricional desta população.

No desenvolvimento de produtos para a população idosa têm-se o cuidado em elaborar formulações que proporcionem nutrientes necessários para satisfazer as deficiências de uma alimentação inadequada na terceira idade decorrente de fatores da própria idade ou de perfil dietético insatisfatório para a faixa etária.

Sabe-se que para o desenvolvimento de novos produtos, é necessário o emprego de diferentes tipos de ingredientes em diferentes níveis de concentração. De acordo com GIESE (1995), os ingredientes alimentares funcionais mais freqüentemente usados no desenvolvimento de produtos são as fibras dietéticas, oligossacarídeos, ácido láctico, proteínas, minerais, vitaminas, fitoquímicos e antioxidantes. As proteínas têm também sido reportadas como possíveis ingredientes alimentares funcionais, como em bebidas com efeitos benéficos à saúde. Neste contexto, visando obter uma formulação nutritiva e funcional, foram realizados testes preliminares, sensoriais, utilizando-se provadores potenciais do produto e testes de vida de prateleira.

As propriedades sensoriais são influenciadas diretamente pela composição química e propriedades físicas de um produto. São percebidas pelo indivíduo como atributos de aparência, sabor, aroma e textura, os quais influenciam a competitividade entre os produtos (MOLNAR *et al.*, 1993).

Os testes de aceitação têm como objetivo avaliar a resposta dos indivíduos com relação à preferência e ou aceitação de um produto ou características

específicas do produto através de consumidores habituais ou potenciais consumidores do produto (MEILGAARD *et al.*, 1998).

O objetivo deste capítulo foi desenvolver um produto dietético capaz de corrigir as principais deficiências nutricionais de idosos desnutridos, bem como, realizar testes sensoriais com pessoas do mesmo grupo etário para avaliar a aceitação do produto pelos potenciais consumidores e a sua qualidade sensorial através de testes laboratoriais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Ingredientes

As fontes protéicas utilizadas neste trabalho foram descritas no capítulo 2.

A fonte de carboidratos do produto foi maltodextrina da Corn Products Brasil 1910 e sacarose da marca União[®]. Como prebióticos e fibra solúvel foram usadas inulina (Raftiline[®] GR) e frutooligossacarídeos (RAFTILOSE[®] P95), ambos doados pela empresa ORAFIT – Active Food Ingredients, São Paulo, Brasil.

Como fonte lipídica testou-se o ácido graxo ômega-3 (ROPUFA ‘30’ n-3 Food Oil) cedido pela DSM Nutritional Products Ltda (ROCHE) e lecitina de soja (Lecimulthin[®] 100) cedida por GLOBALFOOD - Advanced Food Technology, São Paulo.

Os minerais óxido de magnésio RA 150; óxido de zinco FA; ferro (Ferrochel[®] Amino Acid Chelate), selenito de sódio; cromo chelavite[®]; quelato de magnésio 20%; quelato de zinco 20% e quelato de selênio 2%, foram fornecidos pela empresa M.CASSAB Ltda, São Paulo. O cálcio foi testado na forma de citrato e carbonato (ambos da marca Synth) adquirido da empresa LABCENTER Ltda, Paulínia, S.P., e na forma de lactato (Puracal PP FCC) doado pela PURAC, São Paulo.

As vitaminas foram fornecidas pela DSM Nutritional Products Ltda, São Paulo (ROCHE): vitamina A acetato tipo 325 CWS/F; dl-alfa-tocoferol; ácido ascórbico; cloridrato de piridoxina; vitamina B₁₂ 0,1% WS e ácido fólico – BP. Já a vitamina B₁ (cloridrato de tiamina) da marca Synth foi adquirida da LABCENTER Ltda., Paulínia, S.P.

Os aromatizantes, conforme legislação brasileira na resolução n° 104 (BRASIL, 1999), classificados como aromatizantes/aromas idênticos aos naturais (A.I.N). Foram utilizados nos testes para o desenvolvimento do produto: A.I.N. morango em pó SD; A.I.N laranja em pó SD; A.I.N. limão em pó SD, todos doados pela empresa MANE DO BRASIL Ltda., São Paulo. Também utilizaram-se como aromatizantes/saborizantes café solúvel granulado da Melitta[®], São Paulo, guaraná em pó pro Natura da Minori Alimentos Naturais Ltda, São Paulo, e chocolate em pó solúvel da Nestlé[®], São Paulo..

O acidulante utilizado foi o ácido cítrico Synth adquirido da LABCENTER Ltda., Paulínia, S.P.

Os corantes vermelho Bordeaux; vermelho Ponceaux; vermelho Alhura 40; amarelo Tartrazina; amarelo Crepúsculo; azul Brilhante e azul Indigotine, foram cedidos pela empresa DOCE AROMA FOOD INGREDIENTS, São Paulo.

2.2. Embalagem

Foram utilizadas embalagens flexíveis de polipropileno (PP) em dois tamanhos diferentes: uma embalagem menor com 10 cm de largura por 15 cm de comprimento e 0,05 mm de espessura e, uma maior com 15 cm de largura por 25 cm de comprimento e de mesma espessura.

2.3. Formulação do produto

Todos os testes para o desenvolvimento do produto foram realizados no Laboratório de Metabolismo e Nutrição do Departamento de Alimentos e Nutrição-FEA/UNICAMP.

Previamente ao preparo das formulações, efetuou-se a higienização da bancada e de todos os utensílios utilizados, os quais também foram separados dos demais. Além desses utensílios do laboratório foram utilizados copos plásticos descartáveis para a realização dos testes. Também foram usados equipamentos de proteção (jaleco de manga comprida, touca, máscara e luvas) para evitar possíveis contaminações do produto que estava sendo formulado.

Em relação ao preparo, realizou-se a pesagem de todos os ingredientes em balança analítica, considerando-se a quantidade estipulada por dose do produto. Posteriormente misturaram-se os ingredientes em ordem crescente de quantidade, ou seja, dos menores (minerais e vitaminas) aos maiores. Para garantir uma homogeneização mais eficiente, o produto formulado foi peneirado de 3 a 4 vezes antes de ser armazenado em potes plásticos sob refrigeração.

2.3.1 Testes preliminares de formulação

Foram realizados vários testes preliminares com diferentes combinações e proporções entre os ingredientes para a obtenção da melhor formulação.

Por se tratar de um produto em pó para posterior reconstituição em água ou leite, a solubilidade/dispersabilidade é essencial. Assim, primeiramente foram testados os ingredientes em maior quantidade que seriam adicionados na formulação, tais como a mistura protéica entre isolado protéico do soro de leite (WPI) e hidrolisado de colágeno bovino (HCB) na proporção 60:40; maltodextrina; prebiótico (inulina); lecitina de soja; bem como a mistura de todos eles. Esses testes foram realizados em água, apresentando problemas de solubilização, principalmente por formar “grumos” oriundos da lecitina e formação de precipitado.

Em função desse problema de solubilização, realizaram-se testes de variação de pH através da acidificação com ácido cítrico 0,1M. Observou-se que à medida que o pH da solução tornava-se mais ácido, houve uma pequena melhora

na solubilização verificada através de uma menor sedimentação de sólidos. Porém, como essa melhora não foi significativa, realizaram-se testes de instantaneização.

Os testes de instantaneização foram realizados na planta piloto do Departamento de Engenharia de Alimentos com intuito de aumentar o tamanho das partículas do pó formando uma espécie de aglomerado, o qual facilitaria a dispersão do pó em água. Para tal, foram usadas temperaturas entre 70 a 80 °C, o que poderia causar perdas das vitaminas mais termolábeis, prejudicando o valor nutricional do produto. Paralelamente determinou-se a umidade da formulação antes e após o processo de instantaneização, observando-se diminuição da mesma. Além disso, controlou-se o tempo para dissolução do pó, bem como o tempo de decantação. Verificou-se que não havia diferença no tempo de decantação e na quantidade de formação de precipitado com esse processamento.

Uma nova formulação foi feita com adição de ácido graxo poliinsaturado ômega-3 encapsulado (Roche), o qual por estar na forma líquida aumentou a umidade do produto, bem como, a hidrofobicidade, tornando mais difícil à solubilização. Além disso, conferiu aroma e sabor desagradáveis, o que tornou essa formulação inviável em termos sensoriais, apesar do esperado benefício funcional. Aplicou-se novamente o processo de instantaneização, porém não se obteve resultados satisfatórios e esse processamento foi desconsiderado.

Para mascarar o aroma e sabor desagradáveis (residual metálico) foram realizados os testes com saborizantes. Testou-se inicialmente a concentração recomendada pelo fabricante para os saborizantes de morango (0,05%), limão (0,02%) e laranja (0,05%). Como essa concentração não foi suficiente para mascarar o aroma e sabor indesejáveis, várias concentrações foram testadas, até chegar em um limite no qual o sabor tornava-se enjoativo. Juntamente com os testes de saborizantes foram realizados os testes com corantes para morango,

limão e laranja, obedecendo-se às quantidades recomendadas pela legislação brasileira.

Novos sabores foram testados (café, chocolate e guaraná), mas em todos não se conseguiu mascarar o gosto metálico residual do produto. Com o objetivo de melhorar o aspecto sensorial resolveu-se retirar da formulação os minerais cromo e ferro, o que permitiu eliminar o gosto residual metálico do produto. Outra modificação feita foi à retirada dos lipídios da formulação (lecitina de soja e ácido graxo ômega-3), o que além de eliminar o aroma e sabor desagradáveis, também proporcionou uma melhora na solubilidade e dispersabilidade da mistura em água.

Com essa formulação realizaram-se vários testes com saborizantes (morango, laranja, limão, guaraná, café e chocolate) em água e em leite, acertando-se as concentrações e quantidades adequadas para esses ingredientes. Também testou-se a formulação sem adição de saborizante com água e leite, sendo considerada muito agradável sensorialmente. Esses testes podem ser visualizados através da Figura 3.1. Embora resolvida à questão sensorial do produto, a solubilização ainda não estava satisfatória.



FIGURA 3.1. Testes preliminares com saborizantes em água e leite desnatado.

Uma nova bateria de testes foi realizada, testando-se alterações no pH, substituindo-se o WPI por hidrolisado protéico do soro de leite, cuja troca não se revelou vantajosa. Avaliou-se também a introdução do mineral cálcio (várias formas) na mistura.

Na avaliação do cálcio na forma de carbonato, verificou-se que o mesmo estava sendo responsável por grande parte da precipitação do produto, pois em testes com todos os ingredientes exceto o carbonato de cálcio, a formação de precipitado foi muito pequena e estável durante o tempo testado. A partir desse ponto, iniciou-se testes com outras formas de cálcio, como citrato, o qual comportou-se de forma semelhante ao carbonato e lactato, que por sua vez apresentou ótima dissolução com baixíssima formação de precipitado, permanecendo estável ao longo do tempo avaliado.

Assim, conseguiu-se resolver os problemas referentes à formação de precipitado com melhora significativa na solubilização do produto, bem como, nos parâmetros sensoriais de aroma, sabor e aparência.

2.3.2. Avaliação sensorial com idosos: escolha das melhores formulações

A realização desta análise sensorial foi feita com indivíduos de 60 anos ou mais (idosos), uma vez que o produto foi desenvolvido para atender as necessidades nutricionais deste grupo etário. Em função da dificuldade de se conseguir pelo menos 30 provadores desta faixa etária entre os frequentadores da Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, optou-se por realizar essa análise na Faculdade da 3ª Idade da UNESP no campus de São José dos Campos – SP.

Os idosos avaliaram seis opções de formulações com sabores diferenciados através do teste de aceitação, ideal de doçura e intenção de compra

(Figura 3.2). Embora o local não fosse o ideal para a realização da análise sensorial, tomou-se o cuidado de solicitar para que não houvesse conversas entre os participantes durante a realização da análise, o que foi respeitado.

Optou-se por avaliar sensorialmente com os idosos as seguintes formulações:

- em leite: formulação sem saborizante, sabor chocolate e sabor café;
- em água: sabor morango (0,3%), limão (0,2%) e laranja (0,3%).



FIGURA 3.2. Análise sensorial realizada com idosos da Faculdade da 3ª Idade da UNESP no campus de São José dos Campos – SP.

Testes de aceitação

Os testes de aceitação foram realizados utilizando-se escala hedônica estruturada de nove pontos (9 = “gostei muitíssimo” e 1 = “desgostei muitíssimo”), conforme Anexo 1.

Os testes foram realizados primeiramente para verificar quais das seis formulações (com diferentes saborizantes) seriam mais aceitas em relação à impressão global e dessa forma, duas formulações com os maiores índices de aceitação posteriormente foram submetidas a testes de vida de prateleira.

Trinta provadores não treinados realizaram as análises sensoriais de aceitação das amostras em relação à impressão global, recebendo 50 mL de cada amostra à temperatura ambiente em copos plásticos descartáveis, codificados com algarismos de três dígitos casualizados e servidos. Entre uma amostra e outra foi solicitado aos provadores que ingerissem biscoito “cream-craker” e tomassem água para lavar a boca e eliminar qualquer resíduo.

Teste de doçura ideal

Da mesma forma que no teste de aceitação, foi avaliado o ideal de doçura das amostras utilizando-se uma escala de nove pontos com os seguintes extremos: (-4) extremamente menos doce que o ideal e (4) extremamente mais doce que o ideal, conforme (VICKERS, HOLTON e WANG, 2001).

Teste de intenção de compra

Na mesma ficha da análise de aceitação e do ideal de doçura foi avaliada a atitude do consumidor em relação à possível compra desses produtos. Para tal, foi utilizada uma escala de cinco pontos para intenção de compra (MEILGAARD e CIVILLE, 1999), a qual é composta por: 1 = certamente não compraria; 2 = provavelmente não compraria; 3 = tenho dúvida se compraria ou não; 4 = provavelmente compraria e 5 = certamente compraria.

2.3.3 Formulação do produto final

Na formulação final do produto foram utilizados: mistura protéica 60%WPI: 40%HCB; maltodextrina; sacarose; inulina; frutooligossacarídeos (FOS); vitaminas (B₁, B₆, B₁₂, ácido fólico, C, A e E); minerais (lactato de cálcio, óxido de magnésio, quelatos de zinco e de selênio); saborizantes (morango, limão, laranja, café, chocolate); corantes (vermelho Ponceaux, amarelo Tartrazina, amarelo Crepúsculo e azul Brilhante) e ácido cítrico.

A escolha destes ingredientes, bem como a quantidade utilizada de cada um foi baseada na literatura, através das deficiências mais freqüentes relatadas em idosos, e no perfil nutricional de idosos desnutridos que freqüentam o Ambulatório de Geriatria do Hospital de Clínicas da UNICAMP, através de um levantamento realizado pela nutricionista Valéria Maria Caselato de Sousa. Além disso, as quantidades foram determinadas com base nas recomendações nutricionais das DRI's (Dietary Reference Intakes) para a faixa etária em estudo, conforme pode ser visualizado na Tabela 3.1.

TABELA 3.1. Contribuição nutricional do produto em relação à recomendação da DRI (Dietary Reference Intakes) para macro e micronutrientes.

<i>Nutriente</i>	<i>DRI para idosos</i>	<i>% DRIs/ dose** do produto</i>
Proteína (g/dia)	M: 56 F: 46	13% 16%
Carboidrato (g/dia)	M e F: 130	30%
Fibra (g/dia)	M: 30 F: 21	20% 29%
Vitaminas		
B ₁ (mg/dia)	M: 1,2 F: 1,1	17% 18%
B ₆ (mg/dia)	M: 1,7 F: 1,5	40% 45%
B ₁₂ (µg/dia)	M e F: 2,4	50%
C (mg/dia)	M: 90 F: 75	67% 80%
A (µg/dia)	M: 900 F: 700	50% 63%
E (mg/dia)	M e F: 15	100%
Ácido Fólico (µg/dia)	M e F: 400	33%
Minerais		
Ca (mg/dia)	M e F: 1200	33%
Mg (mg/dia)	M: 420 F: 320	33% 43%
Zn (mg/dia)	M: 11 F: 8	50% 67%
Se (µg/dia)	M e F: 55	33%

M = sexo masculino; F = sexo feminino. ** Dose de 58,06g para a formulação sem saborizante e de 61,06g para a fórmula sabor chocolate para dispersão em 200mL. Fonte: DRI (1997); DRI (1998); DRI (2000); DRI (2001) e DRI (2002).

2.3.4. Caracterização físico-química

Composição centesimal das formulações

- **Umidade, sólidos totais, cinzas e proteína:** foram determinados de acordo com os procedimentos descritos no AOAC (1990). Os sólidos totais foram obtidos pela diferença entre o peso total da amostra e o conteúdo em umidade, secagem em estufa a 105 °C até peso constante. A proteína bruta foi obtida multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 6,38 para o isolado protéico de soro de leite bovino e 5,55 para o hidrolisado de colágeno bovino.

- **Lipídios Totais:** foram determinados pelo método descrito por BLIGH e DYER (1959), empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água nas proporções (10, 20, e 8 mL, respectivamente) para extração dos lipídios.

- **Carboidratos totais:** estimados por diferença, subtraindo-se de 100% relativo à soma dos valores obtidos para as determinações anteriores.

2.4. Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias, pelo teste de Tukey, (GOMES, 1982), utilizando-se o programa “Statística: Basic Statistics and Tables”, sendo que para as análises sensoriais usou-se o programa estatístico SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Formulação final

Chegou-se na formulação final do produto, apresentada na Tabela 3.2, através de pesquisas na literatura a respeito do perfil nutricional de idosos e suas principais deficiências. Além disso, considerou-se um levantamento preliminar do perfil nutricional de idosos desnutridos que freqüentam o Ambulatório de Geriatria do Hospital de Clínicas da UNICAMP. As quantidades foram determinadas respeitando-se as recomendações nutricionais das DRI's (Dietary Reference Intakes) para a faixa etária em estudo, levando-se em consideração o limite superior tolerável de ingestão (UL) de cada nutriente da formulação.

3.1.1 Energia

Como relação às necessidades energéticas, verificou-se que as mesmas diminuem com a idade ao reduzir-se gradualmente a atividade física e a massa muscular (CURIATI e ALENCAR, 1994). Estudos recentes demonstraram uma diminuição em 10% das necessidades calóricas para cada década a partir dos 60 anos (PALLÁS, 2002).

Um trabalho realizado por CERVATO *et al.* (1997) investigou o hábito alimentar de 557 indivíduos com idade entre 20 e 88 anos residentes no município de Cotia, São Paulo. Segundo os autores, o total calórico da dieta reduziu com a idade: de um valor mediano de, aproximadamente, 2.000 Kcal/dia para cerca de 1.300 Kcal no grupo etário de 60 anos e mais, no caso das mulheres e de 2.700 Kcal para 1.900 Kcal, para os homens.

Em outro estudo desenvolvido por MASTROENI (2004) avaliou-se o estado nutricional e o consumo de macronutrientes de idosos da cidade de Joinville, SC. Em relação ao valor energético ingerido por essa população, o autor encontrou um

consumo diário médio de 1.515 Kcal para o sexo masculino, sendo superior ao do sexo feminino, que foi de 1.340 Kcal, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os sexos.

Tem-se observado que pelo menos 40% dos idosos com mais de 70 anos ingerem menos de 1.500 Kcal por dia. No entanto, esse aporte energético não é suficiente para cobrir as necessidades nutricionais recomendadas de micronutrientes e nem para manter um certo grau de atividade física. Portanto, embora as necessidades energéticas sejam menores em idosos, deve-se assegurar um aporte suficiente para garantir os requerimentos adequados de vitaminas e minerais (NOVARTIS, 1998).

WOUTERS-WESSELING *et al.* (2003) avaliaram o efeito de um suplemento nutricional líquido na composição corporal e funcionamento físico em pessoas idosas com índice de massa corpórea (IMC) menor ou igual a 25 Kg/m². Foi realizada suplementação duas vezes por dia, totalizando 250 Kcal diárias. Os autores concluíram que a suplementação dietética promoveu um aumento no peso corporal, não afetando a ingestão energética da refeição regular e ainda resultando em uma ingestão energética adicional, o que é importante em pacientes idosos em desnutrição.

Deste modo, o produto, objeto deste estudo, foi desenvolvido com o propósito de atender a demanda energética de idosos desnutridos ou em risco de desnutrição, oferecendo-se 200Kcal por dose e um total diário de 600 Kcal, uma vez que se pretende administrá-lo três vezes ao dia para esse grupo de pacientes. No entanto, indivíduos idosos com estado nutricional adequado, podem consumir o produto, apenas reduzindo-se a quantidade de doses ingeridas. Outra forma de aumentar-se o valor calórico, bem como, o aporte nutricional do produto para ser oferecido aos idosos desnutridos é através da solubilização com leite ao invés de água. Recomenda-se a utilização de leite desnatado, o que acarretaria um aumento por dose em torno de 70 Kcal.

TABELA 3.2. Composição nutricional do produto final por dose (200 mL) e pelo total diário (600 mL) de ingestão.

Nutriente	Q^{de} (g)/dose (200 mL)	Q^{de} (g)/dia (600mL)
Energia (Kcal)	200	600
Proteína: WPI + HCB (g)	7,5	22,5
Sacarose (g)	18,6	55,8
Maltodextrina (g)	22,07	66,21
Inulina (g)	4	12
FOS (g)	2	6
Vitaminas		
B ₁ (mg)	0,2	0,6
B ₆ (mg)	0,68	2,04
B ₁₂ (µg)	1,2	3,6
C (mg)	60	180
A (µg)	450	1350
E (mg)	15	45
Ácido Fólico (µg)	133,33	400
Minerais		
Ca (mg)	400	1200
Mg (mg)	140	420
Zn (mg)	5,5	16,5
Se (µg)	18,33	55
Saborizantes		
Morango e laranja 0,3% (g)	0,17	0,52
Limão 0,2% (g)	0,12	0,46
Corantes		
Vermelho Ponceaux (g)	0,0034	0,01
Amarelo Crepúsculo (g)	0,006	0,018
Amarelo Tartrazina (g)	0,005	0,015
Azul Brilhante (g)	0,0002	0,0006
Ácido cítrico (g)	0,4	1,2

Outra consideração importante a ser feita, é que pretende-se utilizar esse produto entre as refeições principais para evitar-se uma diminuição na ingestão alimentar dos indivíduos idosos desnutridos. Essa orientação está completamente de acordo com estudo realizado por WILSON, PURUSHOTHAMAN e MORLEY

(2002), o qual testou o efeito de suplementos dietéticos líquidos na ingestão energética de idosos. Os autores concluíram que a administração desses suplementos entre as refeições em vez de junto com elas pode ser mais efetivo no aumento do consumo energético.

3.1.2 Proteína

Enquanto a necessidade energética diminui, em torno de 10% por década a partir dos 60 anos, a de proteínas aumenta, passando a representar uma maior proporção do total calórico com o avançar da idade. Diante do fato que a massa magra diminui com o envelhecimento, conclui-se que essa maior necessidade protéica reflita alterações na absorção e/ou metabolização de proteínas associadas à idade (CURIATI e ALENCAR, 1994).

Dessa forma, é necessário garantir um aporte elevado de proteínas e ajustado em calorias, bem como, realizar exercícios físicos de forma regular. Assim, as recomendações para a ingestão de proteínas para a população geriátrica se situam entre 1-1,25 g/Kg/dia (PALLÀS, 2002). No entanto, em situações especiais como infecções agudas, fraturas ou intervenções cirúrgicas pode se recomendar ingestões maiores (1,25-2 g/Kg/dia).

Já as recomendações americanas e canadenses (DRI's) para homens e mulheres na faixa entre 51 a 70 anos, bem como, acima de 71 anos são de 0,8 g de proteínas/Kg/dia, que equivale a 56g/dia para os homens e 46g/dia para as mulheres (DRI, 2002). Conforme CAMPBELL e EVANS (1996), essa recomendação deve mudar para pelo menos 1.0g de proteína/Kg/ dia. ALVA (2001) sugere que um aumento para 1,2 g/Kg/dia possa ser benéfico para idosos. No levantamento preliminar realizado com idosos desnutridos que freqüentam o Ambulatório de Geriatria do Hospital de Clínicas da UNICAMP, constatou-se que

tanto a ingestão energética diária (1074 Kcal) quanto a protéica (43g) estão abaixo das recomendações para essa faixa etária em ambos os sexos.

Para o desenvolvimento do produto utilizaram-se duas fontes protéicas diferentes (isolado protéico do soro de leite e hidrolisado de colágeno bovino), as quais além de garantir um aporte protéico adequado (40% da recomendação para homens e quase metade do recomendado pela DRI para mulheres), apresentam excelentes propriedades funcionais. Além disso, dentre os alimentos e ingredientes funcionais conhecidos atualmente, constituem ingredientes importantes na formulação de alimentos e bebidas funcionais.

3.1.3 Carboidratos

Recomenda-se que 50 a 60% da ingestão energética seja oriunda de carboidratos, preferencialmente complexos, como cereais, frutas e vegetais, que além de serem boas fontes desse nutriente, também são ricos em fibras, minerais e vitaminas. Já CURIATI e ALENCAR (1994) e NOVARTIS (1998) preconizam que os carboidratos devam corresponder a aproximadamente 50 a 55% do valor calórico total ingerido pelo idoso.

A quantidade de carboidrato presente no produto atingiu 90% do valor proposto na DRI. Utilizou-se essa quantidade por dois motivos: o primeiro em virtude da retirada da fonte lipídica da formulação final devido problemas na solubilização e nas características sensoriais do produto, e em segundo devido a diminuição na percepção e identificação do gosto doce, conseqüência do envelhecimento.

Em termos qualitativos optou-se pelo uso de maltodextrina e sacarose. A primeira por ser um polissacarídeo energético não doce, composto por monômeros de D-glicose, obtido a partir do amido de milho, por hidrólise ácida ou

enzimática e por apresentar boa solubilidade em água, sendo muito usada na elaboração de bebidas (REINECCIUS, 1991). Já a sacarose foi utilizada por seu poder adoçante e fácil solubilização, embora apresente a desvantagem do produto não ser recomendável para idosos diabéticos.

3.1.4 Fibras/ Prebióticos

De acordo com ROBINSON e LEIF (2001) as recomendações de fibras na 3ª idade oscilam entre 20 a 35 g/dia, sendo os alimentos ricos em fibras, como cereais, frutas e verduras a principal fonte dietética.

Os frutooligossacarídeos e a inulina são atualmente classificados como prebióticos, funcionais e fibras alimentares solúveis, apresentando efeitos benéficos sobre a saúde (ARABBI, 2001; BORGES, 1997; GIBSON e ROBERFROID, 1995; LIU, 2003; ROBERFROID, VAN LOO e GIBSON,1998). Possuem propriedades físicas que os tornam aplicáveis em vários produtos alimentícios, como ausência de cor e odor, estabilidade em pH neutro e em temperaturas elevadas (140 °C), bem como, solubilidade superior à da sacarose. Porém, em condições muito ácidas podem ser hidrolisados em frutose (PASSOS e PARK, 2003). Adicionalmente, apresentam propriedades funcionais que resultam em benefícios à saúde.

Dentre os benefícios proporcionados por esses prebióticos, recentemente foi relatado seu uso como ingrediente nutricional para idosos, os quais apresentam um inadequado equilíbrio na sua microbiota intestinal, com uma significativa diminuição das bifidobactérias. GUIGOZ *et al.*, (2002) estudaram em idosos frágeis institucionalizados com mais de 75 anos o efeito da suplementação com FOS em relação à produção de bifidobactérias e verificaram que após 3 semanas as mesmas aumentaram significativamente.

Em função de todos os benefícios da inulina e dos frutooligossacarídeos, resolveu-se incluí-los na composição do produto na proporção de 2:1 respectivamente, fornecendo um total diário de 18g, o equivalente a 27 Kcal, uma vez que cada grama fornece 1,5 Kcal (NINESS, 1999). É importante ressaltar que os mesmos são considerados substâncias seguras para o consumo humano, com base em avaliações toxicológicas (COUSSEMENT, 1999).

3.1.5 Vitaminas e Minerais

ELSBORG *et al.* (1983) consideram a população geriátrica um grupo vulnerável com relação à ingestão de vitaminas e minerais. Isso foi evidenciado mediante estudos realizados com 403 idosos residentes em suas casas, onde as vitaminas e os minerais apresentavam déficits variados, em comparação com as exigências mínimas.

O aporte de minerais pode estar comprometido na 3ª idade devido aos mesmos fatores que levam à deficiência de vitaminas, ou seja, menor apetite, dificuldade de mastigação, alterações endócrinas, digestivas e renais e interação com fármacos (NOVARTIS, 1998).

As vitaminas mais deficientes na população geriátrica conforme PÁLLAS (2002) são: D, E, C, B₆, B₁₂ e ácido fólico. Conforme o mesmo autor, existem alguns minerais que por possuírem um papel crítico na idade geriátrica, merecem atenção especial. São eles: cálcio, ferro, zinco, selênio, magnésio e cromo.

No estudo realizado por WOUTERS-WESSELING *et al.* (2003) o suplemento nutricional líquido utilizado apresentava a seguinte composição: 250 Kcal, 8,75g de proteína, 28,5g de carboidratos, 11,25g de lipídios e micronutrientes em quantidades aproximadamente entre 30 a 150% da RDA

(*Recommended Dietary Allowances*, 1989) para vitaminas e minerais, com um incremento nos níveis de antioxidantes.

Já no produto desenvolvido, as quantidades de vitaminas e minerais por dose variaram entre 17 a 100% da DRI (Dietary Reference Intakes, 1997; 1998; 2000; 2001), dando-se da mesma forma, maior ênfase as substâncias antioxidantes. Essa porcentagem de variação da DRI foi estabelecida, também, com base no levantamento preliminar do perfil nutricional de idosos desnutridos que freqüentam o Ambulatório de Geriatria do Hospital de Clínicas da UNICAMP, no qual as principais deficiências verificadas através da porcentagem de adequação em relação aos valores das DRI's foram: zinco (16,9%); cálcio (33,4%); selênio (49%); E (21%); C (52%); B₁ (69%); B₆ (32,7%) e B₁₂ (11,6%).

3.1.6 Saborizantes e corantes

Os saborizantes utilizados na elaboração do produto são classificados como AIN (aromatizantes/aromas idênticos aos naturais) conforme a Resolução n° 104 (BRASIL, 1999), a qual define esses ingredientes como: “substâncias quimicamente definidas obtidas por síntese e aquelas isoladas por processos químicos a partir de matérias primas de origem animal ou vegetal, que apresentam estrutura química idêntica à das substâncias presentes nas referidas matérias primas naturais (processadas ou não)”. Utilizou-se os saborizantes morango e laranja na concentração de 0,3% e o limão a 0,2%, respeitando-se as determinações da presente resolução.

Pela legislação atual, através das resoluções n° 382 a 389 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), no Brasil é permitido, para alimentos e bebidas, o uso de apenas 11 corantes artificiais, sendo eles: Amaranto, Vermelho de Eritrosina, Vermelho 40, Ponceaux 4R, Amarelo Crepúsculo, Amarelo Tartrazina, Azul de Indigotina, Azul Brilhante, Azorrubina, Verde Rápido e Azul

Patente V (ANVISA). Deste modo, todos os corantes artificiais usados neste trabalho são permitidos conforme essa legislação.

Em relação à quantidade utilizada para cada um desses corantes, observaram-se as recomendações da resolução n° 389 de 5 de agosto de 1999 (BRASIL, 1999) e da IDA (definida como a quantidade de uma substância, expressa com base no peso corporal, que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem oferecer riscos à saúde), a qual é um limite toxicológico importante que ajuda a estabelecer o uso seguro dos aditivos alimentares (PRADO e REYES, 2003). Na Tabela 3.3 são apresentados os valores de limite máximo permitidos pela resolução n° 389 (g/mL), os valores da IDA (mg/Kg) e os valores utilizados neste trabalho (g/mL).

TABELA 3.3. Valores de limite máximo permitidos pela resolução n° 389 (expressos em g/mL), valores da IDA (expressos em mg/Kg de peso) e os valores utilizados no produto (expressos em g/mL).

Corantes	Limite máximo (g/100mL)	IDA (mg/Kg de peso)	Produto (g/100mL)
Vermelho Ponceaux	0,005	4,0	0,002
Amarelo Crepúsculo	0,01	2,5	0,003
Amarelo Tartrazina	0,01	7,5	0,0025
Azul Brilhante	0,01	10,0	0,0001

3.2. Avaliação sensorial com idosos

Desta forma, a avaliação foi realizada com o público alvo do produto desenvolvido com o objetivo de se verificar dentre os seis sabores formulados, os dois de maior aceitação para realização dos testes de vida de prateleira e posterior produção dessas formulações para suplementação em idosos desnutridos.

Todas formulações apresentam a mesma composição nutricional (Tabela 3.2). No entanto os sabores solubilizados em leite terão um maior aporte calórico e nutricional (Tabela 3.4), bem como o sabor chocolate em função da sua composição nutricional (Tabela 3.5).

TABELA 3.4. Composição nutricional equivalente a uma porção (200mL) do leite desnatado Lider[®] utilizado na avaliação sensorial com idosos.

Composição nutricional	Q^{de} por porção (200 mL)
Valor calórico (Kcal)	70
Carboidratos (g)	10
Proteína (g)	7
Gorduras totais (g)	1
Gorduras saturadas (g)	1
Colesterol (mg)	10
Cálcio (mg)	234
Ferro (mg)	0,2
Sódio (mg)	128

TABELA 3.5. Composição nutricional do chocolate em pó solúvel Nestlé[®] equivalente a uma dose (3g/200mL) do produto.

Composição nutricional	Q^{de} por dose (200 mL): 3g
Valor calórico (Kcal)	10
Carboidratos (g)	1,8
Proteína (g)	0,4
Gorduras totais (g)	0,2
Fibra (g)	0,4
Cálcio (mg)	2,4
Ferro (mg)	0,33

3.2.1 Teste de Aceitação

O teste de aceitação com relação ao atributo impressão global foi realizado para verificar-se dentre as seis opções de formulações elaboradas, as duas de maior aceitação por parte dos idosos. Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 3.6.

TABELA 3.6. Média de aceitação das amostras do produto desenvolvido.

Amostras	Impressão global *
Amostra 5 – Chocolate	6,87 ^a
Amostra 1 – Fórmula sem saborizante	6,60 ^a
Amostra 3 – Café	6,50 ^a
Amostra 2 – Morango	5,70 ^{ab}
Amostra 6 – Laranja	4,70 ^b
Amostra 4 – Limão	4,67 ^b

* Médias marcadas com letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

De acordo com os resultados da Tabela 3.6, verificou-se que as formulações sabor chocolate, sem adição de saborizante e sabor café foram as preferidas pelos idosos, obtendo as maiores médias e não diferindo entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). As médias de aceitação para essas formulações encontram-se situadas na escala hedônica estruturada de nove pontos em “gostei moderadamente”, assim evidencia-se a boa aceitação por parte do público alvo em relação a essas amostras. Portanto, tornando viável sua posterior produção para suplementação com idosos desnutridos.

Dentre as amostras com saborizantes de frutas, o aroma de morango foi o que obteve maior média de aceitação, inclusive não diferindo estatisticamente das amostras chocolate, sem saborizante e café. Porém na escala hedônica encontra-se na faixa de “gostei ligeiramente”.

STONE e SIDEL (1993) consideram o ponto 5 da escala como o ponto de corte para a aceitação de um produto. Deste modo, as amostras de aroma laranja e limão, estão no limite de aceitação, pois sua média foi 4,7 estando no ponto intermediário da escala, sendo estatisticamente inferiores as demais.

Outro aspecto observado foi que as amostras com maior aceitação foram àquelas preparadas com leite desnatado ao invés de água.

Embora não tenha havido diferença estatística entre as amostras chocolate, sem saborizante e café, optou-se pelas duas primeiras, em virtude do maior valor absoluto da média, para a realização dos testes de vida de prateleira e posterior produção para suplementação com idosos.

Os testes afetivos que melhor avaliam a aceitabilidade de produtos são aqueles que utilizam os próprios consumidores desses produtos e os seus resultados proporcionam maiores oportunidades de ação (STONE e SIDEL, 1993).

3.2.2 Teste de ideal de doçura

Este teste foi um ótimo parâmetro na avaliação das formulações, quanto a sua adequação na percepção de doçura, uma vez que inúmeros estudos têm demonstrado que a sensibilidade do sentido do gosto diminui com o avanço da idade dos indivíduos (SCHIFFMAN, 1993).

Ainda que a queda da percepção sensorial em idosos não possa ser revertida, o desenvolvimento de alimentos especiais para o grupo da 3ª idade, apresentando gosto e odor intensificados, pode compensar as perdas de percepção em função da idade (SCHIFFMAN, 1993; SCHIFFMAN *et al.*, 1997; SCHIFFMAN e WARWICK, 1989).

Pela análise do histograma (Figura 3.3) é possível observar que as amostras consideradas com maior percentual de adequação de doçura (escala 0 = ideal) foram as seguintes: chocolate (53,3%), café (50%), morango (46,7%) e a fórmula sem saborizante (40%). Já os menores resultados de adequação foram verificados para as amostras laranja (33,3%) e limão (23,3%). Estes resultados são concordantes com os observados no teste de aceitação, onde as amostras chocolate e sem saborizante obtiveram a maior aceitação, enquanto que as amostras laranja e limão foram as de maior rejeição, fato este que pode ser atribuído à inadequação de doçura destas amostras pelos provadores.

Por outro lado, pode-se observar, também, que a maior parte da porcentagem dos provadores que não considera as formulações como ideais (zero da escala), está situada ou como “ligeiramente menos doce que o ideal” ou como “ligeiramente mais doce que o ideal” para a maior parte das amostras avaliadas, demonstrando assim que de uma maneira geral as amostras apresentam-se adequadas no seu teor de doçura na opinião da maioria dos provadores.

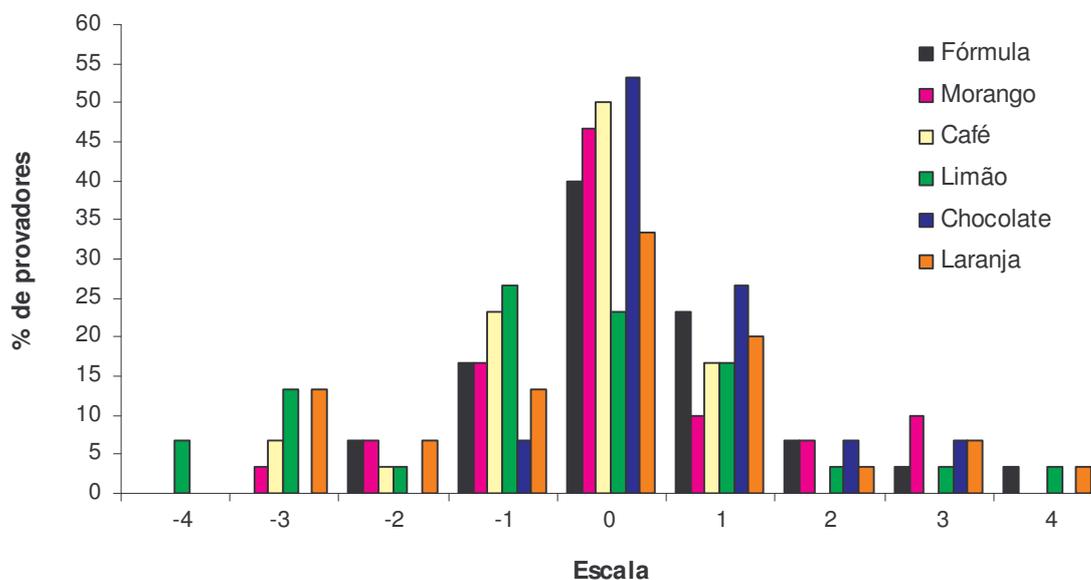


FIGURA 3.3. Histograma do ideal de doçura das formulações desenvolvidas. -4 = extremamente menos doce que o ideal; -3 = muito menos doce que o ideal; -2 = moderadamente menos doce que o ideal; -1 = ligeiramente menos doce que o ideal; 0 = ideal; 1 = ligeiramente mais doce que o ideal; 2 = moderadamente mais doce que o ideal; 3 = muito mais doce que o ideal; 4 = extremamente mais doce que o ideal.

3.2.3 Teste de intenção de compra

Com relação à intenção de compra (Figura 3.4), para as formulações chocolate, café e sem saborizante, dentre os 30 provadores que avaliaram essas amostras, mais de 70% tiveram atitude de compra entre “certamente compraria” e “tenho dúvidas se compraria”, sendo que a maior porcentagem dos provadores (33,3% para amostra chocolate e café) teve atitude de compra “provavelmente compraria”. Por outro lado, as formulações laranja, limão e morango obtiveram atitude de compra de mais de 50% dos provadores entre “provavelmente não compraria” e “certamente não compraria”. Estes resultados estão condizentes com os observados no teste de aceitação.

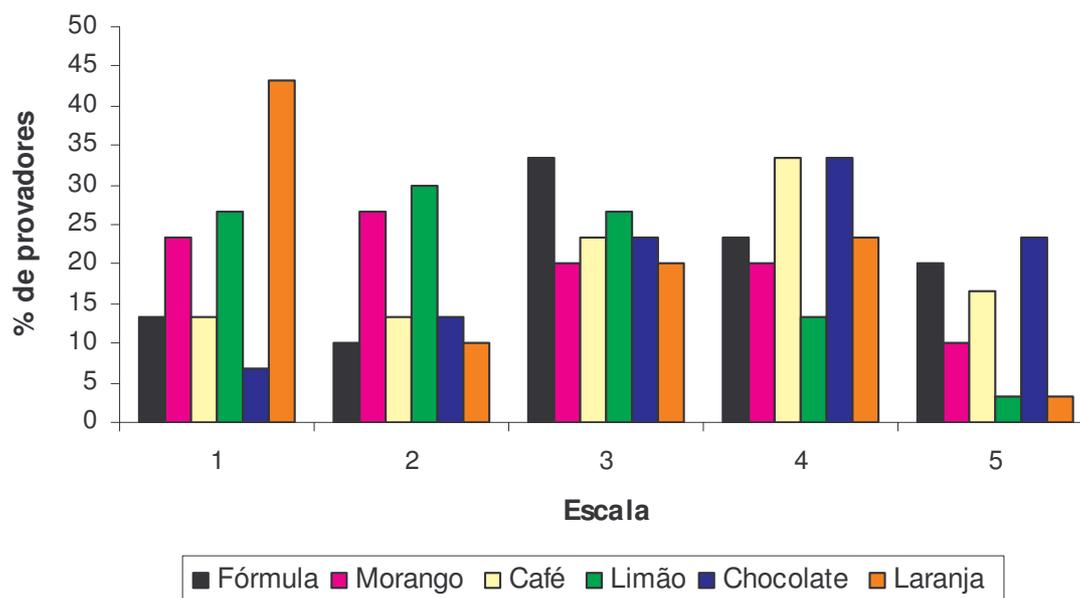


FIGURA 3.4. Histograma de intenção de compra dos provadores para as formulações desenvolvidas. 1 = certamente não compraria; 2 = provavelmente não compraria; 3 = tenho dúvidas se compraria ou não; 4 = provavelmente compraria; 5 = certamente compraria.

3.3. Composição Centesimal

Na Tabela 3.7 está apresentada a composição centesimal das duas formulações com maior aceitação conforme análise sensorial realizada com idosos. Pode-se observar que o componente de maior concentração foi o carboidrato para as duas amostras, em torno de 80%.

TABELA 3.7 Composição centesimal das formulações sem saborizante e chocolate.

Componentes	Formulações (porcentagem)	
	Sem saborizante	Chocolate
Proteína bruta (N x F) ¹	12,71 ± 0,34 ^a	12,82 ± 0,02 ^a
Lipídios totais	0,00	0,00
Cinzas	2,43 ± 0,01 ^b	2,50 ± 0,02 ^a
Umidade	5,09 ± 0,03 ^a	4,86 ± 0,03 ^b
Carboidrato ²	79,77	79,82

¹F: WPI = 6,38; HCB = 5,55; mistura 60%WPI:40%HCB = 6,05. ² Calculado por diferença = 100 – (proteína + lipídios totais + cinzas + umidade).

Resultados são médias de 3 determinações ± desvios padrão, exceto para carboidrato. Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A concentração de proteína não difere estatisticamente entre as duas amostras. Fato este esperado, pois a quantidade protéica adicionada foi a mesma. Já a concentração de minerais na formulação de chocolate é superior estatisticamente a encontrada na formulação sem adição de saborizante, uma vez que a diferença entre ambas está na adição de chocolate em pó, o qual apresenta conteúdo mineral em sua constituição conforme foi apresentado na Tabela 3.5. Verificou-se que o teor de umidade entre as amostras também difere estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4. CONCLUSÕES

Conforme o teste de aceitação realizado pelos idosos, constatou-se que as formulações com maiores médias foram sabor chocolate (6,87), sem saborizante (6,60) e café (6,50), as quais não diferiram entre si significativamente pelo teste de Tukey. Todas essas amostras foram preparadas com leite desnatado, demonstrando-se a sua preferência em relação às formulações preparadas com água pelos provadores.

Em relação ao ideal de doçura, verificou-se que, de um modo geral, grande parte das formulações apresentam-se adequadas no seu teor de doçura na opinião da maioria dos provadores.

No teste de intenção de compra, confirmou-se a preferência pelas amostras sabor chocolate, sem saborizante e café, onde mais de 70% dos provadores tiveram atitude de compra entre “certamente compraria” e “tenho dúvidas se compraria”.

Baseando-se nestes resultados optou-se por adotar as formulações sabor chocolate e sem saborizante para a realização dos testes de vida de prateleira.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVA, C.V. Invited comment. **Nutrition Reviews**. Baltimore, v. 59, n. 8, p. S91-S92, 2001.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br> [2005 Set 03].

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis, W. Horwitz (ed.), 15th edition, Washington, D.C., 1141p., 1990.

ARABBI, P.R. Alimentos funcionais – aspectos gerais. **Nutrire**, São Paulo, v.21, n. 7, p.87-102, 2001.

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.8, p. 911-917, 1959.

BORGES, V.C. Oligossacarídeos x fibras alimentares. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. São Paulo, v.12, n. 4, p. 161-164, 1997.

BRASIL. **Resolução nº 104 de 14 de maio de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/Aromas, Brasília, 1999.

BRASIL. **Resolução nº 389 de 5 de agosto de 1999**. Aprova o Regulamento técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas Funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 16: Bebidas – subcategoria 16.2.2 – Bebidas não Alcoólicas Gaseificadas e não Gaseificadas”, Brasília, 1999.

CAMPBELL, W.W.; EVANS, W.J. Protein requirements of elderly people. **European Journal of Clinical Nutrition**. Londres, v. 50 (S), p. 180-185, 1996.

CERVATO, A.M.; MAZZILLI, R.N.; MARTINS, I.S.; MARUCCI, M.F.N. Dieta habitual e fatores de risco para doenças cardiovasculares. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 227-235, 1997.

COUSSEMENT, P.A.A. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. **The Journal of Nutrition**. Bethesda, v. 129 (S), p.1412-1417, 1999.

CURIATI, J.A.E.; ALENCAR, Y.M.G. Nutrição e envelhecimento. In: CARVALHO FILHO, E.T.; PAPALÉO NETTO, M. **Geriatría: fundamentos, clínica e terapêutica**. São Paulo: Atheneu, 1994.

Dietary Reference Intakes – DRI for Calcium, phosphorous, magnesium, vitamin D and fluoride, The National Academies Press, 1997. Disponível em: <http://www.nap.edu/>. [Acesso 2005 mai 20].

_____; DRI for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline, The National Academies Press, 1998. Disponível em: <http://www.nap.edu/>. [Acesso 2005 mai 20].

_____; DRI for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids, The National Academies Press, 2000. Disponível em: <http://www.nap.edu/>. [Acesso 2005 mai 20].

_____; DRI for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc, The National Academies Press, 2001. Disponível em: <http://www.nap.edu/>. [Acesso 2005 mai 20].

_____; DRI for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids, The National Academies Press, 2002. Disponível em: <http://www.nap.edu/>. [Acesso 2005 mai 20]

ELSBORG, L.; NIELSEN, J.A.; BERTRAM, U. The intake of vitamins and minerals by the elderly at home. **International Journal Vitamin and Nutrition Research**. Bern Hans Huber, v. 53, n. 3, p. 321-329, 1983.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota:introducing the concept of prebiotics: Critical Review. **The Journal of Nutrition**. Bethesda, v.125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIESE, J. Developments in beverage additives. **Food Technology**. Chicago, v. 49, n. 9, p. 64-72, 1995.

GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 10 ed., São Paulo: Nobel, 430p., 1982.

GUIGOZ, Y.; ROCHART, F.; PERRUISSEAU-CARRIER, G.; ROCHAT, I.; SCHIFFRIN, E.J. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. **Nutrition Research**, Los Angeles, v.22, n.1-2, p.13-25, 2002.

LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**. Bethesda, v.78 (S), p. 517-520, 2003.

MASTROENI, M.F. “Estado nutricional e consumo de macronutrients de idosos da cidade de Joinville, SC”. **Tese de Doutorado**, Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2004.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**, Florida CRC Press, Inc., 1998.

_____; **CIVILLE, G.V.** Sensory Evaluation Techniques, **Florida CRC Press, Inc.**, 1999, 281p.

MOLNAR, P.; TOTH, M.; BOROSS, M.F. Sensory evaluation of select fruit juices and nectars by a panel group and by consumers. **Food Control**, USA, v.3, n.4, p. 213-217, 1993.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? **The Journal of Nutrition**. Bethesda, v. 129 (S), p. 1402-1406, 1999.

NOVARTIS. **Requerimientos nutricionales en la tercera edad**. Barcelona: Editado por Novartis Consumer Health S.A., 1998.

PALLÀS, M.C. Importancia de la nutrición en la persona de edad avanzada. Novartis. Barcelona: **Novartis Consumer Health S.A.**, 2002. Disponível em <http://www.novartismedicalnutrition.com/es> [Acesso 2004 Jun 28].

PASSOS, M.L.P.; PARK, Y.K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.33, n.2, p. 385-390, 2003.

PRADO, M.A.; REYES, F.G.R. Corantes artificiais: aspectos de legislação. **Notícias ILSI Brasil**. São Paulo, Ano 11, n.1, abril 2003.

RDA - RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES. National Academy of Science, USA. National Academy Press. Washington, D.C. 10th Edition, 1989.

REINECCIUS, G.A. Carbohydrates for flavor encapsulation. **Food Technology**. Chicago, v.45, n.3, p. 144-146, 1991.

ROBERFROID, M.B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **The Journal of Nutrition**. Bethesda, v. 128, n.1, p. 11-19, 1998.

ROBINSON, G.E.; LEIF, B.J. **Nutrition management & restorative dining for older adults – practical interventions for caregivers**. 1^a ed, Ed. American Dietetic Association, Chicago, v. 14, 2001.

SAS Institute. *SAS User's Guide: statistics*, v. 8.2. Cary, USA: SAS Inst., 1993.

SCHIFFMAN, S.S. Perception of taste and smell in elderly persons. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Drham, USA, v.33, n.1, p.17-26, 1993.

_____; GRAHAM, B.G.; SUGGS, M.S.; SATELLY-MILLER, E.A. Effect of psychotropic drugs on a range of taste responses in young and elderly persons. **Chemistry Senses**, North Carolina, v. 22, n.855, p.786-792, 1997.

_____; WARWICK, Z.S. Use of flavor-amplified foods to improve nutritional status in elderly persons, in nutrition and the chemical senses in aging: recent advances and current research needs. **New York Academy of Science**, North Carolina, v.561, n.1, p.267-276, 1989.

STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. 2^a ed, Academic Press: New York, 1993, 338p.

VICKERS, Z.; HOLTON, E.; WANG, J. Effect of ideal-relative sweetness on yogurt consumption. *Food Quality and Preference*. Barking, v.12, n.8, p.521-526, 2001.

WILSON, M.M.G.; PURUSHOTHAMAN, R.; MORLEY, J.E. Effect of liquid dietary supplements on energy intake in the elderly. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 75, n.5, p.944-947, 2002.

WOUTERS-WESSELING, W.; VAN HOOIJDONK, C.; WAGENAAR, L.; BINDELS, J.; DE GROOT, L.; VAN STAVEREN, W. The effect of a liquid nutrition supplement on body composition and physical functioning in elderly people. **Clinical Nutrition**, Midlothian, v. 22, n.4, p. 371-377, 2003.

Capítulo 4

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E VIDA DE PRATELEIRA DO PRODUTO

CAPÍTULO 4

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E VIDA DE PRATELEIRA DO PRODUTO

RESUMO

O objetivo deste capítulo foi realizar a caracterização físico-química e os testes de vida de prateleira das formulações sabor chocolate e sem saborizante, escolhidas pela análise sensorial com idosos. Foi realizado o estudo da vida útil do produto durante 30 dias de estocagem à temperatura ambiente e a 35 °C. Realizou-se análises de umidade, atividade de água (a_w), isoterma de adsorção, taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA), cor, avaliação sensorial e perda de vitaminas. O produto apresentou a_w inicial abaixo de 0,3, valor característico de alimentos desidratados. As isotermas de adsorção das formulações serviram para determinação dos valores de a_w crítica (0,5), umidade crítica (5,1%) e umidade inicial (~2,0%), os quais foram usados nos cálculos da estimativa da vida útil do produto. Encontrou-se um valor de TPVA de 1,0598 g H₂O/m².dia.58% UR. 27 °C para as embalagens de polipropileno usadas nos testes. Observou-se pequena variação na cor ($\Delta E^* = 0,4$ para formulação sem saborizante e 0,6 para a formulação chocolate) durante os 30 dias de estocagem. A qualidade sensorial manteve-se satisfatória nas três avaliações (tempo zero, 15 e 30 dias), obtendo-se médias de aceitação acima de 5 para todos atributos. Mais de 65% dos provadores tiveram intenção de compra entre “certamente compraria” e “tenho dúvidas se compraria”. Através desses resultados, constatou-se uma maior preferência pela formulação chocolate. Verificou-se uma diminuição apreciável no teor das vitaminas B₁, C, A e E ao final da estocagem. Através do ganho de peso das formulações, estimou-se a vida de prateleira do produto, a qual foi de aproximadamente de 4 meses.

1. INTRODUÇÃO

A vida de prateleira de um alimento é definida por VITALI e QUAST (1996) como o tempo em que o alimento pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luz, etc., sofrendo pequenas, mas bem estabelecidas alterações que são, até certo ponto, consideradas aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar vigente. Já SINGH (1996), define como o período de tempo durante o qual são mantidas a qualidade e a aceitabilidade do produto pelo consumidor. Esse período não é fixo, mas depende das condições nas quais o alimento é estocado.

A determinação inicial da estabilidade de um produto, normalmente, é realizada durante o seu desenvolvimento, para dar algumas indicações da expectativa da durabilidade do produto (HOWARTH, 1996).

Conforme FU e LABUZA (1998) no desenvolvimento de qualquer novo produto ou reformulação, alteração de embalagem ou condições de estocagem e distribuição, a estabilidade do produto é vital para seu sucesso no mercado.

A propriedade mais importante relativa a água em alimentos é a atividade de água (a_w), a qual é definida como a relação da pressão de vapor de água em equilíbrio com um alimento e a pressão de saturação de vapor na mesma temperatura (FONTANA, 1998). A relação que permite o cálculo da a_w é a seguinte:

$$a_w = p/p_0 = UR_e/100$$

Onde:

a_w = atividade de água

p = pressão de vapor de água sobre o produto

p_0 = pressão de vapor de água saturado à mesma temperatura

UR_e = umidade relativa de equilíbrio

De um modo geral, as alterações em função do teor de água presente no alimento incluem, entre outras, a multiplicação de microrganismos, reações enzimáticas, escurecimento não enzimático, oxidação de lipídios e vitaminas e alterações físicas como modificação da consistência, viscosidade e textura (TEIXEIRA NETO, 1997).

Valores críticos de a_w são estabelecidos como aqueles acima dos quais a deterioração do alimento ocorre. No caso dos alimentos desidratados esses valores situam-se abaixo de 0,6. No entanto, quando armazenados adequadamente outras reações de deterioração, como por exemplo, escurecimento ou descoloração e oxidação são as reações que deverão definir suas vidas de prateleira (TEIXEIRA NETO e JARDIM, 1996).

A isoterma de sorção é definida por HERNANDEZ (2002) como sendo a relação entre o conteúdo de umidade de um produto e a umidade relativa (ou atividade de água) a uma dada temperatura. Segundo o autor, a determinação da isoterma de sorção fornece importantes informações para que se possa estimar a vida útil de um produto cuja deterioração principal está baseada na troca de umidade com o meio. TEIXEIRA NETO e JARDIM (1996) destacam a grande sensibilidade ao ganho de umidade e conseqüente deterioração dos alimentos desidratados. Quando o produto ganha umidade, tem-se a isoterma de adsorção e o inverso, o produto perdendo umidade, tem-se a isoterma de dessorção.

Essas curvas são muito importantes quando se deseja estudar a conservação de alimentos desidratados e a especificação de embalagens mais adequadas para acondicioná-los (QUAST e GIL, 1973/74).

No entanto, a embalagem não melhora a qualidade do produto e não o preserva completamente durante a estocagem; se estiver adequadamente

especificada, retarda a perda de qualidade e permite que o alimento chegue até o consumidor em condições aceitáveis (PADULA, 1996).

O objetivo deste capítulo foi realizar a caracterização físico-química e os testes de vida de prateleira do produto dietético desenvolvido, acondicionado em embalagens flexíveis de polipropileno e estocado à temperatura ambiente e a 35 °C.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Vida de prateleira: considerações gerais, protocolo experimental

Os principais fatores que controlam a vida de prateleira são: tempo, temperatura, umidade, oxigênio, exposição à luz e a própria embalagem (LABUZA, 1982).

A estimativa da vida de prateleira pode ser feita através de teste de estocagem; teste acelerado e simulação por estimativa, baseada em modelos matemáticos (AZANHA e FARIA, 2005).

No presente estudo, realizou-se o teste acelerado para estimar a vida de prateleira do produto desenvolvido, uma vez que, os testes reais de vida útil muitas vezes podem demorar meses e até anos, para os casos em que o produto avaliado é pouco perecível, como por exemplo, alguns produtos desidratados, podendo ser considerado dispendioso e inviável em alguns casos.

Já os testes acelerados são baseados na análise da estabilidade do produto em condições abusivas, por exemplo, alta temperatura e umidade relativa, ciclos alternados de temperatura e umidade relativa. SPEIGEL e BROWN (1990) relatam que teoricamente, sob condições aceleradas, as deteriorações no produto acontecem a uma velocidade maior e, conseqüentemente, o tempo de estudo se reduzirá.

Deste modo, foi estudada a estabilidade do produto desenvolvido, em sua forma sem adição de saborizante e no sabor chocolate, por um período de 30 dias de armazenamento. Durante esse período, efetuou-se uma monitoração dos valores de umidade, atividade de água (a_w), cor, ganho de peso do produto, análise sensorial e perda de vitaminas (B_1 , A, C e E). As amostras foram

armazenadas à temperatura ambiente, para simular as condições reais de estocagem do produto, no Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Alimentos e Nutrição – FEA/UNICAMP, e em câmara a 35°C no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA/UNICAMP. As embalagens de polipropileno com dimensões de 10x15cm continham o equivalente a uma dose do produto, que no caso da amostra sem adição de saborizante era de 58,06g e para a amostra sabor chocolate de 61,06g. As análises foram realizadas no dia do processamento (tempo zero) e a cada 15 dias de armazenamento, até completar os 30 dias. A Figura 4.1 representa o delineamento experimental realizado para os testes de vida de prateleira do produto desenvolvido.

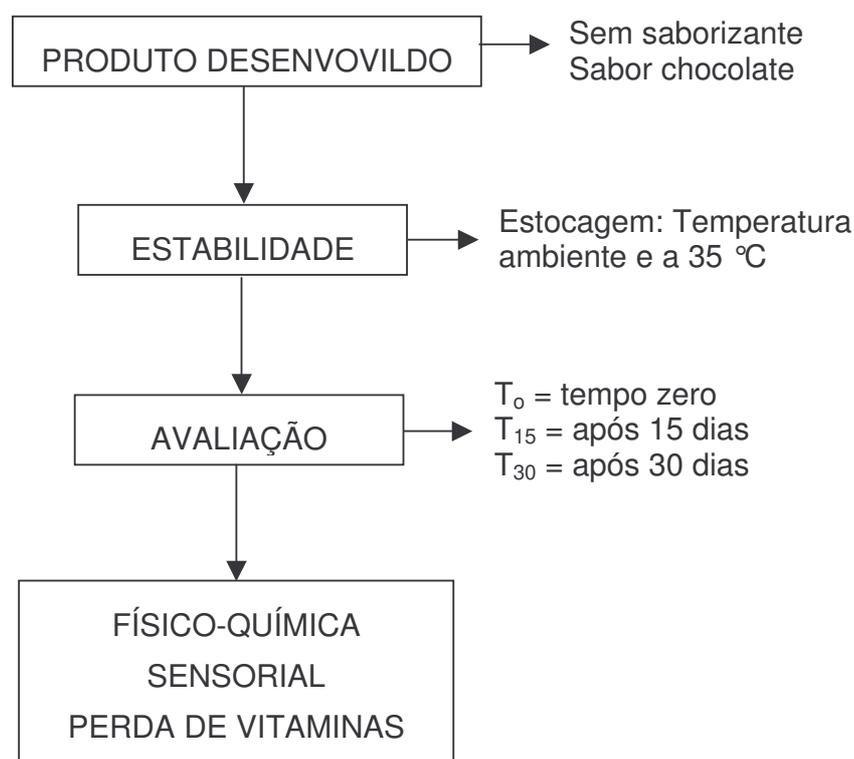


FIGURA 4.1. Delineamento experimental realizado para os testes de vida de prateleira (estabilidade) do produto desenvolvido.

2.2. Determinação de umidade e atividade de água (a_w)

Foi determinada de acordo com os procedimentos descritos no AOAC (1990), no tempo zero (para amostras em temperatura ambiente) e T_{30} dias (para amostras em temperatura ambiente e a 35 °C).

A atividade de água inicial do produto em suas duas opções (sem saborizante e chocolate) foi realizada utilizando um medidor portátil pa_w kit, modelo 950 NE da marca DECAGON. Para calibração do equipamento foram usadas soluções saturadas de cloreto de magnésio e lítio (atividades de água de 0,1-0,4) e sulfato de potássio (atividade de água de 0,975). As medidas foram feitas em duplicata e à temperatura ambiente (25,6 °C). No final do teste de vida de prateleira (tempo 30 dias) foi novamente determinada a a_w das amostras que foram armazenadas em temperatura ambiente e em câmara a 35 °C.

2.3. Determinação de isotermas de adsorção

A determinação da isoterma de adsorção pode ser realizada usando medidores diretos de a_w ou dessecadores com soluções salinas saturadas de conhecida atividade de água (umidade relativa de equilíbrio). Nos dois casos, paralelamente, são feitas medidas do teor de umidade das amostras. Essas medidas são geralmente feitas em amplas faixas de umidade, correspondendo a valores de a_w entre 0 a 1,0 (TEIXEIRA NETO e JARDIM, 1996). Nesse trabalho, realizou-se a determinação da isoterma de adsorção medindo-se diretamente a a_w com aparelho portátil pa_w kit, modelo 950 NE da marca DECAGON para identificar o comportamento do produto desenvolvido. No entanto, com intuito de determinar o ponto crítico (umidade e a_w limites) do produto, bem como, efetuar uma avaliação visual das transformações ocorridas (aglomeração/empedramento, mudança na cor e desenvolvimento microbiano) durante o período analisado foram utilizados dessecadores com soluções salinas saturadas, para controle da umidade relativa nos dessecadores.

Para determinação da isoterma de adsorção através de medidor direto de a_w realizou-se a secagem em estufa no Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Alimentos e Nutrição – FEA/UNICAMP. A temperatura foi mantida a 80 °C durante 1 hora sem que houvesse alterações na textura e na cor das amostras. Utilizou-se 1g para cada amostra, de modo a conseguir uma secagem completa ao final do tempo estabelecido. Após secagem, as amostras foram colocadas em dessecador com sílica por 30 minutos para esfriar. Transcorrido esse tempo, mediu-se a atividade de água inicial (como medida de comparação) com o pa_w kit e transferiu-se as amostras para dessecador com água destilada (100% de umidade) conforme a Figura 4.2. Após 1 hora pesou-se em balança analítica e mediu-se a a_w de cada amostra, repetindo-se esse procedimento de hora em hora para a construção da isoterma de adsorção. Foram realizadas 8 leituras de cada amostra (triplicata) e uma leitura final após 24 horas da medida inicial da a_w .

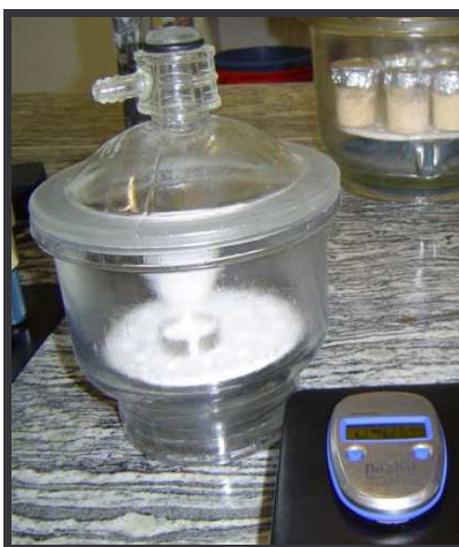


FIGURA 4.2. Ilustração do dessecador com água destilada (100% de umidade) para determinação da isoterma de adsorção através do medidor portátil pa_w kit.

Quando se utilizou dessecadores com soluções salinas saturadas as condições de temperatura foram de 26,8 °C \pm 1 °C. O produto formulado foi

utilizado na sua condição de estocagem em temperatura ambiente em embalagens de polipropileno seladas sem vácuo (seladora Selovac modelo 200-B) no início dos testes de vida de prateleira. Dessa forma, em sua condição inicial de umidade, sem realização de pré-secagem.

No levantamento dos pontos críticos da isoterma, amostras do produto (duplicata) foram mantidas sob sete condições diferentes de umidade relativa durante 3 semanas (Figura 4.3).



FIGURA 4.3. Ilustração dos dessecadores com soluções saturadas, para determinação dos pontos críticos do produto.

As condições estudadas em dessecadores foram preparadas com soluções salinas saturadas, que proporcionam os valores de umidade relativa necessários para a determinação dos pontos críticos do produto (a_w e umidade crítica). Essas soluções salinas, juntamente com as respectivas atividades de água, a 25 °C, estão apresentadas na Tabela 4.1.

TABELA 4.1. Soluções salinas saturadas utilizadas nos dessecadores e suas respectivas atividades de água a 25 °C.

Soluções salinas saturadas	Atividade de água
Acetato de potássio	0,22 b
Cloreto de magnésio	0,33 a
Carbonato de potássio	0,43 a
Nitrito de sódio	0,65 c
Cloreto de sódio	0,75 a
Cloreto de bário	0,90 a

Fonte: a) GREENSPAN (1977); b) KIMURA e MAEDA (1993); c) LABUZA (1983).

2.4. Determinação da taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA)

A permeação através de um filme polimérico é uma medida da taxa de transferência do estado estacionário do permeante e é geralmente expressa como constante de permeabilidade (P). Esta constante pode ser descrita em termos de dois parâmetros fundamentais, denominados de constante de difusão (D) e coeficiente de solubilidade (S) de acordo com FUJITA (1961) e CRANK (1975).

A permeação de um componente pode ser descrita pela seguinte equação:

$$P = D.S$$

Onde:

P = constante de permeabilidade

D = constante de difusão

S = coeficiente de solubilidade.

A taxa de permeabilidade ao vapor de água, comumente expressa em g água/(m².dia) foi determinada segundo metodologia descrita na AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM (2000).

Avaliou-se a permeabilidade através das embalagens de polipropileno, considerando-se a termoselagem eficiente. O dessecante, sílica gel anidra, foi pesado (em torno de 20g) e colocado diretamente nas amostras de embalagem, antes do fechamento das mesmas, por barras aquecidas.

A altura da selagem no corpo-de-prova foi previamente calculada de modo a se obter sempre a mesma área de permeação para todas as amostras. O experimento foi realizado em seis replicatas.

A seguir, as amostras foram deixadas na bancada do Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, sob condições ambiente de temperatura ($27\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) e umidade relativa ($58\% \pm 6\%$). Procedeu-se dessa maneira com o objetivo de reproduzir as condições reais de armazenamento do produto, uma vez que o mesmo foi estocado em temperatura ambiente. De acordo com VITALI e QUAST (1996) para produtos sensíveis ao ganho ou perda de umidade, acondicionados em embalagens permeáveis, é necessário realizar ensaios em temperatura ambiente por se assemelhar às condições extremas encontradas na distribuição.

Foram realizadas pesagens sucessivas de dois em dois dias até que se obtivesse uma taxa constante de ganho de peso. A partir desses dados, elaborou-se um gráfico do ganho de peso (g) versus tempo (dias) para o material teste. A parte linear da curva está associada ao estado estacionário de transferência de vapor de água através da embalagem. O valor médio da taxa de permeabilidade ao vapor de água exposta de cada embalagem (TPVA) foi calculado a partir do coeficiente angular da curva.

2.5. Determinação instrumental da cor

O espaço de cor CIElab (L^* , a^* e b^*) é uma das modificações do sistema do colorímetro de triestímulos (XYZ), juntamente como o sistema Hunter (L, a e b). Ele foi definido em 1971 pela CIE (Comissão Internationale d'Eclairage) objetivando uniformizar as diferenças de cor determinadas instrumentalmente com as diferenças visuais. Nesse espaço de cor, faz-se a leitura dos valores de L^* (luminosidade), das coordenadas de cromaticidade: a^* (intensidade das cores vermelha e verde, onde os valores positivos são vermelhos e os negativos são verdes) e b^* (intensidade das cores amarela e azul, onde os valores positivos são amarelos e os negativos são azuis), e dos valores de ΔE (grandeza da diferença entre as cores). Os valores dessas variações referem-se às diferenças entre a amostra que está sendo analisada, em determinado tempo, e a amostra considerada como padrão (HUNTER, 1975).

Para os testes de vida de prateleira do produto foi realizada a análise instrumental de cor no tempo zero, 15 e 30 dias da amostra sem saborizante e sabor chocolate. Foram realizadas em espectrofotômetro Colorquest II Hunterlab no Laboratório Central Analítico do Departamento de Alimentos e Nutrição da FEA – UNICAMP. Foi utilizado como iluminante D_{65} , ângulo de 10° e sistema de leitura CIElab.

As amostras foram medidas dentro das embalagens transparentes de polipropileno, sendo que a embalagem foi considerada na calibração do equipamento. Essas amostras foram analisadas em duplicata com caminho opticamente limpo de uma polegada, obtendo-se o valor de L^* (luminosidade) e das coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*).

Durante a determinação da isoterma de adsorção do produto, realizou-se a análise instrumental de cor das amostras nas diferentes atividades de água com objetivo de se verificar o ponto crítico para esse parâmetro no produto. Essa análise foi realizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas – ITAL 7 dias após início do experimento da isoterma de adsorção.

Para essa determinação de cor efetuou-se leitura no sistema CIElab em colorímetro Color Eye 2020 com *software* COMCOR 1500 Plus – Macbeth. A análise foi realizada diretamente nas cápsulas, onde se encontravam as amostras com 10° de observação, iluminante D₆₅ e configuração DREOL, obtendo-se os valores de L*, +a* (vermelho), -a* (verde) e +b* (amarelo) de acordo com FERREIRA (1991).

2.6. Avaliação sensorial

Esta avaliação sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Alimentos e Nutrição – FEA/UNICAMP com uma equipe de trinta provadores, recrutados dentre os alunos e funcionários da Faculdade e Engenharia de Alimentos – UNICAMP, com intuito de se verificar possíveis alterações sensoriais do produto sem saborizante e com sabor chocolate no decorrer da estocagem (tempo zero, T₁₅ e T₃₀) dos testes de vida de prateleira em temperatura ambiente.

Testes de aceitação

Esse teste foi executado para estudar a aceitação, das duas amostras escolhidas através da avaliação sensorial realizada com idosos, em relação à aparência, aroma, sabor e impressão global. As amostras foram servidas para os provadores através de uma apresentação monádica em copos plásticos de 50 mL, codificados com algarismos de três dígitos. Foram servidas em cabines individuais, sob luz natural, tendo ficado à disposição água e biscoito “cream-craker” (STONE e SIDEL, 1993).

Os testes de aceitação foram realizados utilizando-se escala hedônica estruturada de nove pontos (9 = “gostei muitíssimo” e 1 = “desgostei muitíssimo”), conforme Anexo 2.

Teste de intenção de compra

Utilizou-se a escala de cinco pontos de atitude de compra (MEILGAARD e CIVILLE, 1999), a qual é composta por: 1 = certamente não compraria; 2 = provavelmente não compraria; 3 = tenho dúvida se compraria ou não; 4 = provavelmente compraria e 5 = certamente compraria.

2.7. Análise de minerais e vitaminas

Os minerais e vitaminas adicionados às formulações foram determinados primeiramente para verificar se o seu conteúdo está concordante com as especificações fornecidas pelos fabricantes e também para determinar possíveis perdas de nutrientes durante a estocagem.

Os minerais cálcio, magnésio, zinco e selênio foram analisados apenas no tempo zero, bem como, as vitaminas B₆ e ácido fólico. Já as vitaminas B₁, C, A e E foram determinadas ao longo do estudo de vida de prateleira do produto (T₀, T₁₅ e T₃₀) por serem mais sensíveis à perdas durante a estocagem. Essas análises foram realizadas no Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas. A vitamina B₁₂ não pode ser determinada devido sua baixa concentração no produto.

O cálcio, magnésio e zinco foram determinados conforme metodologia proposta por SLAVIN, PETERSEN e LINDHAL (1975). Para selênio utilizou-se o método de OLSON, PALMER e CARY (1975).

As vitaminas foram determinadas através das seguintes metodologias: vitamina B₁ (HORWITZ, 2000; VAN DE WEERDHOFF, WIERSUN e REISSENWEBER, 1973); vitamina B₆ (HORWITZ, 2000; GREGORY e KIRK, 1978); ácido fólico (LIMA, CATHARINO e GODOY, 2004); vitamina A (MANZ e PHILIPP, 1988); vitamina E (BRUBACHER, MÜLLER-MULOT e SOUTHGATE, 1985) e ácido ascórbico (ARAKAWA *et al.*, 1981).

2.8. Estimativa da vida de prateleira do produto

Para os cálculos da estimativa da vida de prateleira do produto desenvolvido não se adotou os modelos matemáticos estudados por AZANHA e FARIA (2005). Ao invés disso, esses cálculos foram realizados através do ganho de peso do produto embalado, o qual foi medido no decorrer do período de estocagem (30 dias). Com esses dados, construiu-se o gráfico ganho de peso (g) versus tempo (dias) e a partir da equação da reta obtida, onde x era o tempo e y a variação de umidade (diferença entre a umidade crítica, obtida da análise da isoterma em dessecadores, e a umidade inicial de cada amostra), estimou-se a vida útil das amostras estocadas.

Uma outra forma realizada para estimar a estabilidade das amostras foi através da elaboração do gráfico % umidade versus a_w , o qual origina uma equação de polinômio de 3º grau. A partir dessa equação, onde o valor de x representa a a_w , obtém-se o valor de y, calculando-se a variação de umidade (ΔU) de cada uma das amostras. Através desse dado e do valor de TPVA (Taxa de Permeabilidade ao Vapor de Água), estimou-se a vida de prateleira do produto (comunicação pessoal, FARIA, 2005).

2.9. Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias, pelo teste de Tukey (GOMES, 1982), utilizando-se o programa “Statística: Basic Statistics and Tables”, sendo que para as análises sensoriais usou-se o programa estatístico SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Umidade e atividade de água (a_w)

Determinou-se o teor de umidade e a atividade de água do produto sem saborizante e do produto aromatizado com chocolate no início do teste de vida de prateleira (tempo zero), bem como no final desse teste (T_{30} dias). Essa determinação foi realizada nas amostras armazenadas à temperatura ambiente e a 35 °C (Tabela 4.2).

TABELA 4.2. Teor de umidade e atividade de água (a_w) das formulações sem saborizante e chocolate no tempo inicial (T_0) e no tempo final (T_{30} dias) do estudo de vida de prateleira.

Formulações	Umidade inicial* (T_0)		Umidade final* (T_{30})	
	Temp. ambiente	Temp. ambiente	Temp. ambiente	Temp. 35 °C
Sem saborizante	5,09 ± 0,03 ^{Ab}	5,78 ± 0,11 ^{Aa}	4,73 ± 0,05 ^{Bc}	
Chocolate	4,86 ± 0,03 ^{Bb}	5,71 ± 0,40 ^{Aa}	4,87 ± 0,03 ^{Ab}	

Formulações	a_w ** (T_0)		a_w ** (T_{30})	
	Temp. ambiente	Temp. ambiente	Temp. ambiente	Temp. 35 °C
Sem saborizante	0,28	0,42	0,28	
Chocolate	0,29	0,39	0,30	

*Resultados são média de 3 determinações ± desvios padrão. Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ** Resultados são média de 2 determinações.

Para a formulação sem saborizante, verificou-se que o teor de umidade no decorrer do estudo de vida útil não diferiu à temperatura ambiente, mas quando armazenada em câmara a 35 °C, observou-se uma diminuição significativa. Já para a formulação de chocolate, à temperatura ambiente, houve um ganho de umidade significativo no decorrer do tempo de estocagem, o que não foi verificado com as amostras armazenadas a 35 °C.

A umidade manteve-se superior na formulação sem saborizante em relação ao chocolate, na temperatura ambiente, no decorrer do estudo, porém no final (T_{30} dias) não houve diferença estatística entre ambas.

A atividade de água das formulações sem saborizante e chocolate demonstraram o mesmo comportamento no decorrer do estudo da vida útil do produto, apresentando um aumento na a_w à temperatura ambiente, e uma manutenção do valor de a_w a 35°C, quando comparada a a_w inicial das amostras. Através desses resultados, pode-se concluir que o aumento da a_w , a temperatura ambiente, foi decorrente do ganho de umidade das formulações, estando de acordo com os dados apresentados na Tabela 4.2, devido à permeabilidade da embalagem de polipropileno usada no estudo de vida de prateleira deste produto.

Ambas formulações apresentaram o mesmo comportamento no decorrer do tempo de estocagem e nas diferentes temperaturas avaliadas, não. Observou-se que os valores de a_w encontrados para as formulações desenvolvidas no início do estudo (T_0) estão dentro dos valores relatados na literatura para alimentos desidratados, os quais pela sua natureza apresentam a_w baixa, geralmente inferior a 0,30 (VITALI e QUAST, 1996). No entanto, no final desse estudo (T_{30} dias) a atividade de água aumentou para aproximadamente 0,4, à temperatura ambiente, sugerindo-se que a embalagem utilizada não oferece uma barreira adequada aos vapores de água, devendo-se escolher uma embalagem com maior proteção para armazenar o produto desenvolvido.

3.2. Determinação da isoterma de adsorção

O conteúdo de umidade de equilíbrio em base seca foi determinado para cada valor de atividade de água das duas formulações desenvolvidas. Os valores experimentais estão apresentados nas Tabelas 4.3 e 4.4. Através destes valores construiu-se os gráficos umidade de equilíbrio *versus* atividade de água, os quais representam as isotermas de adsorção da formulação sem saborizante e sabor chocolate (Figuras 4.4 e 4.5, respectivamente).

TABELA 4.3. Valores experimentais de umidade de equilíbrio (%) em várias condições de atividade de água para a formulação sem saborizante, a temperatura ambiente (27 °C).

Atividade de água	Umidade de equilíbrio (% base seca)
0,01	0
0,26	1,94 ± 0,17
0,38	3,11 ± 0,23
0,44	3,83 ± 0,24
0,46	4,45 ± 0,22
0,49	4,95 ± 0,22
0,52	5,45 ± 0,18
0,54	5,88 ± 0,18
0,55	6,20 ± 0,16
0,78	13,53 ± 0,41

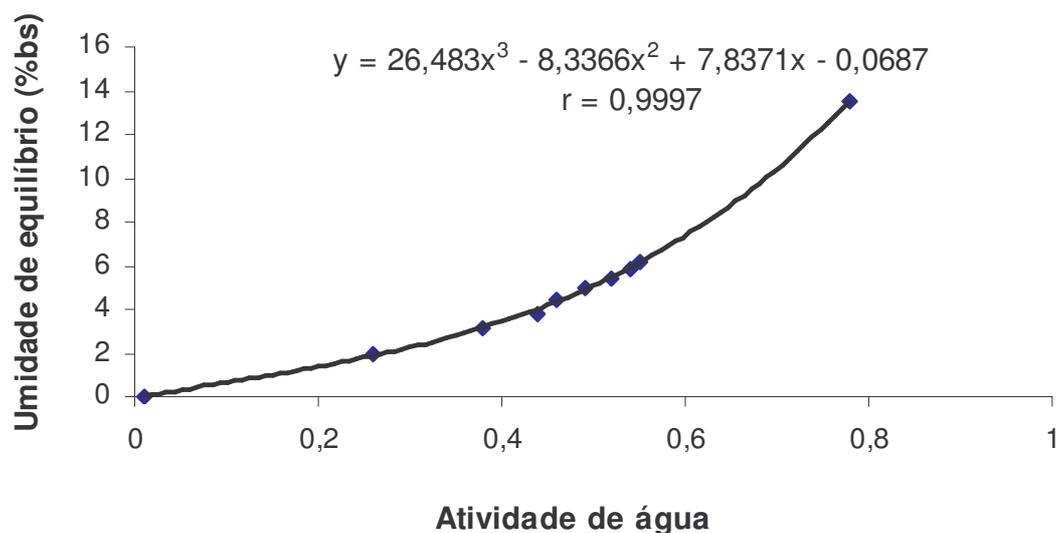


FIGURA 4.4. Isoterma de adsorção da formulação sem saborizante em temperatura ambiente (27 °C).

TABELA 4.4. Valores experimentais de umidade de equilíbrio (%) em várias condições de atividade de água para a formulação chocolate, a temperatura ambiente (27 °C).

Atividade de água	Umidade de equilíbrio (%)
0,01	0
0,29	2,14 ± 0,12
0,4	3,36 ± 0,15
0,44	4,05 ± 0,14
0,48	4,69 ± 0,11
0,5	5,20 ± 0,09
0,53	5,74 ± 0,06
0,55	6,10 ± 0,06
0,57	6,43 ± 0,06
0,78	13,99 ± 0,35

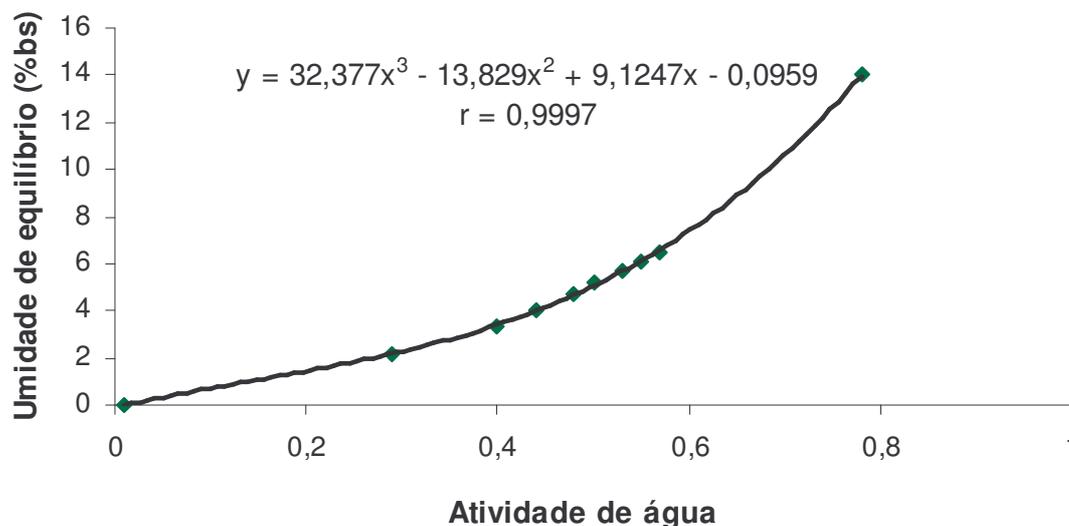


FIGURA 4.5. Isoterma de adsorção da formulação sabor chocolate em temperatura ambiente (27 °C).

As isotermas, para as duas formulações, apresentaram formatos muito semelhantes, ficando próximas a classificação do tipo II, segundo BRUNAUER *et al.* (1938). No entanto, para afirmar com certeza se o produto realmente se comporta dessa maneira, seria necessário a realização de mais pontos com a_w superior a 0,8 (Figuras 4.4 e 4.5). Os mesmos autores demonstraram que a configuração e formato da curva dependem das propriedades do produto.

Para a maioria dos alimentos, sua configuração típica é a curva em formato sigmoidal representativa da isoterma tipo II (BELL e LABUZA, 1996).

Através dos dessecadores com soluções salinas saturadas, sob condições de temperatura ambiente (26,8 °C ± 1°C), determinou-se os pontos críticos (umidade e a_w limites) do produto. Além disso, avaliou-se visualmente as transformações ocorridas (aglomeração/empedramento, mudança na cor e desenvolvimento microbiano) durante 3 semanas de estudo.

As principais transformações que se verificam com o aumento de umidade, para produtos secos, são a aglomeração e o empedramento. Para umidade

relativa de equilíbrio muito alta o que se observa é uma dissolução parcial ou total do produto, principalmente para àqueles com alto teor de açúcar (TEIXEIRA NETO e QUAST, 1977).

O início da aglomeração das amostras ocorreu em atividade de água aproximada de 0,65, para as duas formulações. Fato este não verificado na atividade de água de 0,43. Sendo esse valor de atividade de água (ou umidade relativa de equilíbrio) considerado como crítico para a definição da barreira ao vapor de água a ser estabelecida, quando da escolha do material de embalagem, de modo a manter a qualidade do produto durante o período de vida de prateleira.

Em umidade relativa de 90 e 100%, todas as amostras apresentaram certa liquefação. Durante as 3 semanas de avaliação, observou-se o crescimento de fungos apenas nessas umidade relativa, com as amostras de chocolate apresentando maior susceptibilidade ao desenvolvimento microbiano, quando comparadas às amostras da formulação sem saborizante, as quais demonstraram maior resistência.

Quanto à alteração visual de cor, observou-se um leve escurecimento da formulação chocolate com atividade de água de 0,43, acentuando-se para ambas formulações a partir de 0,65 com uma semana de estudo. No entanto com apenas dois dias de experimento, a 90 e 100% UR, as mudanças na cor foram significativas.

Ao observar as amostras no decorrer de uma semana, determinou-se que o ponto crítico (a_w crítica) das duas formulações foi 0,5, levando-se em consideração o início da aglomeração. Com este valor de atividade de água, determinou-se a umidade crítica, da formulação sem saborizante e com chocolate, através das equações polinomiais de 3ª ordem ilustradas nas Figuras 4.4 e 4.5, as quais coincidentemente apresentaram o mesmo valor de umidade crítica (5,1%) para as

duas formulações. Através destas mesmas equações, também se determinou a umidade inicial das formulações (~2,0%).

3.3. Taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA)

Os produtos acondicionados nas embalagens de polipropileno com espessura de 0,05mm foram avaliados durante 32 dias, resultando em um gráfico com 11 pontos (Figura 4.6).

O valor de TPVA foi obtido através do coeficiente angular médio da equação da reta (Figura 4.6), para as embalagens avaliadas, cujo valor foi de 1,0598 g H₂O/m².dia.58%UR.27 °C. Dividindo-se pela área de exposição, obteve-se o valor de TPVA por m².

Para embalagens plásticas flexíveis, a TPVA depende do tipo de material utilizado em sua fabricação, como o tipo de resina, espessura e também da temperatura e umidade relativa do ambiente de estocagem (PADULA, 1996).

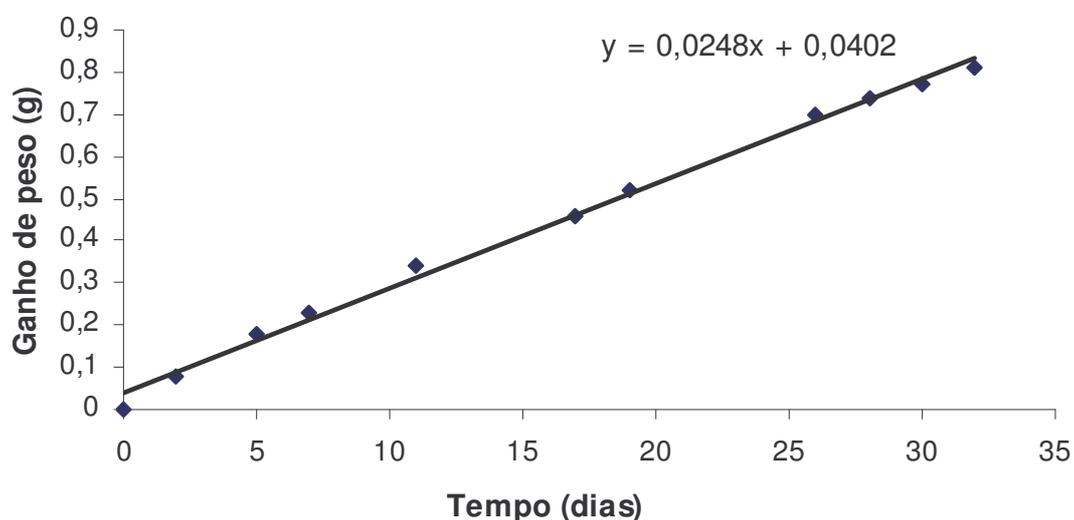


FIGURA 4.6. Valores do ganho de peso das amostras sem saborizante ou chocolate durante 32 dias de estudo.

À medida que se aumenta a espessura dos filmes, diminui-se a TPVA. Para a maior parte das resinas, um aumento de um grau centígrado pode proporcionar um aumento de 10% do valor de TPVA. No caso da temperatura, verificou-se que, sua influência em filmes de 100 μ m de espessura e 80%UR, promoveu uma elevação nos valores de TPVA com o aumento da temperatura (GARCIA *et al.*, 1989). Já a umidade relativa na qual a TPVA é determinada representa o gradiente de concentração que irá promover a permeação do vapor de água e, portanto, quanto maior a umidade relativa do ambiente de estocagem, maior é a TPVA da embalagem, conforme os mesmos autores.

Considerando-se que o produto será estocado à temperatura ambiente, quando for administrado ao grupo de idosos, optou-se pela determinação da TPVA da embalagem nestas condições ambientais (27 °C e 58% UR), não se mantendo as amostras sob temperatura e umidade relativa controladas conforme recomenda a literatura. Dessa forma, não se limitou às recomendações para a determinação da TPVA, as quais geralmente são: 23 °C/ 75%UR; 38 °C/ 90%UR; 40°C/ 85%UR (GARCIA *et al.*, 1989).

Assim, não é possível realizar uma comparação do valor encontrado neste trabalho com os valores de TPVA da literatura. No entanto, apenas com propósito ilustrativo o valor de TPVA verificado para polipropileno (25 μ m) a 38 °C/ 90%UR é 11,0 g água/m².dia; se mudarmos as condições para esse mesmo material, com 100 μ m de espessura, 80%UR e variando-se a temperatura (23, 30, 40 e 50 °C) verifica-se valores de TPVA de 0,263; 0,5; 1,20 e 2,65, respectivamente (GARCIA *et al.*, 1989).

É importante ressaltar que o limite de vida de prateleira de produtos desidratados é estabelecido pelo conteúdo de umidade máxima permitida para que não ocorram alterações indesejadas, sendo recomendável a utilização de materiais de embalagem com baixa permeabilidade ao vapor de água (PADULA, 1996).

3.4. Análise instrumental da cor

Os parâmetros de cor avaliados no decorrer do estudo de vida de prateleira (T_0 ; T_{15} e T_{30}), para a formulação sem saborizante e sabor chocolate, estão apresentados nas Tabelas 4.5 e 4.6.

TABELA 4.5. Valores da luminosidade (L^*), das coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*) e diferenças em relação ao padrão (tempo zero) para a formulação sem saborizante, à temperatura ambiente

Tempo (dias)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
T_0	96,80	-0,44	6,80	
T_{15}	96,78	-0,43	7,06	0,24
T_{30}	96,81	-0,52	7,26	0,43

- valores médios de duas repetições

-

TABELA 4.6. Valores da luminosidade (L^*), das coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*) e diferenças em relação ao padrão (tempo zero) para a formulação sabor chocolate, a temperatura ambiente.

Tempo (dias)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
T_0	77,70	5,32	12,04	
T_{15}	78,10	5,20	11,86	0,49
T_{30}	78,16	5,14	11,82	0,58

* valores médios de duas repetições

Os valores de luminosidade e dos parâmetros a^* e b^* ficaram praticamente constantes ao longo do período de armazenamento para a formulação sem saborizante. Com um leve aumento da cor verde, a qual é representada pelos valores negativos de a^* e uma maior variação nos valores de b^* , demonstrando um aumento ao longo da estocagem da cor amarela desta formulação.

Adicionalmente, quando se avaliou o quanto as amostras variaram no final do estudo (valores de ΔE^*) em relação ao padrão inicial, notou-se que os 30 dias de estocagem não foram suficientes para promover alterações apreciáveis da cor do produto, assim como foi verificado com a análise sensorial.

Da mesma forma que para a formulação sem saborizante, a de sabor chocolate praticamente não apresentou grandes variações nos valores de L^* , a^* e b^* . Observou-se pequena diminuição da cor vermelha (a^*) e amarela (b^*) ao longo do estudo. No entanto, os valores de ΔE^* demonstraram maior variação quando comparados aos valores encontrados para a formulação sem saborizante.

Com uma semana do início da determinação da isoterma de adsorção do produto através do uso de dessecadores, realizou-se a análise instrumental de cor das amostras nas diferentes condições de atividade de água conforme apresentado nas Tabelas 4.7; 4.8 e na Figura 4.7.

TABELA 4.7. Valores da luminosidade (L^*), das coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*) e diferenças em relação ao padrão (tempo zero) para a formulação sem saborizante, a temperatura ambiente.

Atividade de água	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
0,22	85,5	-0,5	5,7	14,10
0,33	85,5	-0,5	11,1	14,42
0,43	87,3	-0,7	7,0	11,86
0,65	84,2	0,2	10,1	15,80
0,75	79,4	0,4	13,0	21,78
0,90	50,8	6,1	20,6	52,87
1,00	49,0	7,1	20,4	54,64

* valores médios de duas repetições

TABELA 4.8. Valores da luminosidade (L^*), das coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*) e diferenças em relação ao padrão (tempo zero) para a formulação chocolate, a temperatura ambiente.

Atividade de água	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
0,22	65,1	4,5	8,7	14,54
0,33	64,2	5,1	9,5	15,35
0,43	64,3	4,4	8,7	15,39
0,65	59,1	5,4	10,1	20,67
0,75	51,9	5,7	10,5	27,95
0,90	21,9	5,3	5,7	54,41
1,00	20,8	4,1	3,3	55,41

* valores médios de duas repetições

Pode-se observar, pela Tabela 4.7, que ocorreu uma queda significativa nos valores de luminosidade da formulação sem saborizante, indicando o escurecimento da amostra à medida que se aumentou a atividade de água. Outras modificações observadas foram que nas a_w mais baixas (0,22; 0,33 e 0,43) as amostras apresentavam uma leve tonalidade verde que passou à vermelha a partir da a_w de 0,65. Também houve uma intensificação da tonalidade amarela.

A formulação de chocolate apresentou o mesmo comportamento da formulação sem saborizante em relação aos valores de luminosidade, com acentuado escurecimento, principalmente a 90 e 100% de umidade relativa de equilíbrio. Observou-se um aumento nas tonalidades vermelha e amarela até atividade de água de 0,75. Nas a_w superiores (0,9 e 1,0), observou-se uma queda desses valores, o que pode ser explicado pelas grandes alterações que essas atividades de água proporcionaram ao produto com uma semana de estudo, conforme ilustrado na Figura 4.7.



FIGURA 4.7. Alteração na cor das amostras armazenadas em 100% de umidade relativa de equilíbrio: a) com um dia de armazenamento e b) com uma semana de armazenamento.

Com relação aos valores de ΔE^* observados nas Tabelas 4.7; 4.8 e ilustrados na Figura 4.8, observou-se que as amostras comportaram-se de forma semelhante à medida em que aumentou-se a atividade de água, variando de aproximadamente 14 em a_w de 0,22 para 55 em a_w de 1,00.

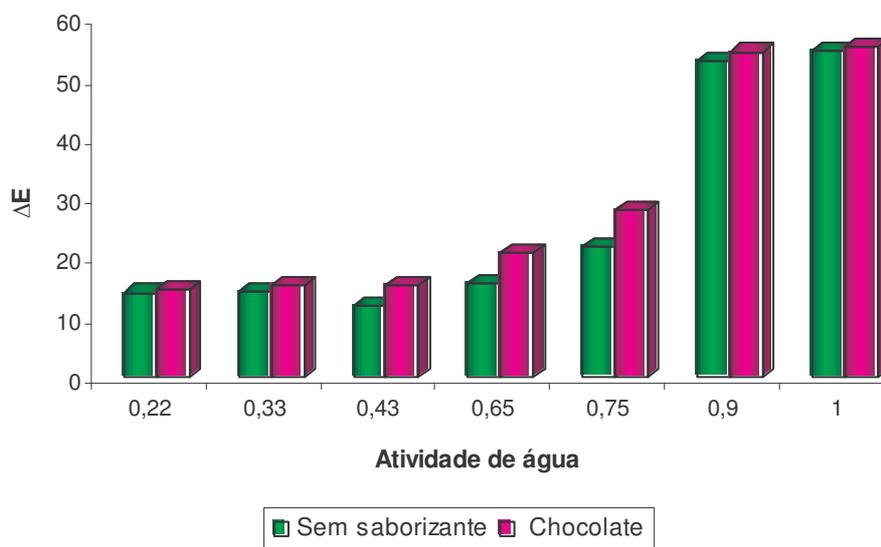


FIGURA 4.8. Valores das diferenças em relação ao padrão (tempo zero), ΔE^* , para a formulação sem saborizante e sabor chocolate, a temperatura ambiente.

3.5. Avaliação sensorial

3.5.1. Teste de aceitação do produto: tempos T_0 ; T_{15} e T_{30}

O teste de aceitação com relação aos atributos aroma, sabor, aparência e impressão global foi realizado com alunos e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP para se verificar possíveis alterações sensoriais nas formulações desenvolvidas ao longo do estudo de vida de prateleira (T_0 ; T_{15} e T_{30} dias). Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 4.9 e Figuras 4.9 e 4.10.

TABELA 4.9. Teste de aceitação nos tempos: 0, 15 e 30 dias, respectivamente, do estudo de vida de prateleira.

Atributos (T ₀)	Média de aceitação * da formulação s/ saborizante	Média de aceitação * da formulação chocolate
Aroma	5,76 ^b	6,88 ^a
Sabor	5,79 ^a	6,27 ^a
Aparência	6,79 ^a	6,70 ^a
Impressão Global	6,03 ^a	6,45 ^a

Atributos (T ₁₅)	Média de aceitação * da formulação s/ saborizante	Média de aceitação * da formulação chocolate
Aroma	5,71 ^b	6,71 ^a
Sabor	5,41 ^b	6,50 ^a
Aparência	6,59 ^a	6,82 ^a
Impressão Global	5,97 ^b	6,79 ^a

Atributos (T ₃₀)	Média de aceitação * da formulação s/ saborizante	Média de aceitação * da formulação chocolate
Aroma	6,24 ^b	6,79 ^a
Sabor	5,71 ^b	6,76 ^a
Aparência	6,94 ^a	6,82 ^a
Impressão Global	6,12 ^b	6,76 ^a

* Médias marcadas com letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Verificou-se que no tempo zero apenas a média de aceitação de aroma diferiu estatisticamente entre as formulações analisadas. No tempo de 15 dias, bem como, no tempo final do estudo (T₃₀), as amostras não diferiram significativamente, com exceção à aparência, sendo que todos os demais apresentaram média de aceitação superior para a formulação sabor chocolate.

Comparando-se as médias de aceitação para impressão global da análise sensorial realizada com idosos com essas análises realizadas com um público mais jovem, verificou-se que houve ligeiras diferenças nos valores absolutos para a formulação chocolate, porém encontram-se situadas no mesmo patamar da escala hedônica (“gostei moderadamente”). Já para a formulação sem saborizante, a variação entre essas análises foi um pouco maior, pois na análise com idosos as médias ficaram em “gostei moderadamente” enquanto com os indivíduos mais jovens ficaram em “gostei ligeiramente”. Portanto, demonstrando que para este teste sensorial a variação da faixa etária não influenciou significativamente a aceitação do produto.

Com base nas Figuras 4.9 e 4.10, pode-se concluir que para a formulação sem saborizante, não houve diminuição significativa no decorrer do estudo de vida de prateleira para nenhum parâmetro avaliado, inclusive no tempo final (T_{30}) houve um ligeiro aumento nas médias para o aroma e aparência do produto.

Para a formulação chocolate, também não houve diminuição nas médias de aceitação para nenhum atributo avaliado, ao contrário observou-se um pequeno aumento nos valores de aceitação no tempo final quando se comparou com o início do estudo para os atributos sabor, aparência e impressão global. Portanto, nos 30 dias de avaliação da vida útil do produto desenvolvido a qualidade sensorial manteve-se satisfatória.

É importante destacar que para todos os tempos e atributos avaliados, das duas formulações, observou-se médias de aceitação acima do ponto de corte 5 (STONE e SIDEL, 1993), indicando que o produto foi bem aceito pelo público mais jovem, assim como foi verificado com os idosos.

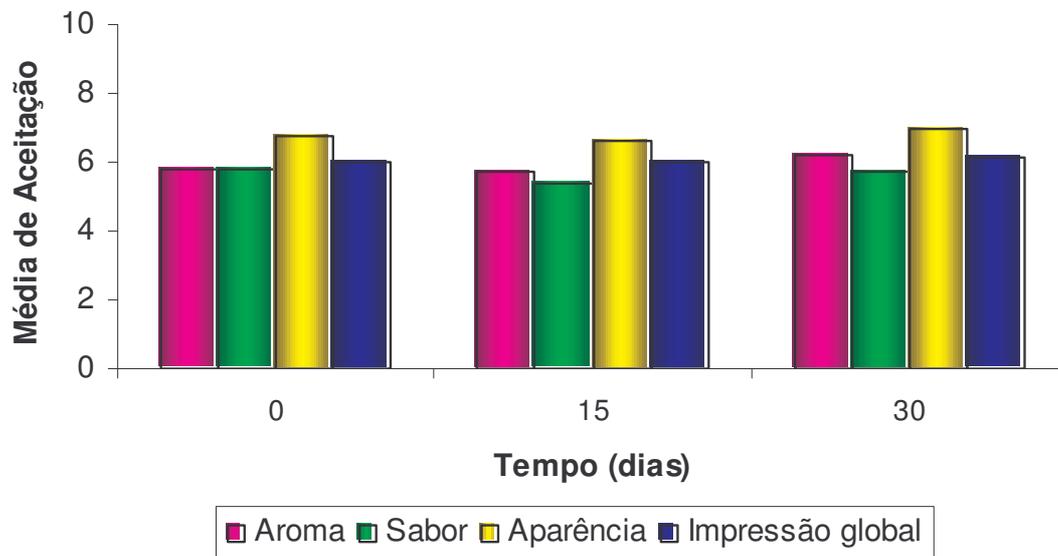


FIGURA 4.9. Média de aceitação dos parâmetros aroma, sabor, aparência e impressão global da análise sensorial realizada durante os testes de vida de prateleira nos tempos zero, 15 e 30 dias para a amostra sem saborizante.

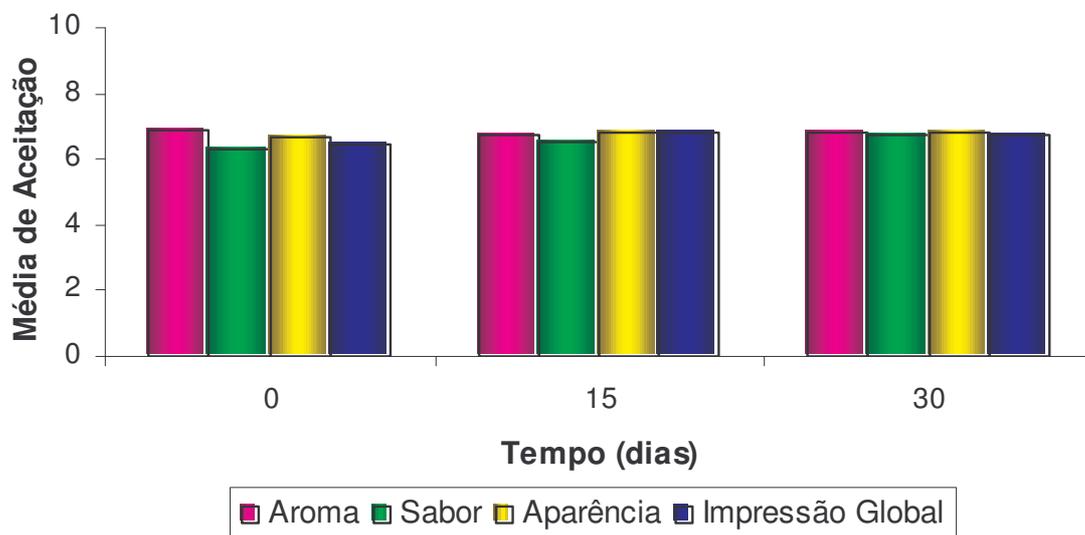


FIGURA 4.10. Média de aceitação dos parâmetros aroma, sabor, aparência e impressão global da análise sensorial realizada durante os testes de vida de prateleira nos tempos zero, 15 e 30 dias para a amostra sabor chocolate.

3.5.2 Teste de intenção de compra: T₀; T₁₅ e T₃₀

Com relação à intenção de compra (Figura 4.11), para as formulações chocolate e sem saborizante, dentre os 30 provadores que avaliaram essas amostras, mais de 65% tiveram atitude de compra entre “certamente compraria” e “tenho dúvidas se compraria” nos três tempos de análise.

Em relação à formulação sem saborizante, verificou que as maiores atitudes de compra foram verificadas para o T₀ em “provavelmente compraria” (36,4%); para o T₁₅ em “tenho dúvidas se compraria” (38%) e para T₃₀ em “provavelmente compraria” (29%). Já para a formulação chocolate, verificou-se o seguinte perfil de intenção de compra no decorrer do estudo: T₀ e T₃₀ em “provavelmente compraria” (33,3 e 38,2%, respectivamente) e para o T₁₅ houve uma mesma intenção de compra com 35,3% dos provadores optando entre “provavelmente compraria” e “tenho dúvidas se compraria”.

Portanto, ficou evidenciada a provável intenção de compra para as duas formulações, indicando que o tempo de estocagem não influenciou negativamente, sendo que estes resultados estão concordantes com os valores das médias do teste de aceitação realizado.

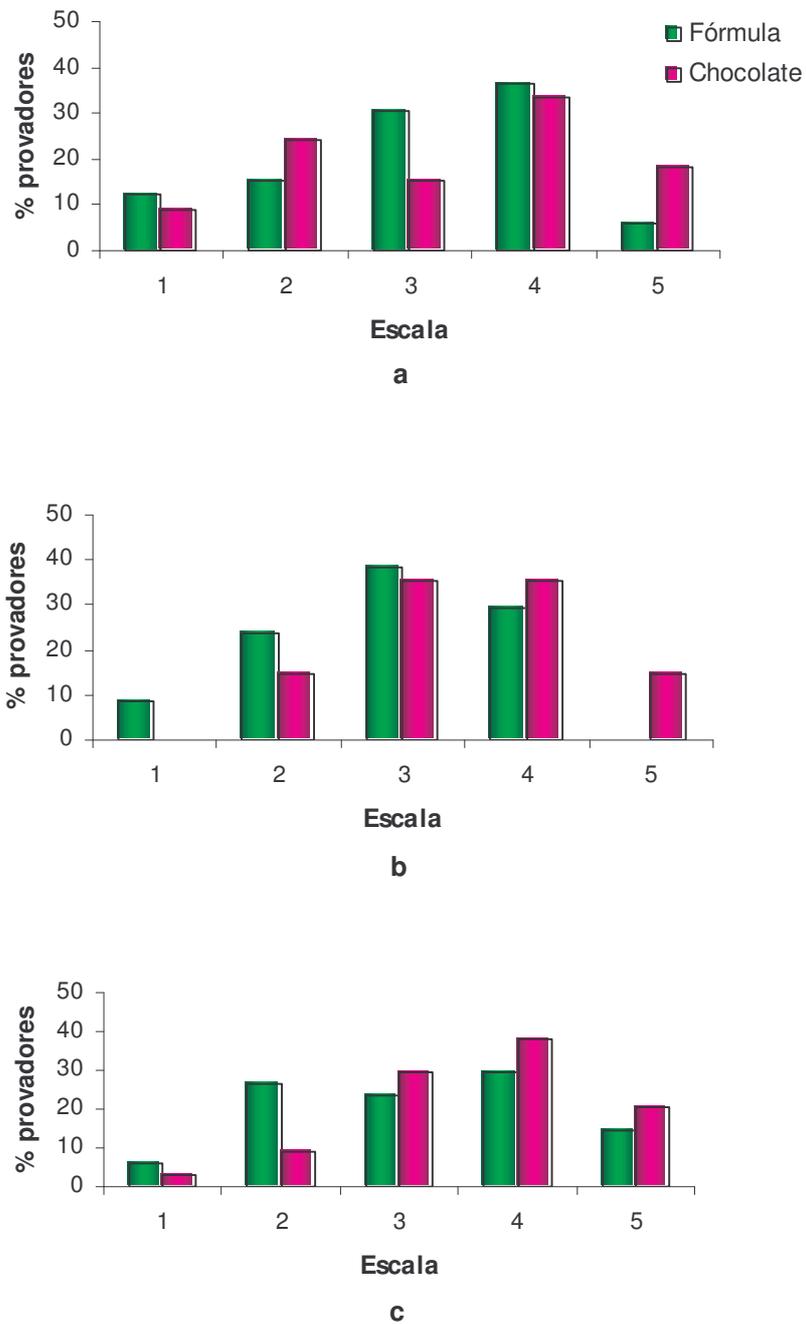


FIGURA 4.11. Histograma de intenção de compra realizado no tempo zero (a); tempo 15 dias (b) e tempo 30 dias de estocagem (c) em temperatura ambiente. 1 = certamente não compraria; 2 = provavelmente não compraria; 3 = tenho dúvidas se compraria ou não; 4 = provavelmente compraria; 5 = certamente compraria.

3.6. Análise de minerais e vitaminas: T₀; T₁₅ e T₃₀

Para efeitos de confirmação do teor especificado pelos fabricantes, bem como, para verificar se as quantidades adicionadas nas formulações estão de acordo com o esperado teoricamente, analisou-se os minerais cálcio, magnésio, zinco e selênio e as vitaminas B₆ e ácido fólico apenas no tempo inicial do teste de vida de prateleira. Os resultados dessas análises estão apresentados na Tabela 4.10.

A vitamina B₁₂ não foi determinada devido estar em baixa concentração e dessa forma, não sendo detectada pela metodologia utilizada pelo Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas, o qual analisa essa vitamina em medicamentos e premix em altas concentrações.

TABELA 4.10. Resultados das análises de cálcio, magnésio, zinco, selênio, vitamina B₆ e ácido fólico no tempo inicial do teste de vida de prateleira para as formulações sem saborizante e chocolate.

Nutrientes	Resultados* da amostra	
	sem saborizante	sabor chocolate
Cálcio (mg/100g)	649 ± 3,00	578 ± 9,00
Magnésio (mg/100g)	213 ± 2,00	212 ± 6,00
Zinco (mg/100g)	7,42 ± 0,56	6,71 ± 0,32
Selênio (mg/100g)	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Vitamina B ₆ (mg/100g)	0,92 ± 0,08	0,68 ± 0,06
Ácido fólico (µg/100g)	176,69 ± 11,30	185,06 ± 13,84

* Média e estimativa de desvio padrão.

Em relação aos minerais avaliados, constatou-se que o cálcio e o magnésio apresentaram os resultados mais próximos do esperado teoricamente, em ambas formulações. Para o cálcio a porcentagem de adequação aos valores teóricos foi

de 94,2% para a formulação sem saborizante e 88,2% para a formulação sabor chocolate. Já para o magnésio os percentuais de adequação foram de 88,3 e 92,5%, respectivamente.

Os resultados verificados para o zinco foram um pouco inferiores em termos de adequação ao valor esperado (~75% para ambas formulações), quando comparado com o cálcio e o magnésio.

Resultado não esperado foi verificado para o selênio nas duas formulações, onde teoricamente adicionou-se 0,03mg do mineral/100g do produto, sendo que esse valor foi calculado baseando-se nas especificações do fabricante, nas quais o teor de selênio presente no produto era de apenas 2,15%, bem como, para atender 100% da DRI para indivíduos idosos de ambos os sexos. No entanto, os resultados encontrados são aproximadamente de 0,1mg selênio/100g do produto, aproximadamente quatro vezes o valor estipulado pelo fornecedor. Como os resultados estavam muito fora do esperado, repetiu-se as análises e os mesmos permaneceram altos, indicando que possivelmente ocorreu erro na pesagem desse mineral durante a elaboração de ambas formulações.

É importante destacar que o valor de 0,1mg de selênio não ultrapassa o Limite Superior Tolerável de Ingestão – UL, definido pela *Dietary Reference Intakes* (DRI, 2000), o qual estabelece 0,4mg/dia desse mineral como limite máximo de ingestão para indivíduos de ambos os sexos e com mais de 14 anos de idade. Portanto, não ocasionando nenhum malefício para os indivíduos que realizaram os testes sensoriais, os quais ingeriram no máximo 0,016mg de selênio, o que representa 30% do valor de ingestão recomendada pela DRI para esse mesmo grupo de indivíduos.

Os resultados das vitaminas B₆ (piridoxina) e ácido fólico apresentaram praticamente o mesmo nível de adequação (~78%) do valor esperado para a formulação sem saborizante. Entretanto para a formulação sabor chocolate,

observou-se uma diminuição significativa na adequação da vitamina B₆ (61,3%) e porcentagem maior para o ácido fólico (~85%).

A degradação de vitaminas, a qual leva a perda do valor nutricional dos alimentos, ocorre mediante uma série de mecanismos, tais como hidrólise, ação da luz, calor ou ácido; oxidação direta por oxigênio ou por participação em outras reações de oxi-redução (TEIXEIRA NETO e JARDIM, 1996).

Assim, as vitaminas B₁, C, A e E foram determinadas ao longo do estudo de vida de prateleira do produto (T₀, T₁₅ e T₃₀) por serem mais sensíveis a perdas durante a estocagem.

Como os resultados apresentados na Tabela 4.12 apresentam algumas dificuldades de interpretação, é importante destacar que os tempos de estocagem do produto (T₀; T₁₅ e T₃₀ dias) não representam os tempos reais das análises, pois as mesmas foram realizadas em tempos diferentes para cada uma das vitaminas. No tempo zero de estocagem as análises foram realizadas entre 9 e 30 dias após amostragem; no tempo de 15 dias entre 30 e 38 dias e no tempo final, amostragem aos 30 dias, essas análises foram executadas entre 41 e 49 dias. As amostras recebidas pelo Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada – ITAL foram armazenadas à temperatura ambiente, não as mantendo sob refrigeração para minimizar as reações, o que seria o mais correto, uma vez que as análises não foram realizadas nos tempos exatos das amostragens. Isso pode ter contribuído na obtenção destes resultados, prejudicando uma análise mais correta dos mesmos no decorrer do estudo de vida de prateleira, principalmente em relação ao percentual de perda e as possíveis diferenças entre as duas temperaturas de armazenamento avaliadas (ambiente e 35 °C).

Outra dificuldade encontrada para a execução dessas análises foi a grande variação nos resultados, principalmente para as vitaminas C e A. Sendo que essa

variação foi atribuída, pelos responsáveis pelas análises, a provável falta de homogeneidade do produto.

Apesar dos problemas ocorridos com essas análises, pode-se fazer algumas considerações a respeito de cada vitamina.

TABELA 4.11. Resultados das análises de vitaminas B₁, C, A e E nos tempos: 0, 15 e 30 dias, respectivamente, do estudo de vida de prateleira para as formulações sem saborizante e chocolate, em temperatura ambiente e a 35 °C.

Nutrientes (T₀)	(-) saborizante (T amb.)	(-) saborizante* (T 35 °C)	Chocolate (T amb.)	Chocolate* (T 35 °C)
B ₁ (mg/100g)	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,29 ± 0,03	0,29 ± 0,03
C (mg/100g)	62,90 ± 7,66	62,90 ± 7,66	47,85 ± 23,82	47,85 ± 23,82
A (µg/100g) ^a	411,01 ± 38,13	411,01 ± 38,13	637,46 ± 58,64	637,46 ± 58,64
E (mg/100g) ^b	8,92 ± 0,64	8,92 ± 0,64	27,35 ± 1,73	27,35 ± 1,73

Nutrientes (T₁₅)	(-) saborizante (T amb.)	(-) saborizante* (T 35 °C)	Chocolate (T amb.)	Chocolate* (T 35 °C)
B ₁ (mg/100g)	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,22 ± 0,03
C (mg/100g) ^c	57,41 ± 11,79	66,37 ± 19,33	66,79 ± 26,03	53,93 ± 14,26
A (µg/100g) ^a	902,42 ± 34,19	731,76 ± 79,06	753,96 ± 34,19	879,57 ± 79,06
E (mg/100g) ^b	8,42 ± 0,24	7,36 ± 0,18	24,70 ± 1,20	22,05 ± 0,83

Nutrientes (T₃₀)	(-) saborizante (T amb.)	(-) saborizante* (T 35 °C)	Chocolate (T amb.)	Chocolate* (T 35 °C)
B ₁ (mg/100g)	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01
C (mg/100g)	27,77 ± 11,11	50,45 ± 1,61	17,48 ± 8,90	32,36 ± 6,38
A (µg/100g) ^a	280,35 ± 6,53	463,76 ± 62,40	297,59 ± 40,81	377,33 ± 10,00
E (mg/100g) ^b	6,02 ± 0,56	6,69 ± 0,10	25,05 ± 1,56	25,51 ± 1,90

^aExpressa em µg de retinol. ^bExpressa como α-tocoferol. ^cMédia de 4 repetições, enquanto as demais vitaminas são médias de 3 repetições analíticas.* No tempo zero só foram analisadas as amostras em temperatura ambiente, logo os valores em temperatura de 35 °C são os mesmos, para efeito de comparação com os tempos 15 e 30 dias.

Em relação à tiamina (B₁) observou-se que houve uma diminuição significativa entre o tempo inicial (T₀) e o final (T₃₀) da análise para as duas formulações, no entanto essa queda ocorreu entre o T₀ e T₃₀ para a formulação sem saborizante e entre o T₀ e o T₁₅, mantendo-se o mesmo valor no T₃₀ para a formulação chocolate.

Notou-se, também, que a temperatura de 35 °C influenciou nos valores dessa vitamina no T₃₀ para a formulação sem saborizante e no T₁₅ para a formulação chocolate. Mostrando-se inesperadamente superior nestas condições de temperatura quando comparada com as condições ambientes, sugerindo-se que a 35 °C não aumentaram as perdas de B₁ como era esperado. No entanto, em função das condições de armazenamento das amostras até sua análise, não se pode afirmar com certeza se essa constatação é verdadeira.

Os resultados do ácido ascórbico apresentaram grande variação e devido a isso se pode observar que para algumas amostras seus valores médios estão superiores no T₁₅ quando comparados com o T₀. Como esses dois tempos foram

analisados na mesma data, esses resultados podem ser possíveis. E por esse motivo fica impossível de se estabelecer um percentual de perda para essa vitamina, no entanto pode-se concluir que ela existe e foi significativa quando se observa os resultado no T₃₀ (Tabela 4.11) para as duas formulações.

A análise de vitamina A ficou comprometida devido à própria apresentação física do padrão em grânulos, o que ocasionou prováveis problemas de homogeneidade das amostras.

Constatou-se que a vitamina E apresentou os resultados mais próximos do esperado teoricamente para formulação sabor chocolate, atingindo um percentual de adequação de 82,4%. No entanto, para a formulação sem saborizante a porcentagem de adequação aos valores teóricos foi de apenas 25,5%. Devido a grande diferença entre esses valores e, sendo a adição de chocolate em pó a única diferença entre as duas formulações, resolveu-se determinar a quantidade de vitamina E no chocolate e também no padrão utilizado na elaboração do produto.

O padrão α -tocoferol acetato apresentou quase 100% da sua atividade estando completamente adequado. Através da análise do chocolate em pó, encontrou-se um teor muito baixo de vitamina E expressa como α -tocoferol (2,00 mg/100g do produto), o qual não seria responsável pela grande diferença verificada entre as formulações. Assim, sugere-se que possivelmente tenha ocorrido erro na pesagem durante a elaboração do produto ou de amostragem para a análise.

Apesar dessa diferença na quantidade de vitamina E entre as formulações, verificou-se um comportamento semelhante entre as mesmas no decorrer do estudo de vida de prateleira. Os resultados demonstraram maior perda nas amostras armazenadas à temperatura ambiente em relação às armazenadas a 35 °C para as duas formulações. À temperatura ambiente, as amostras sabor

chocolate apresentaram-se mais estáveis, uma vez que perderam em torno de 8% enquanto as amostras sem saborizante apresentaram perda de vitamina E quatro vezes superior (~32%) ao longo do estudo de vida de prateleira.

Embora os resultados não permitam calcular o percentual de perda real para todas as vitaminas analisadas, pode-se constatar que elas ocorreram, uma vez que a embalagem utilizada não oferece proteção eficiente à luz e ao oxigênio, uma das principais reações que levam a degradação das vitaminas mais sensíveis (A, C e E), conforme PADULA (1996).

Pode se fazer uma estimativa das perdas das várias vitaminas no tempo T_{30} em relação ao tempo T_0 , para as duas formulações nas condições ambiente e 35 °C de estocagem, como exemplifica os cálculos da Tabela 4.12.

TABELA 4.12. Estimativa das perdas vitamínicas no tempo T_{30} em relação ao T_0 , para as formulações sem saborizante e sabor chocolate, em temperatura ambiente e a 35 °C.

Nutrientes	(-) saborizante		Chocolate	
	ΔV (%)		ΔV (%)	
	(T amb.)	(T 35 °C)	(T amb.)	(T 35 °C)
B ₁	- 23,8	- 9,5	- 48,3	- 44,8
C	- 55,8	- 19,8	- 63,4	- 33,6
A	- 31,8	+ 12,8	- 53,3	- 40,8
E	- 32,6	- 24,7	- 8,4	- 6,6

Portanto, para se evitar perdas no valor nutricional do produto, recomenda-se o uso de embalagens com barreira a luz e ao oxigênio. Algumas alternativas de embalagens que oferecem esse tipo de proteção como aquelas contendo alumínio em sua composição (CABRAL e ALVIM, 1981; ALVES, 1997).

3.7 Estimativa da vida de prateleira: sugestões para outros tipos de embalagem

- Estimativa da vida de prateleira pelo ganho de peso do produto embalado

Os produtos acondicionados nas embalagens de polipropileno foram pesados periodicamente durante 32 dias. A partir destes resultados construiu-se o gráfico ganho de peso (g) *versus* tempo (dias) com 11 pontos para as formulações (Figuras 4.12 e 4.13).

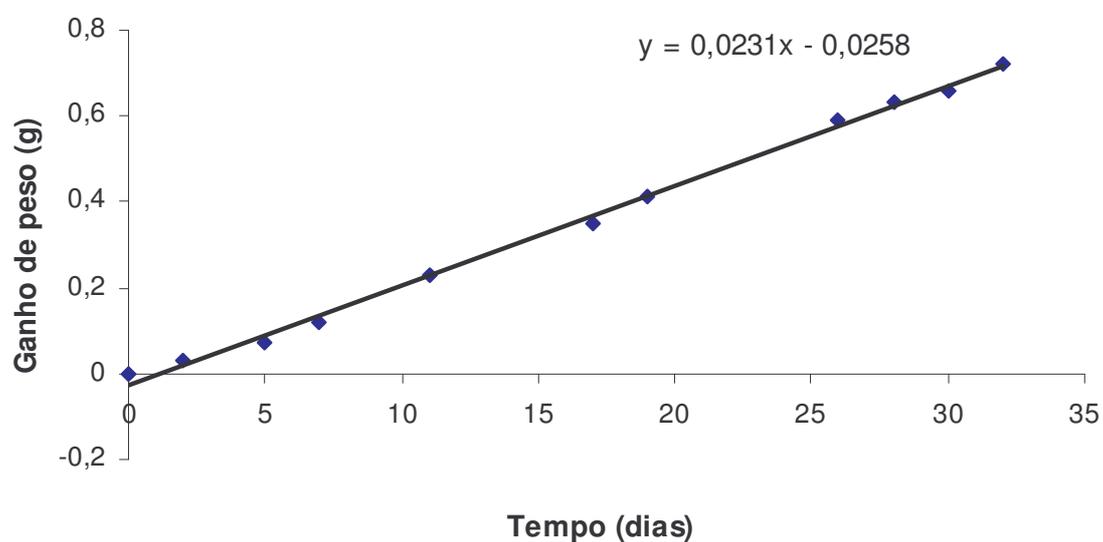


FIGURA 4.12. Valores experimentais de ganho de peso do produto sem saborizante no decorrer do tempo de estocagem, a temperatura ambiente.

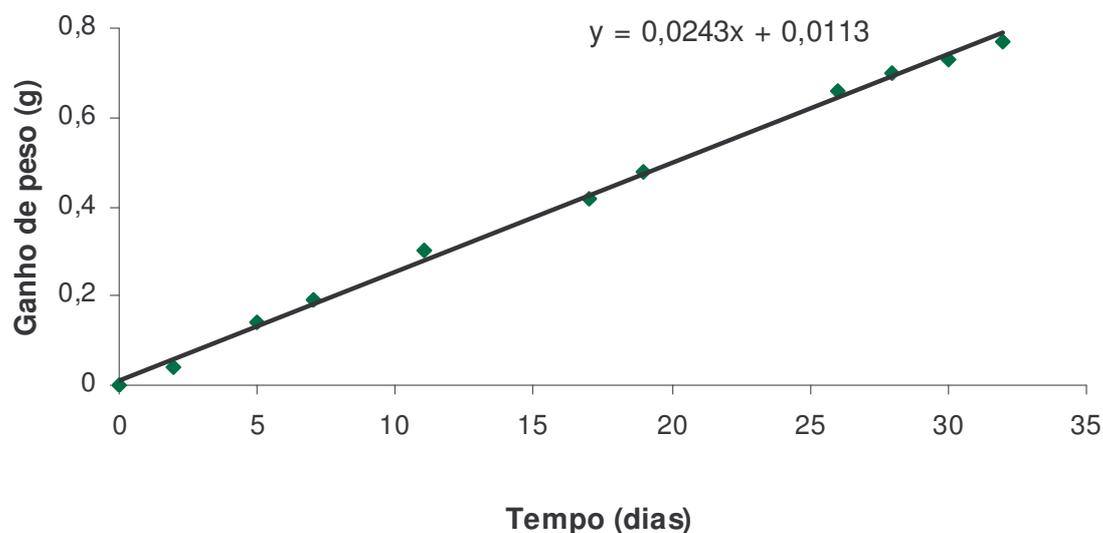


FIGURA 4.13. Valores experimentais de ganho de peso do produto sabor chocolate no decorrer do tempo de estocagem, a temperatura ambiente.

Com base no estudo das isotermas, obtiveram-se os valores de umidade inicial e crítica. Os valores de umidade inicial calculados foram muito próximos entre a formulação sem saborizante (2,1% p/p) e a formulação chocolate (2,2% p/p). Já para a umidade crítica, os valores calculados foram coincidentemente o mesmo (5,1% p/p) para as duas formulações. Assim determinou-se a variação de umidade, ΔU , para as amostras, obtendo-se um valor de 3,0% (3g em 100g de amostra) para a formulação sem saborizante e de 2,9% (2,9 g/100g de amostra) para a formulação chocolate. Com estes valores e através da seguinte equação estimou-se a vida de prateleira da formulação sem saborizante:

$$y = 0,0231x - 0,0258$$

Onde:

y = variação de umidade (ΔU)

x = tempo (dias)

$\Delta U = U_c - U_i$

U_c = umidade crítica

U_i = umidade inicial

Da mesma maneira procedeu-se para a formulação sabor chocolate, apenas utilizando-se a seguinte equação linear (Figura 4.13):

$$y = 0,0243x + 0,0113$$

Deste modo, determinou-se que para a formulação sem saborizante o tempo de vida útil que foi de 131 dias (~ 4,4 meses), enquanto que para a formulação sabor chocolate foi de 119 dias (~ 4 meses). Com estes resultados, demonstrou-se que houve uma pequena variação do tempo de vida de prateleira entre as formulações, com a formulação sabor chocolate apresentando uma menor estabilidade.

Embora a maneira apresentada acima para estimar-se a vida de prateleira seja mais correta, uma vez que se utiliza o ganho de peso do próprio produto, também se determinou à vida útil através do valor obtido da TPVA (Taxa de Permeabilidade ao Vapor de Água) para efeito de comparação dos resultados.

Da mesma forma que demonstrado anteriormente, também utilizou-se os valores da variação de umidade ($\Delta U = U_c - U_i$) obtidos através das isotermas das formulações (Figuras 4.3 e 4.4). Com estes valores (3% para a formulação sem saborizante e 2,9% para a formulação chocolate) e o valor de TPVA expresso em g água/dia, o qual representa o próprio coeficiente angular da equação ilustrada na Figura 4.5, estimou-se a vida de prateleira dos produtos desenvolvidos.

Por este método de estimativa, obteve-se um tempo de vida útil para a formulação sem saborizante de 121 dias (~ 4 meses) e para a formulação sabor chocolate de 117 dias (~ 4 meses). Neste caso a vida de prateleira das duas formulações foi praticamente a mesma, não havendo a variação observada anteriormente.

Portanto, pode-se concluir que vida útil foi de aproximadamente 4 meses para ambas formulações. No entanto, deve-se ressaltar que as amostras foram

estocadas em condições de temperatura e umidade relativa ambientais e colocadas em embalagens de polipropileno, as quais oferecem pouca proteção contra as reações de oxidação, o que conseqüentemente leva a perdas de nutrientes mais sensíveis como verificado no item 3.4.3.

A estabilidade dos produtos estudados dependerá, fundamentalmente da capacidade da embalagem, a ser escolhida, em oferecer proteção contra a permeabilidade ao vapor de água presente no ambiente de armazenamento dos produtos (ALVES, 1997).

No caso de administração do produto a humanos, bem como, sua possível comercialização, recomenda-se o uso de embalagens que apresentem em sua constituição um material de barreira ao vapor de água, oferecendo também proteção contra penetração de luz e oxigênio, pois o produto é rico em vitaminas antioxidantes e outras substâncias sensíveis a oxidação.

Comercialmente, muitos produtos em pó são acondicionados em laminados flexíveis. Algumas alternativas, encontradas no mercado, podem ser propostas para a composição do laminado a ser utilizado de modo a oferecer a barreira necessária para a proteção do produto. A escolha dentre as várias alternativas recairá no binômio custo/benefício, visando uma possível comercialização do produto, ou a administração para idosos através da realização do projeto de mestrado da nutricionista Valéria Maria Caselato de Sousa intitulado “Avaliação dos efeitos nutricionais e funcionais de um produto dietético para idosos desnutridos” sob orientação do Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri.

4. CONCLUSÕES

Verificou-se uma baixa atividade de água inicial ($\sim 0,3$) nas duas formulações, caracterizando os valores geralmente encontrados para produtos desidratados. A atividade de água crítica foi 0,5 para as duas formulações.

Na determinação instrumental de cor realizada nos tempos zero, 15 e 30 dias, verificou-se no final do estudo que as amostras não sofreram alterações significativas na cor, quando comparadas com o padrão inicial. Já na análise de cor em diferentes atividade de água, pode-se perceber mudanças significativas nos valores de luminosidade das formulações, indicando o escurecimento das amostras à medida que se aumentou a atividade de água.

A qualidade sensorial manteve-se satisfatória, durante os 30 dias de teste, pois não se verificou diminuição nos valores de aceitação de nenhum dos atributos no decorrer do tempo de estocagem em temperatura ambiente. Também ficou evidente a positiva intenção de compra para as duas formulações, demonstrando assim, resultados concordantes com os valores das médias do teste de aceitação realizado.

Pelo ganho de peso do produto embalado em filmes de polipropileno, pode-se estimar que a vida de prateleira foi 4 meses para ambas formulações, à temperatura ambiente. Em função das perdas vitamínicas (B_1 , C, A e E) observadas no decorrer do estudo, recomenda-se o uso de embalagens com maior proteção, no caso de uma possível comercialização ou administração a idosos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R.M.V. Especificação de embalagem usando como ferramentas isoterma de sorção e modelo matemático. In: **Curso sobre atividade de água nos alimentos**, ITAL, Campinas, 1997, 7-20 p.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standards test methods for water vapor transmission of materials – ASTM E 96-00, Philadelphia, 2000, 8 p.

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis, W. Horwitz (ed.), 15th edition, Washington, D.C., 1141p., 1990.

ARAKAWA , N.; OTSUKA, M.; KURATA, T.; INAGKI, C. Separative determination of ascorbic acid and erythorbic acid by high-performance liquid chromatography. **Journal Nutritional Science Vitaminology**, Japan, v.27, p. 1-7, 1981.

AZANHA, A.B.; FARIA, J.A.F. Use of mathematical models for estimating the shelf-life of cornflakes in flexible packaging. *Packaging Technology and Science*, Alemanha, v. 18, p. 171-178, 2005.

BELL, L.N.; LABUZA, T.P. Moisture sorption isotherms. In: **Moisture sorption – Practical aspects of isotherm measurement and use**. 2nd ed., AACC Egan Press, 1996, 20 p.

BRUBACHER, G.; MÜLLER-MULOT, W.; SOUTHGATE, D.A.T. **Methods for the determination of vitamins in food – recommended by COST 91**. New York: Elsevier, 1985, 97-106 p.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemistry Society**. Washington, v. 60, n.1, p.309-312, 1938.

CABRAL, A.C.D.; ALVIM, D.D. Alimentos desidratados: conceitos básicos para a sua embalagem e conservação. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)**, Campinas, v.18, n.1, p.1-65, 1981.

CRANK, J. **The mathematics of diffusion**, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, England, 1975.

FERREIRA, V.L.P. **Colorimetria em alimentos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas, 1991, 43p.

FONTANA, A.J. Water activity: why is it important for food safety. In: **Proceedings of the First NSF International Conference of Food Safety**, Albuquerque, NM, November, 1998, 177-185 p.

FU, B.; LABUZA, T.P. **Shelf Life Testing: Procedures and Prediction Methods for Frozen Foods**. Department of Food Science and Nutrition, University of Minnesota, Mn. USA., 1998, 1-46 p.

FUJITA, J. Diffusion in polymer-diluent's systems, **Fortsch-Hochpolym-Forsch**, Japan, v. 3, n.1, p.1-47, 1961.

GARCIA, E.E.C.; PADULA, M.; SARANTOPOULOS, C.I.G.L. **Embalagens plásticas – propriedades de barreira**. CETEA/ITAL, Campinas, 1989, 44p.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 10 ed., São Paulo: Nobel, 1982, 430p.

GREENSPAN, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. **Journal of Research of the National Bureau of Standards - Physics and Chemistry**, USA, v.81 (A), n.1, p.89-96, 1977.

GREGORY, J.F.; KIRK, J.R. Assessment of storage effects on vitamin B6 stability and bioavailability in dehydrated food systems. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, p.1801-09, 1978.

HERNANDEZ, R.J. Shelf life modeling of moisture sensitive products. In: **School of Packaging**, Michigan State University, 2002, 38p.

HORWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2000, v.2, chapter 50, methods 961-15, p.55-57.

HOWARTH, J.A.K. Ready-to-eat breakfast cereals. In: **Shelf Life Evaluation of Foods**. 2^a ed., MAN, C.D.M.; JONES, A.A. Glasgow:Blackie Academic, Aspen, chapter 12, 1996, 235-255p.

HUNTER, R.S. Scales for the measurement of colour difference. In: **The Measurements of Appearance**. John Wiley, New York, 1975, 133-140 p.

KIMURA, I.A.; MAEDA, M. Determinação de isotermas de adsorção de umidade: influência da concentração da solução e da variação no volume do recipiente. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.27, n.2, p. 79-87, 1993.

LABUZA, T.P. **Shelf-life dating of foods**. Food and Nutrition Press, Westport, 1982, 500p.

_____. Standard procedure for isotherm determination. **Cereal Foods World**. Minneapolis, v.28, n.4, p.258, 1983.

LIMA, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. HPLC methodology for folic acid determination in enriched wheat flour and bread. **Tecnica Molitoria International**, Piner Olo, v.55, n.3/A, p.151-158, 2004.

MANZ, U.; PHILIPP, K. Determination of vitamin A in complete feeds and premixes and vitamin concentrates with HPLC. In: **Analytical methods for vitamins and carotenoids in food**, Switzerland: Roche, 1988.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V. **Sensory Evaluation Techniques**, CRC Press, Inc. Boca Raton. 1999, 281p.

OLSON, O.E.; PALMER, I.S.; CARY, E. Modification of the official fluorimetric method for selenium in plants. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, DC, v.58, n.1, p.117-121, 1975.

PADULA, M. Influência da embalagem na vida de prateleira de alimentos. In: **Reações de transformações e vida de prateleira de alimentos processados – Manual técnico n° 6**, Campinas, cap. 4, 1996, 4-1/ 4-17p.

QUAST, D.G.; GIL, L.R.P. Considerações sobre a embalagem do café solúvel brasileiro para exportação. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.5, p.377-397, 1973/74.

SAS Institute. **SAS User's Guide: statistics**, v.8.2. Cary, USA: SAS Inst., 1993.

SINGH, R.P. Scientific principles of shelf-life evaluation. In: **Shelf-life Evaluation of Foods**. Ed. MAN, C.M.D.; JONES, A.A. Ed. Blackie Academic & Professional, London, 1996, 3-36p.

SLAVIN, S.; PETERSEN, G.E.; LINDHAL, P.C. Determination of heavy metals in meats by atomic absorption spectroscopy. **Atomic Absorption Newsletter**, Norwalk, v.14, n.3, p.57-59, 1975.

SPEIGEL, A.; BROWN, W.E. Shelf life testing. In: **Flexible Packaging Technology**. The Center Professional Advancement, Brunswick, NJ, 1990.

STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. Academic Press: New York, 1993, 338p.

TEIXEIRA NETO, R.O.; QUAST, D.G. Isotermas de adsorção de umidade em alimentos. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)**, Campinas, v. 8, n. 1, p.141-197, 1977.

_____; JARDIM, D.C.P. Reações de transformações em alimentos. In: **Reações de transformações e vida de prateleira de alimentos processados – Manual técnico n° 6**, Campinas, cap. 1, 1996, 1-1/1-18 p.

_____. Atividade de água e transformações dos alimentos. In: **Curso sobre atividade de água nos alimentos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, cap. 2, 1997, 2-1/2-9 p.

VAN DE WEERDHOFF, T.; WIERSUN, M.L.; REISSENWEBER, H. Application of liquid chromatography in food analysis. **Journal Chromatography**, Amsterdam, v.83, p.455-60, 1973.

VITALI, A.A.; QUAST, D.G. Vida de prateleira de alimentos. In: **Reações de transformações e vida de prateleira de alimentos processados – Manual técnico n° 6**, Campinas, cap.3, 1996, 3-1/3-10 p.

Anexos

Nome: _____

Data: _____

Nº da Amostra: _____

Por favor, observe, aspire, prove e avalie a amostra de bebida láctea e assinale na escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou:

- Gostei muitíssimo
- Gostei muito
- Gostei moderadamente
- Gostei ligeiramente
- Nem gostei nem desgostei
- Desgostei ligeiramente
- Desgostei moderadamente
- Desgostei muito
- Desgostei muitíssimo

Comentários: _____

Avalie a **DOÇURA** da amostra de bebida láctea e indique, utilizando a escala abaixo, o quão próximo do ideal encontra-se a doçura da amostra.

- Extremamente menos doce que o ideal
- Muito menos doce que o ideal
- Moderadamente menos doce que o ideal
- Ligeiramente menos doce que o ideal
- Ideal
- Ligeiramente mais doce que o ideal
- Moderadamente mais doce que o ideal
- Muito mais doce que o ideal
- Extremamente mais doce que o ideal

Se esta amostra estivesse à venda, qual seria sua atitude?

- Certamente não compraria
- Provavelmente não compraria
- Tenho dúvida se compraria ou não
- Provavelmente compraria
- Certamente compraria

Anexo 2

Nome: _____

Data: _____

Nº da Amostra: _____

Por favor, observe, aspire, prove e avalie a amostra de bebida láctea e utilize a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou:

9. Gostei muitíssimo
8. Gostei muito
7. Gostei moderadamente
6. Gostei ligeiramente
5. Nem gostei nem desgostei
4. Desgostei ligeiramente
3. Desgostei moderadamente
2. Desgostei muito
1. Desgostei muitíssimo

Em relação ao AROMA: _____

Em relação ao SABOR: _____

Em relação a APARÊNCIA: _____

Em relação a IMPRESSÃO GLOBAL: _____

Comentários: _____

Se esta amostra estivesse à venda, qual seria sua atitude?

- Certamente não compraria
- Provavelmente não compraria
- Tenho dúvida se compraria ou não
- Provavelmente compraria
- Certamente compraria

Anexo 3

Avaliação nutricional do isolado protéico do soro de leite bovino (WPI), de hidrolisados de gelatina suína e bovina e de suas misturas em diferentes proporções no crescimento de ratos wistar

Resumo expandido apresentado no:

XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, realizado de 07 a 10 de setembro de 2004. Recife - PE.

Avaliação nutricional do isolado protéico do soro de leite bovino (WPI), de hidrolisados de gelatina suína e bovina e de suas misturas em diferentes proporções no crescimento de ratos wistar

Fabiane La Flor ZIEGLER¹, Maria Susana Corrêa da CUNHA², Valdemiro Carlos SGARBIERI³

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar nutricionalmente a influência de diferentes fontes protéicas no crescimento e desenvolvimento de ratos Wistar. Foram determinados a digestibilidade verdadeira (Dv), o quociente de eficiência líquida da proteína (NPR), o escore de aminoácidos essenciais (EAE) e PDCAAS (*Protein Digestibility Corrected Amino Acid Scoring*). Em relação ao ganho de peso, os animais do grupo 8 (WPI 80%:HGB 20%) foram os únicos que não diferiram do padrão caseína, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, apresentando, também, para os demais parâmetros os melhores resultados.

Abstract

The objective of the present study was to determine the nutritive value of a whey protein isolate (WPI) a bovine gelatine hydrolysate and mixtures of the two sources, using male Wistar rats. The following parameters were determined: true digestibility (Dv), net protein ratio (NPR), essential amino acid score (EAE) and Protein digestibility corrected amino acid scoring (PDCAAS). The group on diet 8 (WPI 80%: HGB 20%) did not differ from casein standard ($p > 0.05$) being also superior in most of the other parameters.

¹ Mestranda em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA, UNICAMP.

² Técnica do Laboratório de Ensaio Biológicos do Departamento de Alimentos e Nutrição, UNICAMP.

³ Prof. Dr do Departamento de Alimentos e Nutrição da FEA, UNICAMP. E-mail: sgarb@fea.unicamp.br

1. Introdução

Estudos demonstram que o isolado de proteína do soro de leite (WPI), apresenta boas propriedades funcionais, tecnológicas e nutricionais, elevado conteúdo de aminoácidos essenciais, fácil digestibilidade, boa solubilidade, capacidade emulsificante, geleificante e de retenção de água (HUFFMAN, 1996).

A gelatina contém 18 aminoácidos destacando-se a glicina, alanina, prolina e hidroxiprolina, porém o aminoácido essencial triptofano está ausente na gelatina, segundo DJAGNY *et al.* (2001).

A associação de gelatina com proteínas do soro de leite possibilita uma melhora significativa no equilíbrio de aminoácidos essenciais com considerável vantagem nutricional.

2. Material e Métodos

2.1. Material - Foram utilizados WPI, hidrolisado de gelatina suína (HGS) e bovina (HGB), sendo que os dois últimos foram fornecidos pela empresa GELITA SOUTH AMERICA, Cotia, SP.

2.2 Métodos

2.2.1 Caracterização das amostras - A caracterização química do WPI e dos hidrolisados de gelatina foi feita através da composição centesimal (AOAC, 1990), do perfil de aminoácidos essenciais e Escore de Aminoácidos Essenciais (EAE). O EAE foi determinado, segundo HENLEY & KUSTER (1994).

2.2.2 Avaliação Nutricional - No ensaio com animais foram determinadas Dv, NPR, conforme SGARBIERI (1987). Com Dv e o EAE foi calculado o PDCCAS. Utilizou-se para a formulação das dietas experimentais as recomendações do American Institute of Nutrition (REEVES *et al.*, 1993).

O ensaio com ratos Wistar machos teve a duração de 21 dias, sendo utilizados 9 grupos com 6 animais, cada grupo recebeu dieta contendo 12% de

proteína fornecida pelas diferentes fontes (caseína, WPI, HGS, HGB, misturas em proporções variadas de WPI e HGB e um grupo em dieta aprotéica).

2.2.3 Análise Estatística - Análise de variância (ANOVA) e Tukey ($p < 0,05$) para diferenças entre médias (GOMES, 1982).

3. Resultados e Discussão

Os isolados protéicos continham 86,2% (N x 6,38), HGS e HGB 92,2% e 91,0% (N x 5,55) de proteína, sendo que os constituintes restantes foram determinados e considerados na formulação das dietas.

Na Tabela 1 encontram-se os valores dos perfis de aminoácidos essenciais (g/ 100g de proteína).

Conforme se pode observar (Tabela 1), conseguiu-se satisfazer a recomendação da FAO/WHO para triptofano utilizando-se as misturas dos grupos 7 e 8. sendo que os dois últimos grupos apresentaram EAE próximos do ideal.

Tabela 1. Perfis de aminoácidos essenciais e escore de aminoácidos essenciais (EAE)

AA essenciais (g/100g prot)	FAO/WHO*	WPI	HGB	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
Treonina	3,4	6,9	2,4	3,3	4,2	5,1	6,0
Met. + Cisteína	2,5	4,9	0,6	1,5	2,3	3,2	4,0
Valina	3,5	5,4	2,8	3,3	3,8	4,4	4,9
Leucina	6,6	10,6	3,5	4,9	6,3	7,7	9,1
Isoleucina	2,8	5,7	1,6	2,4	3,2	4,0	4,9
Fenil. + Tirosina	6,3	6,6	2,7	3,5	4,2*	5,0*	5,8*
Lisina	5,8	10,0	4,4	5,5	6,6	7,7	8,7
Histidina	1,9	5,5	0,7	1,7	2,6	3,6	4,6
Triptofano	1,1	2,1	0,0	0,4*	0,8	1,2	1,6
EAE	1,0	>1,0	0,0	0,4	0,7	0,8	0,9

* Aminoácido mais limitante. 5=WPI 20%: HGB 80%; 6=WPI 40%: HGB 60%; 7 =WPI 60%: HGB 40%; 8=WPI 80%: HGB 20%.

Tabela 2. Parâmetros nutricionais de dietas com diferentes fontes protéicas

Fontes protéicas*	NPR (%) ¹	Dv (%) ²	PDCAAS ³
AIN-93 (CASEÍNA)	2,99±0,14 ^a	90,54±4,11 ^b	90,54
WPI	2,93±0,12 ^a	92,07±1,47 ^b	92,07
HGS	0,65±0,32 ^c	95,50±1,55 ^a	0,0
HGB	0,57±0,63 ^c	98,45±2,85 ^a	0,0
WPI 20%:HGB 80%	2,14±0,12 ^b	92,69±1,65 ^b	37,08
WPI 40%:HGB 60%	2,81±0,13 ^a	93,42±2,84 ^b	65,39
WPI 60%:HGB 40%	3,32±0,17 ^a	96,23±2,25 ^a	76,98
WPI 80%:HGB 20%	3,17±0,13 ^a	93,18±2,36 ^b	83,86

*Dietas tendo AIN-93 como base e 12% das várias fontes de proteína (6 animais/tratamento). ¹

NPR= ganho de peso (g) + perda de peso (g) do grupo aprotéico/ proteína ingerida (g). ² Dv= nitrogênio ingerido – nitrogênio excretado nas fezes (corrigido para o grupo aprotéico)/ nitrogênio ingerido x 100. ³ PDCAAS (%)= Dv (%) x EAE.

Resultados são médias de 6 animais por tratamento ± desvios padrão das médias. Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O NPR (Tabela 3) não diferiu do padrão de caseína ($p > 0,05$) para o WPI e os grupos 6, 7 e 8 (Tabela 1). Os valores mais baixos ($p < 0,05$) foram das dietas com HGS e HGB. Maior digestibilidade ($p < 0,05$) foi das proteínas HGS, HGB e WPI 60% + HGB 40%. A digestibilidade variou entre 90,5% e 98,5%. Já os valores de PDCAAS foram inferiores ao padrão para todas as misturas protéicas utilizadas devido ao baixo EAE apresentado pelos mesmos (Tabela 1).

Os ganhos de peso acumulado dos grupos de animais são ilustrados na Figura 1. A dieta de caseína promoveu o maior ganho de peso, seguido das misturas 80% WPI: 20% HGB, 60% WPI: 40% HGB e WPI 100%. As misturas com 60% e 80% HGB se apresentam como inferiores.

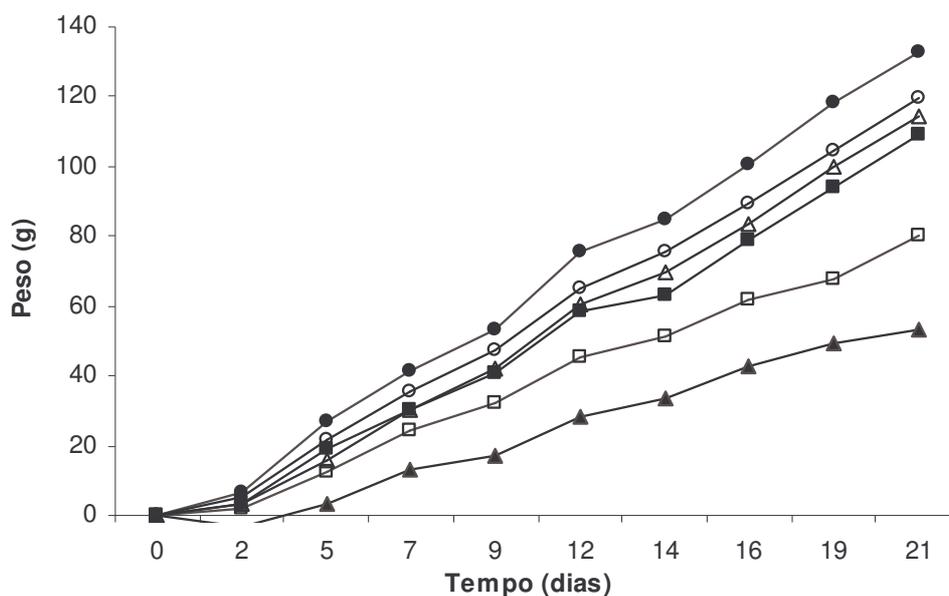


Figura 1. Curva de crescimento de ratos alimentados por 21 dias com dietas contendo 12% de proteína proveniente de caseína (●); WPI (■); WPI 20%:HGB 80% (▲); WPI 40%:HGB 60% (□); WPI 60%:HGB 40% (Δ); WPI 80%:HGB 20% (○).

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo mostram que a utilização de misturas de WPI e hidrolisado de gelatina bovina (HGB) foram satisfatórios em relação aos parâmetros avaliados para promover o crescimento dos animais nas proporções de WPI 60%:HGB 40% (grupo 7) e WPI 80%:HGB 20% (grupo 8) quando comparados com o padrão caseína e, inclusive, sendo superiores ao grupo que utilizou-se apenas WPI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DJAGNY,.; WANG, Z. e XU, S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton , v. 41, n. 6, p. 481-492, 2001.

GOMES, F.P. **Curso de Estatística Experimental**. 10 ed., São Paulo: Nobel, 1982, 430p.

HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility corrected amino acid scoring. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 4, p. 74-77, 1994.

HUFFMAN, L.M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 49-52, 1996.

REEVES, P.G.P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.N. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the formulation of the AIN-76 rodent diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.11, p.467-472, 1993.

SGARBIERI, V.C. **Alimentação e Nutrição – Fator de saúde e desenvolvimento**. São Paulo: Almed, 387 p., 1987.

SLOAN, A.E. The top 10 functional food trends: the next generation. **Food Technology**, Chicago, v. 56, n. 4, p. 32-57, 2002.

Anexo 4

Avaliação da influência do pH, força iônica e da concentração de proteínas na solubilidade do isolado protéico do soro de leite (WPI), do hidrolisado de gelatina (HG) e da mistura WPI60%:HG40%

Resumo apresentado no:

6° Simpósio Latino Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, realizado de 07 a 10 de novembro de 2005, Campinas - SP.

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO pH, FORÇA IÔNICA E DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NA SOLUBILIDADE DO ISOLADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE (WPI), DO HIDROLISADO DE GELATINA (HG) E DA MISTURA WPI60%:HG40%. ZIEGLER, F.L. (1); SGARBIERI, V.C. (1). (1) Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, P.O. Box 6121, 13083-970, Campinas, SP, Brasil. E-mail: laflor@fea.unicamp.br

As propriedades funcionais tecnológicas das proteínas são classificadas de acordo com suas características físico-químicas como propriedades hidrofílicas, interativas, tensoativas e organolépticas. A solubilidade é importante na medida em que as demais propriedades dependem desta característica. A solubilidade das proteínas é influenciada pelo pH, força iônica, distribuição de cargas, concentração de proteínas, temperatura e natureza do solvente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do pH, força iônica e da concentração de proteínas na solubilidade do WPI, HG e da mistura WPI60%:HG40%. Foram utilizados WPI da empresa New Zealand Milk Products, São Paulo e hidrolisado de gelatina da empresa GELITA SOUTH AMERICA, Cotia. A composição centesimal das fontes protéicas foi determinada de acordo com AOAC (1990) e a solubilidade pela metodologia proposta por MORR et al. (1985), com variação no pH (2; 4; 6 e 8) e na concentração de NaCl (0,0M; 0,05M; 0,1M; 0,15M; 0,2M) para WPI e HG. Para a mistura foi analisada a influência da concentração de proteínas na solubilidade em água. Os resultados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. A solubilidade do WPI aumentou com a concentração do sal até 0,15M, apresentando os maiores valores em pH 8 para NaCl 0,05M e 0,1M ($99,3 \pm 0,1$ e $99,7 \pm 0,9$ respectivamente). Já para o HG a maior solubilidade deu-se em NaCl 0,15M, em todos os valores de pH testados. Obteve-se elevada solubilidade da mistura WPI60%:HG40% a 2,5; 5 e 10% de concentração, que não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Palavras-chaves: solubilidade, isolado protéico do soro de leite, hidrolisado de gelatina, funcionalidade de proteínas.

Anexo 5

Determinação da influência do pH e da força iônica na solubilidade de misturas de proteínas em diferentes proporções de isolado protéico do soro de leite (WPI) e de hidrolisado de gelatina (HG).

Resumo apresentado no:

6° Simpósio Latino Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, realizado de 07 a 10 de novembro de 2005, Campinas - SP.

DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO pH E DA FORÇA IÔNICA NA SOLUBILIDADE DE MISTURAS DE PROTEÍNAS EM DIFERENTES PROPORÇÕES DE ISOLADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE (WPI) E DE HIDROLISADO DE GELATINA (HG). ZIEGLER, F.L. (1); SANTOS, E.F. (1); SILVA, L.B.C. (1); ABECIA-SORIA, M.I. (1); SGARBIERI, V.C. (1); MIYASAKA, C.K. (1). (1) Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, P.O. Box 6121, 13083-970, Campinas, SP, Brasil. E-mail: laflor@fea.unicamp.br

A solubilidade é considerada uma propriedade física e funcional muito importante na formulação de alimentos, além de influenciar as demais propriedades funcionais das proteínas. O balanço entre forças intermoleculares atrativas e repulsivas entre proteínas, e entre proteína-solvente determina a solubilidade, que também é afetada por variações no pH, força iônica, distribuição de cargas, temperatura, concentração de proteínas e natureza do solvente. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do pH e da força iônica na solubilidade de misturas de isolado protéico do soro de leite (WPI) e de hidrolisado de gelatina (HG) em diferentes proporções. Foram preparadas três misturas de WPI da empresa New Zealand Milk Products, São Paulo e hidrolisado de gelatina da empresa GELITA SOUTH AMERICA, Cotia: 1) WPI 60% + GH 40%; 2) WPI 50% + GH 50% e 3) WPI 40% + GH 60%. A composição centesimal das misturas foi determinada de acordo com AOAC (1990) e a solubilidade pela metodologia proposta por MORR et al. (1985), com variação no pH (2,5; 4,5 e 6,5) e na concentração de CaCl_2 (0,0M; 0,1M; 0,5M). Os resultados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Observou-se na mistura 1 que a maior solubilidade deu-se em CaCl_2 0,5M em pH 6,5 diferindo estatisticamente dos demais valores de pH e concentração iônica. A mistura 2 apresentou melhores resultados em água no pH 6,5 e em CaCl_2 0,5M em pH 4,5, os quais não diferiram estatisticamente. Já para a mistura 3 obteve-se elevada solubilidade em CaCl_2 0,5M em pH 4,5, bem como, em água no pH 6,5. Pôde-se notar que todas as misturas apresentaram excelente solubilidade (> 90%) em todas as concentrações de sais e pH testados.

Palavras-chave: solubilidade, isolado protéico do soro de leite, hidrolisado de gelatina, funcionalidade de proteínas.

Anexo 6

Caracterização química-nutricional de um isolado protéico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos

Artigo que será submetido para:

Revista de Nutrição – Brazilian Journal of Nutrition, Campinas - SP.

Caracterização química-nutricional de um isolado protéico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos

Chemical-nutritional characterization of a whey protein isolate, a bovine collagen hydrolysate and mixtures of the two products

Fabiane La Flor ZIEGLER¹

Valdemiro Carlos SGARBIERI¹

RESUMO

Objetivo

Estudar química e nutricionalmente um isolado protéico de soro de leite bovino, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos visando elevado valor nutritivo e funcional.

Métodos

Realizaram-se análises da composição centesimal e do perfil de aminoácidos dos dois materiais protéicos, para cálculo, da melhor adequação dos aminoácidos essenciais com base no perfil recomendado pela FAO/WHO. Os índices de valor nutritivo para o isolado de soro de leite, hidrolisado de colágeno e misturas, foram determinados em ratos através de ensaios de crescimento e de balanço de nitrogênio.

¹ Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas. Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: V.C. SGARBIERI. E-mail: <sgarb@fea.unicamp.br>

Resultados

O isolado protéico de soro de leite mostrou-se completo quanto aos aminoácidos essenciais pelo padrão de referência da FAO/WHO enquanto que o hidrolisado de colágeno bovino mostrou-se deficiente em todos os aminoácidos essenciais com agravante de completa ausência de triptofano. A caseína mostrou-se mais eficaz que o isolado de soro e misturas quanto ao poder de promover crescimento em ratos. Não houve diferença estatística no crescimento entre o isolado protéico de soro e a mistura 60% isolado de soro e 40% hidrolisado de colágeno. Nos demais índices de valor protéico a mistura 60% isolado de soro: 40% hidrolisado de colágeno mostrou-se igual ou superior à caseína e ao isolado (100%).

Conclusão

A mistura 60% isolado de soro mais 40% hidrolisado de colágeno bovino apresentou elevado valor nutritivo e alto índice de solubilidade em água, mostrando-se promissora como ingrediente na formulação de alimentos dietéticos para idosos, inclusive pelas propriedades funcionais já descritas para essas proteínas.

ABSTRACT

Objective

The objective was the chemical and nutritional study of a bovine whey protein isolate, a bovine collagen hydrolysate and mixture of the two products aiming at high nutritional and functional value.

Methods

Centesimal and amino acid analysis were performed on both proteinaceous materials for the calculation of an adequate amino acid profile based on the FAO/WHO recommendation. The nutritive value indexes for the whey protein isolate, the collagen hydrolysate and mixtures of both proteins were determined in rats through growth assay and nitrogen balance.

Results

The whey protein isolate met all the requirements of the FAO/WHO reference for essential amino acids while the collagen hydrolysate showed deficiency in all essential amino acids and complete absence of tryptophan. The casein showed higher efficiency than the whey isolate and mixtures of both proteins in promoting growth in the rat. There was no statistical difference in growth between the whey protein isolate and the mixture of 60% whey protein isolate and 40% collagen hydrolysate. In all other indexes of protein nutritive value the mixture 60% whey protein isolate and 40% collagen hydrolysate revealed itself equal or superior to casein and the 100% whey isolate.

Conclusion

The protein mixture 60% whey protein isolate and 40% collagen hydrolysate showed high nutritive value and water solubility indexes, revealing favorable properties as an ingredient for the formulation of dietetic products for elderly people.

INTRODUÇÃO

O aumento da preocupação do consumidor com a alimentação e a saúde tem sido uma constante. O consumidor tem mostrado preferência cada vez maior por alimentos que possam trazer algum benefício adicional à sua saúde em relação aos produtos

tradicionalmente comercializados. Por esta razão um grande número de alimentos transformados com características funcionais têm sido desenvolvidos pela indústria de alimentos¹. Segundo Katz², a União Européia desenvolveu, em 1996, um número considerável de novos produtos panificados, 914 novas bebidas e 338 novos sorvetes e sobremesas.

O mercado mundial de alimentos funcionais foi estimado, em 2001, em US\$ 47,6 bilhões comparado com aproximadamente US\$ 30 bilhões em 1995³.

Uma pesquisa recente revelou que 86% das pessoas escolhem seus alimentos porque eles contêm ingredientes nutricionais desejáveis, 80% porque eles não contêm ingredientes indesejáveis e 76% escolhem alimentos fortificados com substâncias nutricionais específicas⁴.

Avanços recentes nas pesquisas nutricionais e biomédicas têm revelado relações complexas entre nutrição e doença, sugerindo que algumas proteínas alimentícias e seus peptídios poderão ser úteis na prevenção e/ou diminuição de riscos de um grande número de condições patológicas derivadas da má nutrição, doenças ou injúrias de diversas naturezas^{5,6,7}.

Nesta pesquisa o objetivo foi estudar a composição aminoacídica de um isolado protéico de soro de leite bovino, de um hidrolisado de colágeno bovino e de misturas dessas proteínas, com o propósito de se estabelecer uma proporção adequada entre as duas fontes protéicas, que deverá fazer parte da composição de um produto formulado para atender as deficiências nutricionais e fisiológicas de idosos desnutridos.

Material de estudo

O isolado protéico do soro de leite bovino (WPI), ALACEN 895, foi adquirido da empresa New Zealand Milk Products (NZMP), São Paulo. O hidrolisado de colágeno bovino (HCB) foi gentilmente fornecido pela empresa Gelita South América, Cotia, São Paulo, sendo um dos produtos de sua linha de produção industrial.

Caracterização química e física dos isolados protéicos

Umidade, sólidos totais, cinzas e proteína (%N x F) foram determinados nas duas amostras pelos procedimentos descritos no AOAC (1990)⁸. Para proteína empregou-se o método de Kjeldahl (semi-micro) usando-se como fator de conversão F (6,38 e 5,55) para o WPI e HCB, respectivamente. Os lipídios totais foram determinados pelo método de Bligh e Dyer⁹, e os carboidratos por diferença entre 100% e a soma dos demais componentes.

O perfil de aminoácidos das duas fontes protéicas foi determinado, após hidrólise ácida (110 °C, 22 h, HCl 6N), em um analisador Dionex Dx – 300, dotado de coluna de troca catiônica e reação pós-coluna com ninidrina¹⁰. Para a quantificação utilizou-se uma mistura padrão de aminoácidos da Pierce (EUA).

O grau de hidrólise (GH) do hidrolisado de colágeno bovino foi estabelecido pela reação colorimétrica dos aminoácidos com o ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS)¹¹, usando-se curva padrão construída com o aminoácido leucina.

O perfil de solubilidade, em água a 25 °C, da mistura protéica 60% WPI: 40% HCB foi determinado na faixa de concentração (p/v) de 1,25 a 20%, pelo método de Morr et al. (1985)¹².

Avaliação nutricional: ensaios com ratos

Os dois componentes protéicos, WPI e HCB e combinações dos dois componentes em diferentes proporções foram avaliados nutricionalmente, através de dois ensaios com ratos: o primeiro ensaio teve a duração de 21 dias no qual foram determinadas curvas de crescimento, consumo de dieta, consumo de proteína, quociente de eficiência protéica (PER) e quociente líquido de eficiência protéica (NPR)¹³; no segundo ensaio com duração de 10 dias foram determinados o nitrogênio ingerido com a dieta (NI), nitrogênio excretado nas fezes (NF), a digestibilidade protéica verdadeira (Dv) e calcularam-se os escores de aminoácidos essenciais corrigidos pelas digestibilidades verdadeiras (PDCAAS)¹³.

Uma ilustração do protocolo geral dos dois ensaios é mostrada na Figura 1 (A,B).

Os ratos utilizados foram da linhagem Wistar, recém desmamados, provenientes do (CEMIB) – Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas da Universidade Estadual de Campinas. Após chegada ao laboratório de ensaio, permaneceram por 3 a 4 dias em ração comercial e água “ad libitum” para adaptação às condições do laboratório (20 ± 2 °C, umidade do ar de $75 \pm 3\%$ e períodos alternados de claro-escuro de 12 h). Findo o período de adaptação os ratos foram pesados e descartados os que estavam muito abaixo ou acima do peso médio do grupo. Os demais animais, 6 por tratamento no primeiro ensaio e 8 por tratamento no segundo ensaio, foram distribuídos em grupos, por sorteio.

As médias dos pesos iniciais dos ratos que compuseram os grupos do primeiro ensaio variaram entre $72,3 \pm 11,3\text{g}$ a $96,3 \pm 8,6\text{g}$, enquanto que nos grupos do segundo ensaio os pesos médios dos ratos variaram de $78,4 \pm 4,6\text{g}$ a $81,2 \pm 7,2\text{g}$.

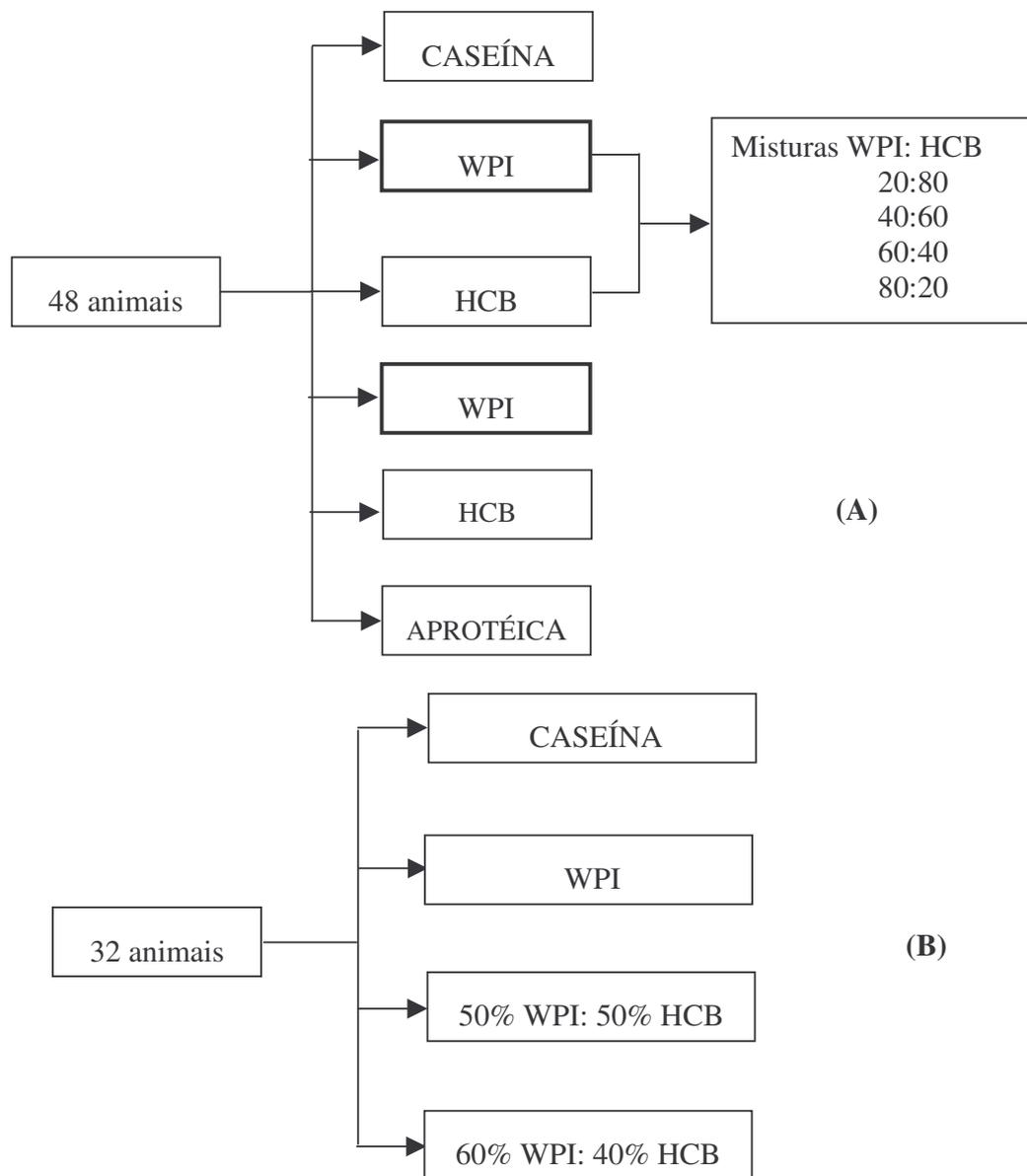


Figura 1 Protocolo experimental: (A) do primeiro ensaio biológico com ratos Wistar durante o período de 21 dias; (B) do segundo ensaio biológico com ratos Wistar durante o período de 10 dias.

As dietas experimentais foram preparadas com base nas recomendações do “American Institute of Nutrition” (AIN – 93)¹⁴, sendo que o componente protéico foi

reduzido de 17 para 12%, mantendo as dietas isocalóricas pela adição de mais 5% de carboidrato. Durante todo o período experimental os ratos tiveram livre acesso às dietas e à água.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal dos dois componentes protéicos, WPI e HCB é apresentada na Tabela 1. Os dois preparados se caracterizam como isolados protéicos por conter acima de 90% de proteína. Os teores de lipídios totais e carboidrato são muito baixos nos dois isolados, o de cinzas (1,6%) é mais elevado no WPI e a umidade (~7%) é mais elevada no HCB. Segundo “US Dairy Expert Council¹⁵” o WPI apresenta em média, por 100g do produto: cálcio 600mg, potássio 300mg, sódio 250mg, fósforo 210mg, e ferro 9mg.

Tabela 1. Composição centesimal do isolado protéico do soro de leite bovino (WPI) e do hidrolisado de colágeno bovino (HCB).

<i>Componentes</i> (%)	<i>WPI</i>	<i>HCB</i>
<i>Proteína bruta (N x F)¹</i>	92,36 ± 0,42 ^a	91,00 ± 0,29 ^a
<i>Lipídios totais</i>	0,70 ± 0,12	ND
<i>Cinzas</i>	1,58 ± 0,04 ^a	0,39 ± 0,09 ^b
<i>Umidade</i>	5,09 ± 0,13 ^b	6,98 ± 0,10 ^a
<i>Carboidrato²</i>	0,27	ND

¹F: WPI = 6,38; HCB = 5,55. ² Calculado por diferença = 100 – (proteína + lipídios totais + cinzas + umidade). ND = Não Determinado. Resultados são média de 3 determinações analíticas. Médias seguidas por letras iguais (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 2 são apresentados os perfis de aminoácidos (g/100g de proteína) para os dois produtos, WPI e HCB. Os perfis de aminoácidos ácidos essenciais para os dois isolados e respectivas misturas são comparados na Tabela 3, juntamente com seus respectivos escores de aminoácidos essenciais (EAE)¹⁶.

Tabela 2. Valores obtidos para os aminoácidos totais (g por 100g de proteína) do isolado protéico do soro de leite bovino (WPI) e hidrolisado de colágeno bovino (HCB).

Aminoácidos (g/100g de proteína)	WPI	HCB
Ac. Aspártico	11,46	8,43
Treonina	4,72	2,28
Serina	3,76	3,71
Ac. Glutâmico	17,62	11,32
Prolina	4,11	13,33
Glicina	1,62	24,52
Alanina	5,26	9,65
Cistina	3,07	não detectado
Valina	4,77	2,82
Metionina	2,53	0,21
Isoleucina	4,99	1,7
Leucina	12,81	3,67
Tirosina	3,45	0,72
Fenilalanina	3,36	2,16
Lisina	10,23	4,03
Histidina	2,0	0,65
Triptofano	2,82	0,02
Arginina	2,36	8,15

Tabela 3. Escore de aminoácidos essenciais (EAE) calculados com base no padrão de referência da FAO/WHO (1990).

AA essenciais (g/100g proteína)	Padrão ¹ FAO/WHO	WPI	HCB	WPI:HCB 20:80	WPI:HCB 40:60	WPI:HCB 60:40	WPI:HCB 80:20
Treonina	3,4	4,7	2,3*	2,8*	3,3*	3,6	4,23
Met.+ Cistina	2,5	5,6	0,2*	1,3*	2,4*	3,6	4,52
Valina	3,5	4,8	2,8*	3,2*	3,6	3,8	4,38
Leucina	6,6	12,8	3,7*	5,5*	7,3	9,0	10,98
Isoleucina	2,8	5,0	1,7*	1,7*	3,0	3,6	4,33
Fenil. + Tirosina	6,3	6,8	3,1*	3,8*	4,6*	5,1*	6,07*
Lisina	5,8	10,2	4,0*	5,3*	6,5	7,7	8,99
Histidina	1,9	2,0	0,6*	0,9*	1,2*	1,4*	1,7*
Triptofano	1,1	2,8	0,0	0,6*	1,1	1,7	2,26
EAE*	-	1,0	0,0	0,5	0,7	0,8	0,9

Aminoácido limitante; EAE, escore de aminoácidos essenciais (aminoácido mais limitante); WPI, isolado protéico do soro de leite bovino; HCB, hidrolisado de colágeno bovino; WPI:HCB, diferentes proporções das duas proteínas, ¹ Referência (FAO/WHO, 1990).

A Tabela 3 mostra que enquanto o WPI atende, segundo o padrão FAO/WHO¹⁶, a todos os aminoácidos essenciais gerando um EAE igual ou superior a 1,0, o HCB mostra deficiência em todos os aminoácidos essenciais, particularmente nos sulfurados e completa ausência de triptofano gerando EAE igual a zero, portanto, essa proteína é incapaz de promover crescimento, em animais e humanos. No WPI os aminoácidos essenciais dominantes são os sulfurados (metionina mais cisteína), o triptofano, a lisina e os de cadeias ramificadas, particularmente a leucina.

Dentre os aminoácidos não essenciais e condicionalmente essenciais (Tabela 2) predominam no WPI os ácidos glutâmico e aspártico, e no HCB a glicina, a prolina e a alanina. A hidroxiprolina, componente importante do colágeno não é dosado no hidrolisado ácido como preparado para a análise de aminoácidos¹⁰.

Dados da literatura demonstram que o WPI, por conter elevado teor de aminoácidos sulfurados, particularmente cisteína e ácido glutâmico e por apresentar na estrutura primária de algumas de suas proteínas, seqüências glu – (cys)₂, que poderiam ser absorvidas como glutamil – cisteína, promove forte estímulo à síntese de glutathione (glutamil – cisteinil – glicina) nos tecidos^{5,6,17,18}. Por outro lado o fato das proteínas do WPI apresentarem concentrações elevadas de aminoácidos de cadeias ramificadas é considerado por alguns autores como de importância para a atividade atlética¹⁹ por estimular a síntese de proteínas musculares e por outros^{20,21}, no tratamento de traumas múltiplos e da cicatrização de queimaduras. A relação metionina : cisteína próxima à unidade e a concentração relativamente baixa de aminoácidos de cadeia lateral aromática têm sido apontados como fatores nutricionais favoráveis para crianças com fenilcetonúria²².

O fato do perfil aminoacídico do soro de leite se assemelhar ao do leite humano, particularmente a lactoalbumina, permite que sejam recomendadas na formulação de produtos para nutrição infantil, bem como na formulação de produtos de baixa caloria e baixo teor de resíduos para uso pós-cirúrgico, geriátrico e pacientes imobilizados^{23,24}.

Quanto ao hidrolisado de colágeno (HCB), embora seu perfil aminoacídico impossibilite seu uso como única fonte de proteína, por ser incapaz de promover crescimento e manter o balanço de nitrogênio, exatamente em virtude de sua composição aminoacídica atípica é o melhor substrato para a síntese do colágeno nos tecidos conjuntivos e cartilagens²⁵.

Oesser e colaboradores²⁵ demonstraram que peptídios de colágeno de até 15 – 20 KD podem ser absorvidos a partir do hidrolisado. Quando foram usados peptídios marcados com carbono-14 (¹⁴C) e hidrolisado não marcado, porém enriquecido com prolina – ¹⁴C, observou-se que a radioatividade da prolina -¹⁴C e do hidrolisado -¹⁴C distribuía-se igualmente no plasma e em vários outros tecidos. Porém, nas cartilagens a radioatividade do hidrolisado -¹⁴C foi cerca de 4 vezes maior que a proveniente da prolina -¹⁴C, sugerindo haver uma especificidade das cartilagens pela utilização dos peptídios de colágeno, para síntese de suas proteínas. Por outro lado, Oesser e Seifert²⁶, em culturas de condrócitos bovino observaram que hidrolisados de colágeno eram capazes de estimular a síntese e a secreção no meio de cultura de colágeno tipo II.

A mais ampla aplicação e divulgação do hidrolisado de colágeno como ingrediente funcional, tem sido na prevenção e/ou tratamento da osteoartrite e da osteoporose²⁷. Doses diárias de 10g tem sido usadas em estudos clínicos e mostrado eficiência na diminuição de dores articulares e melhora da mobilização de pacientes com vários graus de osteoartrite e osteoporose.

O hidrolisado de colágeno bovino (HCB) objeto deste estudo apresentou um grau de hidrólise de 11%, considerado grau médio. Esse material não geleifica, como a gelatina original, e apresenta elevada solubilidade em água.

A solubilidade em água da mistura 60% WPI : 40% HCB para diversas concentrações da mistura é ilustrada na Figura 2. Observa-se que na faixa de concentrações 2,5 a 20% (p/v) a solubilidade variou entre 97 e 100%. Essa característica favorece bastante o uso desta mistura para a formulação de bebidas e outros alimentos a serem utilizados em forma líquida.

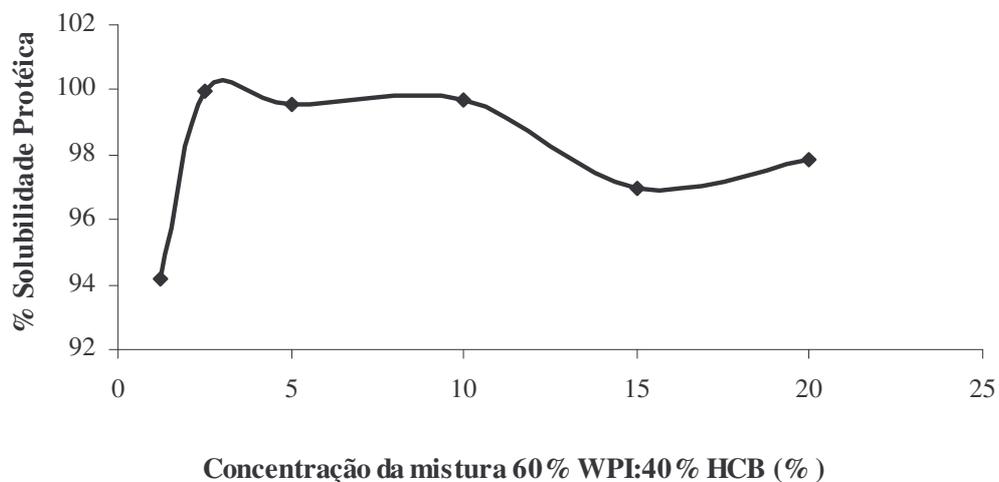


Figura 2. Representação do perfil de solubilidade da mistura 60%WPI: 40%HCB em água a 25 °C com variação da quantidade da mistura em gramas.

Os resultados do primeiro ensaio com ratos (Figura 1A) são apresentados na Figura 3 e Tabela 4.

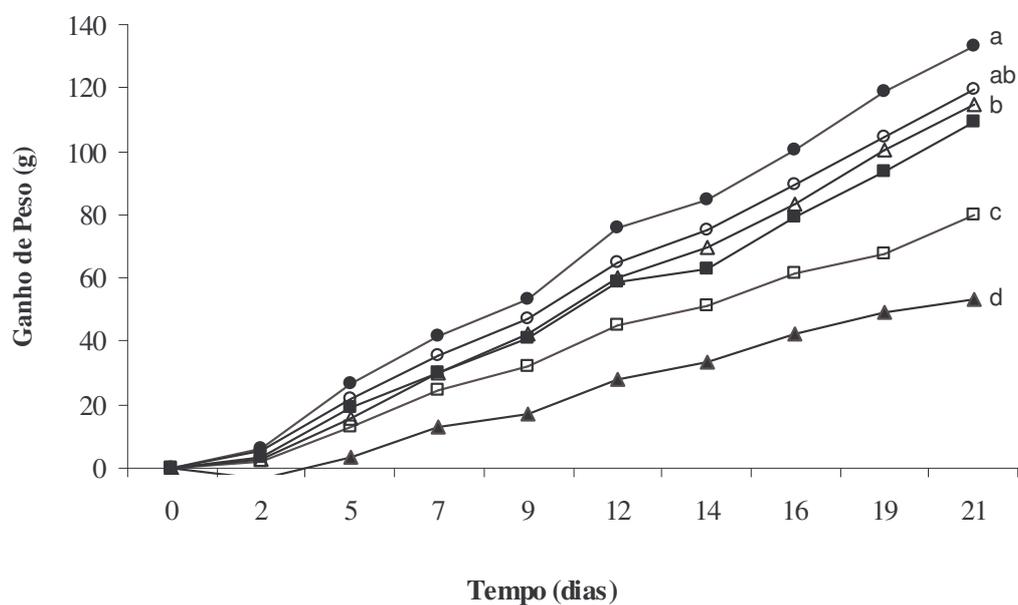


Figura 3 Curva de crescimento de ratos alimentados por 21 dias com dietas contendo 12% de proteína proveniente de caseína (●); WPI (■); 20%WPI:80% HCB (▲); 40%WPI:60% HCB (□); 60%WPI:40%HCB (Δ); 80%WPI:20%HCB (○). Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

A Figura 3 representa o ganho de peso dos ratos no período de 21 dias nas várias dietas estudadas. Não houve diferença estatística no ganho de peso entre o tratamento caseína comercial (CC) e a mistura 80% WPI: 20% HCB, por outro lado não houve diferença também entre o tratamento 60% WPI: 40% HCB e o WPI sendo que ambos diferiram da caseína. As misturas 40% WPI:60% HCB e 20% WPI: 80% HCB foram inferiores às demais, sendo a última mistura a que promoveu o menor crescimento.

Os tratamentos 100% HCB e a dieta isenta de proteína (aprotéica) não aparecem no gráfico da Figura 3 por terem promovido perdas significativas de peso nos animais (dados não apresentados). É interessante notar que as misturas com 40% de HCB não diferiu do WPI, mas diferiu estatisticamente da caseína. Como um dos propósitos do estudo foi estabelecer uma mistura que se igualasse ou mesmo se aproximasse do WPI, a mistura com 40% de HCB foi escolhida para a formulação do produto para idosos por estabelecer melhor equilíbrio entre as duas proteínas e ser mais econômica, considerando o preço e a disponibilidade relativas dos dois isolados, além do fato de que o colágeno apresenta propriedades funcionais que favorecem a saúde de idosos. O WPI é menos disponível no mercado e mais oneroso para ser produzido que o HCB.

A Tabela 4 mostra os dados do PERop e do NPR para os tratamentos do primeiro ensaio, a partir da ingestão protéica e do ganho de peso. Observa-se que os dois índices foram mais elevados nas misturas com 60 e 80% de WPI, porém não diferiram estatisticamente dos valores calculados para a caseína e para o WPI (100%). A mesma tendência foi observada em relação ao consumo de dieta e ingestão de proteína para os tratamentos mencionados. Os menores índices foram determinados para os ratos em HCB, sendo que os tratamentos com 20 e 40% de WPI deram valores intermediários. Da mesma forma que pelo critério crescimento (Figura 3), os índices NPR e PER indicam a escolha da

mistura 60% WPI : 40% HCB para futuras formulações, tanto pela qualidade nutricional como pelas considerações econômicas e funcionais, já mencionadas.

Friedman²⁸ considera de elevado valor nutritivo proteína com PER $\geq 2,0$, o que classifica a caseína, o WPI e as misturas com 60 e 80% WPI como de excelente valor nutritivo.

Tabela 4 Ingestão de dieta, ingestão de proteína, PER (operacional) e NPR para ratos em dietas com 12% proteína de diferentes fontes.

Fonte Protéica	Ingestão Dieta (g)	Ingestão Proteína (g)	PER operacional	NPR
CC	352,0 \pm 19,54 ^a	53,0 \pm 2,94 ^a	2,5 \pm 0,13 ^{ab}	3,0 \pm 0,14 ^a
WPI	329,3 \pm 22,11 ^a	45,8 \pm 3,08 ^b	2,4 \pm 0,12 ^{ab}	2,9 \pm 0,12 ^a
HCB	113,4 \pm 21,74 ^c	15,0 \pm 2,87 ^d	-1,1 \pm 0,51 ^d	0,6 \pm 0,63 ^d
WPI:HCB 20:80	273,3 \pm 44,96 ^b	36,4 \pm 5,99 ^c	1,4 \pm 0,19 ^c	2,1 \pm 0,12 ^c
WPI:HCB 40:60	278,9 \pm 35,57 ^b	37,6 \pm 4,80 ^c	2,1 \pm 0,15 ^b	2,8 \pm 0,13 ^a
WPI:HCB 60:40	308,9 \pm 22,19 ^{ab}	42,1 \pm 3,00 ^{bc}	2,7 \pm 0,18 ^a	3,3 \pm 0,17 ^a
WPI:HCB 80:20	332,4 \pm 10,70 ^a	45,8 \pm 1,47 ^b	2,6 \pm 0,12 ^a	3,2 \pm 0,13 ^a

Média de 6 ratos \pm desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. CC, caseína comercial; WPI, isolado protéico do soro de leite bovino; HCB, hidrolisado de colágeno bovino; WPI:HCB, diferentes proporções das duas proteínas (%).

Na Tabela 5 encontram-se os dados de digestibilidade verdadeira da proteína (Dv%) e de PDCAAS (%), calculados com base no nitrogênio ingerido, no nitrogênio fecal total e no nitrogênio fecal endógeno.

Tabela 5 Valores obtidos para nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal, digestibilidade verdadeira e PDCAAS para ratos em dietas com 12% proteína de diferentes fontes.

Tratamento	N ingerido (g)	N fecal (g)	D _v (%)	PDCAAS (%)
CC	8,48 ± 0,47 ^a	0,92 ± 0,35 ^a	90,54 ± 4,11 ^b	90,54 ^a
WPI	7,19 ± 0,48 ^b	0,69 ± 0,12 ^{ab}	92,07 ± 1,47 ^b	92,07 ^a
HCB	2,70 ± 0,52 ^c	0,16 ± 0,06 ^d	98,45 ± 2,85 ^a	0,00 ^c
WPI:HCB 20:80	6,39 ± 1,05 ^b	0,58 ± 0,08 ^b	92,69 ± 1,65 ^b	46,34 ^d
WPI:HCB 40:60	6,41 ± 0,82 ^b	0,54 ± 0,21 ^{bc}	93,42 ± 2,84 ^b	65,39 ^c
WPI:HCB 60:40	6,98 ± 0,50 ^b	0,38 ± 0,14 ^{bc}	96,23 ± 2,25 ^a	76,89 ^b
WPI:HCB 80:20	7,38 ± 0,24 ^{ab}	0,62 ± 0,19 ^{ab}	93,18 ± 2,36 ^b	83,86 ^a

Resultados são média de 6 animais por tratamento ± desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Observa-se que o HCB e a mistura com 60% WPI apresentaram a maior digestibilidade não diferindo entre si estatisticamente ($p > 0,05$), porém diferente de todos os demais tratamentos ($p < 0,05$), os quais se igualaram entre si. Os índices PDCAAS (%) se igualaram à D_v para a caseína e o WPI, foi igual a zero para o HCB em virtude da completa ausência de triptofano no hidrolisado (EAE = 0) e aumentou progressivamente nos demais tratamentos em virtude da elevação do EAE como aumento da proporção de WPI nas misturas. Contudo não atingiram o EAE igual a 1,0, permanecendo o PDCAAS inferior ao da CC e do WPI.

Na Tabela 6 são apresentados os dados de nitrogênio ingerido (NI) e do nitrogênio fecal (NF) e urinário (NU) excretados, além dos cálculos do balanço de nitrogênio (BN) e da digestibilidade aparente da proteína, relativos ao segundo ensaio (Figura 1B).

Tabela 6 Valores de para nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal, nitrogênio urinário e digestibilidade aparente para a caseína comercial (CC), isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), mistura de 50% WPI: 50% HCB e mistura de 60% WPI: 40% HCB.

Tratamento	N ingerido (g)	N fecal (g)	N urinário (g)	BN	D _a (%)
CC	2,14 ± 0,26 ^a	0,11 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,06 ^a	1,93 ± 0,23 ^a	95,10 ± 0,71 ^{ab}
WPI	1,79 ± 0,19 ^b	0,08 ± 0,02 ^b	0,19 ± 0,05 ^a	1,53 ± 0,19 ^b	95,75 ± 0,87 ^a
WPI:HCB 50:50	1,77 ± 0,28 ^b	0,10 ± 0,02 ^{ab}	0,21 ± 0,09 ^a	1,46 ± 0,24 ^b	94,37 ± 0,63 ^{bc}
WPI:HCB 60:40	1,80 ± 0,18 ^b	0,11 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,10 ^a	1,53 ± 0,18 ^b	93,64 ± 1,42 ^c

Resultados são média de 8 animais por tratamento ± desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Verifica-se que a maior ingestão ($p < 0,05$) foi para a CC, diferindo dos outros três tratamentos que não diferiram entre si ($p > 0,05$). A menor excreção fecal de nitrogênio foi para o WPI ($p < 0,05$) em relação aos demais tratamentos que não diferiram entre si. Não houve diferença ($p > 0,05$) para a excreção urinária entre todos os tratamentos. O balanço de nitrogênio foi mais elevado ($p < 0,05$) para a CC, em relação aos outros três tratamentos que não diferiram entre si.

A digestibilidade aparente da CC e do WPI foram mais elevadas que a das misturas WPI : HCB (50:50 e 60:40) que também não diferiram entre si.

Os resultados dos cálculos do valor biológico aparente (VBa) e da utilização líquida das proteínas para as quatro fontes protéicas testadas no segundo ensaio são apresentadas na Figura 4.

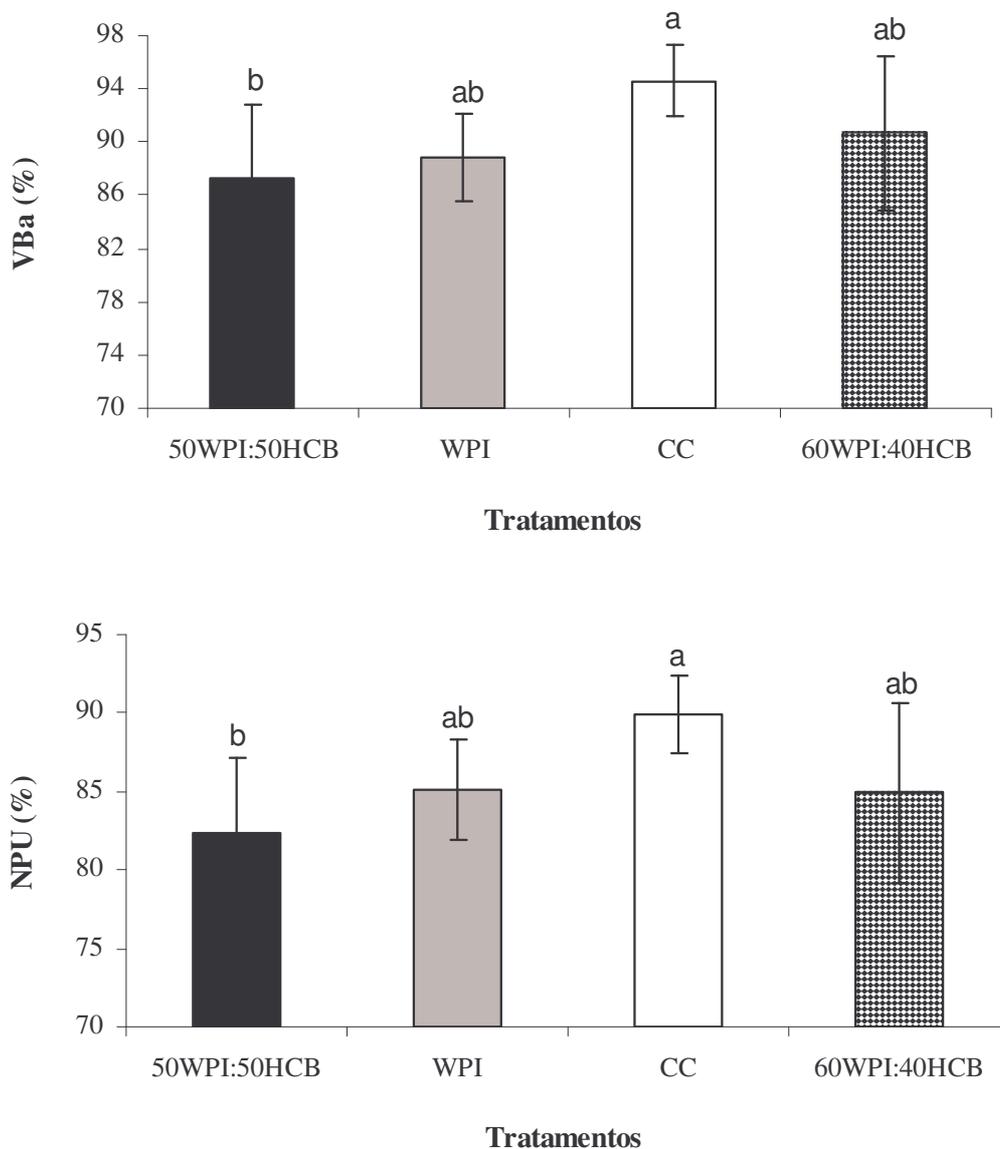


Figura 4 Representação gráfica do valor biológico aparente e da utilização líquida da proteína do ensaio com ratos Wistar alimentados por 10 dias, com dietas contendo 12% de proteínas provenientes de 50%WPI: 50%HCB; WPI; CC e 60%WPI: 40%HCB.

O valor biológico que representa a porcentagem de nitrogênio retido/o nitrogênio absorvido ($VBa = NR/NA \times 100$) é sempre menor que o NPU, calculado pelo quociente do nitrogênio retido pelo nitrogênio ingerido ($NPU = NR/NI \times 100$). Comparando os quatro

tratamentos pode-se verificar que, em valores absolutos, a CC apresentou os maiores índices embora não tenha diferido estatisticamente do WPI e da mistura 60% WPI : 40% HCB. Por outro lado os menores índices, em valores absolutos, foram para a mistura 50% WPI : 50% HCB embora não tenham diferido estatisticamente do WPI e da mistura 60% WPI : 40% HCB.

A análise cuidadosa do conjunto dos dados dos dois ensaios biológicos permitiu concluir que as misturas WPI : HCB, a partir de 50% de WPI apresentou excelente valor nutritivo se assemelhando ao WPI sendo, porém, inferior à caseína no tocante ao poder de promover crescimento em ratos. Por outro lado, testes preliminares de imunoestimulação (não apresentados) mostram a superioridade da mistura WPI : HCB 60 : 40 em relação à mistura 50 : 50 e, particularmente em relação à caseína.

A motivação para a realização desta pesquisa foi estabelecer uma mistura adequada tanto do ponto de vistas nutricional quanto do funcional. A mistura 60% WPI : 40% HCB parece preencher melhor estes objetivos uma vez que eleva o valor nutritivo do colágeno (HCB) de praticamente zero para os valores elevados da mistura. Por outro lado espera-se associar as várias propriedades funcionais do WPI^{6,17,18} com as do colágeno hidrolisado (HCB)^{25,26,27}, na formulação de um complemento dietético para idosos desnutridos.

CONCLUSÃO

Enquanto a composição em aminoácidos essenciais do isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) atende completamente às recomendações da FAO/WHO, a do hidrolisado de colágeno bovino (HCB) mostrou-se deficiente em todos os aminoácidos

essenciais e completa ausência de triptofano, resultando em escore de aminoácidos essenciais igual a zero.

Em ensaios de crescimento com ratos, o hidrolisado de colágeno bovino promoveu perda de peso dos animais, sendo os maiores ganhos de peso registradas para as dietas com caseína seguida pelas misturas 80% WPI : 20% HCB, 60% WPI : 40 HCB e WPI (100%).

Nos dois ensaios com ratos e para a maioria dos índices estudados a mistura 60% WPI: 40% HCB mostrou-se equivalente ou superior ao WPI (100%). Desta forma chegou-se à conclusão que a mistura 60% WPI : 40% HCB é a mais indicada como fonte protéica para a formulação de um produto dietético funcional para idosos desnutridos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro à empresa Gelita pela doação do hidrolisado de colágeno e ao CNPq – conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de mestrado para a primeira autora.

REFERÊNCIAS

1. Bello J. Los alimentos funcionales o nutraceuticos: nueva gama de productos em la indústria alimentaria. Alimentaria: Rev Technol Hig Alim. 1995; 267:25-30.
2. Katz F. Top product development trends in Europe. Food Technol. 1999; 53 (1): 38-42.
3. NBJ – Nutrition Business Journal 2003. Functional foods report. Disponível em: www.nutritionbusiness.com [acesso Jan 24 2004].

4. Sloan AE. The top 10 functional food trends: the next generation. *Food Technol.* 2002; 56 (4): 32-57.
5. Sgarbieri VC. Food proteins and peptides presenting specific protection to human healthy (a review). *Food for Health in the Pacific Rim*. Eds: JR Whitaker, FH Norman, CF Shoemaker, RP Singh. Food and Nutrition Press, Inc. Thrumbull, Conn, USA, 1999; pp. 335-352.
6. Sgarbieri VC. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev Nutr.* 2004; 17 (4):397-409.
7. Sgarbieri VC. The role of dietary energy and of macrocomponents of foods in modulating carcinogenesis (na review). *Cienc Cultura.* 1999; 51 (2): 104-121.
8. AOAC – Association of Official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis. W. Horwtz (Ed), 15th edition, Washington, DC. 1990; 1141p.
9. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37 (8): 911-917.
10. Spackman DC, Stein WH, Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Anal Biochem.*1958; 30 (9): 1190-1206.
11. ADLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem.* 1979; 27 (6): 1256-1262,
12. MORR CV., GERMAN B, KINSELLA JE, REGENSTEIN JP, BUREN V, KILARA A, LEWIS BA, MANGINO M.E. Collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *J Food Sci.* 1985; 50 (6):1715-1718.
13. SGARBIERI V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. Cap. IV, pp. 366-378, 1996. Editora VARELA, São Paulo.

14. REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY JGC. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the formulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123 (11): 1939-1951.
15. U.S. Dairy Export Council. Manual de referência para produtos de soro dos EUA. Arlington,USA. 1997.
16. FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nation / World Health Organization. Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation.1990, Bethesda, USA.
17. Bounous G, Gold P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clin Invest Med.* 1991; 14: 296-309.
18. MARSHALL ND. Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev.* 2004; 9 (2): 136-156.
19. Criam MG, Munro HN. Proteins. In: *Present Knowledge of Nutrition*, 5th edition. 1982. The Nutrition Foundation, Inc., Washington, DC.
20. Brenan MF, Cerra F, Daly JM, Fisher JE, Maclawer LL, Smith, RJ, Vinars E, Vannemacher R, Yong VR. Report in a research workshop: branched chain amino acids in stress and injury. *J Parent Ent Nutr.* 1986; 10:446-452.
21. Alexander JW, Gottschlich MM. Nutritional immunomodulation in burn patients. *Crit Care Med.* 1990; 18: S149-153.
22. Hambraens L. Nutritional aspects of milk proteins. In: *Development of Dairy Chemistry*. PF Fox (Ed) 1982; pp. 289-313. Applied Science, London.
23. Satterlee LD. Protein for use in foods. *Food Technol.* 1981; 35: 53-60.

24. Hline WE, Klein PD, Reeds PJ. The importance of α -lactalbumin in infantile nutrition. *J Nutr.* 1991; 121: 277-283.
25. Oesser S, Adam M, Babel E, Seifert J. Oral administration of ¹⁴C-labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J Nutr.* 1999; 129: 1891-1895.
26. Oesser S, Seifert J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res.* 2003; 311: 393-399.
27. MOSKOWITZ RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin Arthritis Rheum.* 2000; 30 (2):.87-99.
28. FRIEDMAN M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *J Agric Food Chem.* 1996; 44 (1): 6-29.