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

COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DOS MÚSCULOS CARDÍACO E GASTROCNÊMIO, FÍGADO E SANGUE DE RATOS ALIMENTADOS COM PROTEÍNA INTACTA E HIDROLISADA DO SORO DO LEITE E SUBMETIDOS À ATIVIDADE FÍSICA

CAROLINA CAUDURO BENSABATH
Nutricionista

PROF. Dr. JAIME AMAYA FARFAN
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição.

CAMPINAS
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Leão, Carolina Cauduro Bensabath Carneiro
L476c Composição bioquímica dos músculos cardíaco e gastrocnêmio, fígado e sangue de ratos alimentados com proteína intacta e hidrolisada do soro do leite e submetidos à atividade física / Carolina Cauduro Bensabath Carneiro Leão. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

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

1. Proteína. 2. Dieta. 3. Ratos. 4. Atividade física. 5. Soro de leite. 6. Metabolismo. I. Amaya Farfan, Jaime. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Biochemical composition of myocardial and gastrocnemius muscles, liver and blood of rats fed either intact or hydrolyzed whey protein, while submited to physical activity
Palavras-chave em inglês (Keywords): Protein, Diet, Rats, Physical activity, Milk whey, Metabolism
Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos
Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição
Banca examinadora: Jaime Amaya Farfan
Mário Roberto Maróstica Junior
Semíramis Martins Álvares Domene
Data da defesa: 17/07/2009
Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan
Orientador – FEA / UNICAMP

_____

Dra. Semíramis Martins Álvares Domene
Membro – PUC-CAMPINAS

_____

Dr. Mário Roberto Maróstica Junior
Membro – FEA / UNICAMP

_____

Dra. Mara Patrícia Traina Chacon Mikahil
Membro – FEF / UNICAMP

_____

Dr. Miguel Arcanjo Areas
Suplemente – IB / UNICAMP

Aos meus pais

José Antônio e Regina

pelo amor, carinho e apoio a mim dedicados,

com tanto desvelo, ao longo dos anos;

ao meu marido,

Tiago

que compartilhou

tão junto de mim, todas as

fases desse trabalho, e que com seu apoio

me incentivou nos momentos mais difíceis,

com muito carinho,

dedico.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, que coloca em nossas vidas obstáculos que por vezes julgamos intransponíveis, mas que ao superá-los temos a satisfação de identificar o tamanho da força que Dele recebemos.

- Ao Professor Jaime Amaya Farfan, pela confiança, compreensão, incentivo, orientação e amizade.

- Ao Tiago, pela paciência, compreensão e por toda ajuda durante todo o tempo que estamos juntos.

- A todos da minha família (pais, irmã, avôs, tios, primos, sogros, cunhados, Leda) por fazerem parte da minha vida e pela compreensão nos momentos de dificuldades e ausência.

- Às minhas amigas Viviane e Giovana, por tudo que fizeram por mim e por todos os momentos bons e difíceis deste trabalho.

- À Professora Dra. Lília Zago, com quem aprendi muito no início da minha vida acadêmica. Agradeço também pela orientação no trabalho de conclusão de curso, que muito influenciou na decisão de prosseguir para o mestrado.

- À Professora Dra. Denise Macedo, do Labex/IB-Unicamp, por ceder o laboratório para o ensaio biológico.

- Aos meus amigos que sempre compreenderam a distância que muitas vezes a vida impõe.

- Aos colegas do Labex/IB-Unicamp, por toda ajuda prestada.

- Aos colegas de trabalho do Laboratório de Fontes Protéicas, agradeço a todos.

- Aos professores e colegas do DEPAN, em especial à Suzana (LEB) pelo auxílio durante todo o período do experimento e a Carla.

- À Hilmar Ingredients™ pela doação das proteínas do soro lácteo utilizadas nas dietas experimentais.

- À Helena Raposo e Eliane Filiputti pelas análises de Ácidos graxos livres e Insulina, respectivamente.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa concedida no decorrer do curso.

- A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Sumário

LISTA DE TABELAS ix

LISTA DE FIGURAS x

RESUMO xii

ABSTRACT xv

INTRODUÇÃO GERAL 1

Referências Bibliográficas 3

OBJETIVOS 5

Objetivo Geral 6

Objetivos Específicos 6

CAPÍTULO I

1- REVISÃO DA LITERATURA 9

1.1- Atividade física e Ingestão de Proteína 11

1.2- Proteínas do Soro de Leite 16

1.3- Hidrolisado Protéico 18

1.4- Glicose Sérica 21

1.5- Insulina 23

1.6- Lactato Sangüíneo 24

1.7- Glicogênio 28

1.8- Proteínas Séricas e Musculares 30

1.9- Ácidos Graxos 31

1.10- Colesterol e Triacilgliceróis no Sangue 33

Referências Bibliográficas 36

CAPÍTULO II

2.1- INTRODUÇÃO 46

2.2- MATERIAL E MÉTODOS 48

2.2.1-Animais e Ensaio Biológico 48

2.2.2- Dietas Experimentais 49

2.2.2.1- Composição das Dietas 50

2.2.3- Controle da Evolução Ponderal e Ingestão Alimentar 51

2.2.4- Protocolo de Treinamento e Característica do Treinamento Físico 52
2.2.5- Testes de Desempenho – Exaustão 53
2.2.6- Sacrifício dos Animais 55
2.2.7- Determinações Analíticas 55
2.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA 63
2.4- RESULTADOS E DISCUSSÃO 64
2.5- CONCLUSÕES 107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 111
ANEXOS 118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas (g/kg de dieta) utilizadas no ensaio biológico 50

Tabela 2: Composição centesimal média das dietas experimentais (base seca) 51

Tabela 3: Protocolo de treinamento contínuo de 9 semanas 53

Tabela 4: Protocolo do teste de desempenho 54

Tabela 5: Tempos médios de exaustão (seg) nos testes de desempenho realizados por todos os grupos treinados 68

Tabela 6: Concentrações de proteínas séricas totais e albumina sérica, obtidas para os seis grupos de ratos, 48 horas pós-exaustão 70

Tabela 7: Lactato sérico, em repouso, obtido para os diferentes grupos de ratos 74

Tabela 8: Concentração de lactato sanguíneo (mmol/L), em diferentes momentos, obtido para os grupos treinados 75

Tabela 9: Parâmetros sanguíneos obtidos para os diferentes grupos de ratos 78

Tabela 10: Parâmetros médios de glicose e insulina séricas, nas semanas 12 e 13 do experimento, obtidos para os diferentes grupos de ratos 88

Tabela 11: Conteúdo, após 48 horas de descanso, de glicogênio muscular (gastrocnêmio), glicogênio hepático e glicogênio no coração 93

Tabela 12: Conteúdo de proteína muscular (gastrocnêmio), proteína hepática e proteína do miocárdio 101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de divisão dos animais por dieta e tipo de atividade física 48

Figura 2: Perfil aminoacídico total das dietas com caseína, isolado e hidrolisado protéico de soro de leite, mostrando a similaridade entre a composição das dietas I e H 64

Figura 3: Ganho de peso dos animais durante ensaio biológico 67

Figura 4: Tempos médios de exaustão nos testes de desempenho 69

Figura 5: Concentração de proteínas séricas totais (g/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas 71

Figura 6: Concentração de albumina sérica (g/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas 72

Figura 7: Concentração de Lactato sanguíneo (mmol/L) nos diferentes momentos, para os grupos treinados 75

Figura 8: Concentração de Triacilglicerol (mg/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas 79

Figura 9: Concentração de Colesterol total (mg/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas 80

Figura 10: Concentração de LDL-colesterol (mg/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas 82

Figura 11: Concentração de HDL-colesterol (mg/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas 83

Figura 12: Concentração de LDL/HDL nos diferentes grupos de atividade física e dietas 84

Figura 13: Concentração de ácidos graxos livres (mmol/L) nos diferentes grupos de atividade física e dietas 85

Figura 14: Concentração de glicose sanguínea (mg/dL) nas semanas 12 e 13 do ensaio biológico, nos diferentes grupos de atividade física e dietas 89

Figura 15: Concentração de insulina sanguínea (ng/mL) nas semanas 12 e 13 do ensaio biológico, nos diferentes grupos de atividade física e dietas 91

Figura 16: Concentração de glicogênio no gastrocnêmio (g/100g), nos diferentes grupos de atividade física e dietas 94

Figura 17: Concentração de glicogênio no miocárdio (g/100g), nos diferentes grupos de atividade física e dietas 97

Figura 18: Concentração de glicogênio hepático (g/100g), nos diferentes grupos de atividade física e dietas 99

Figura 19: Concentração de proteína no gastrocnêmio (mg/100mg), nos diferentes grupos de atividade física e dietas 102

Figura 20: Concentração de proteína no miocárdio (mg/100mg), nos diferentes grupos de atividade física e dietas 104

Figura 21: Concentração de proteína hepática (mg/100mg), nos diferentes grupos de atividade física e dietas 105

RESUMO

As proteínas do soro de leite têm sido apontadas como nutrientes portadores de atividade funcional, capazes de modular algumas respostas fisiológicas do organismo. Estas possuem valor biológico e escore químico superior ao de outras proteínas de origem animal, além de serem consideradas proteínas de rápida absorção. Devido a essas qualidades, as proteínas do soro de leite são muito utilizadas por atletas. Esta pesquisa teve como objetivo estudar a influência do consumo do isolado protéico do soro do leite bovino e um hidrolisado enzimático, com grau de hidrólise médio de ~13%, no metabolismo e no desempenho físico de ratos. As dietas foram preparadas contendo, alternativamente, isolado do soro de leite, hidrolisado do soro do leite ou caseína. Ratos Wistar machos foram divididos em 6 grupos (n = 6x12): caseína-sedentários **(CS)**, isolado-sedentário **(IS)**, hidrolisado-sedentário **(HS)**, caseína-treinado **(CT)**, isolado-treinado **(IT)** e hidrolisado-treinado **(HT)**. A dieta com hidrolisado forneceu melhores resultados em um primeiro teste de desempenho, ao passo que as proteínas intactas (caseína e isolado) alcançaram este ponto, a partir de um segundo teste. Observou-se que as proteínas séricas totais do animal diminuíram após a exaustão, quando a dieta continha a caseína, ou o isolado, enquanto que o hidrolisado as manteve constantes. A albumina sérica, por sua vez, não mostrou ser afetada pela dieta, enquanto que o treinamento favoreceu o aumento de seus níveis. Ficou evidente que a atividade física diminuiu substancialmente os níveis dos triacilgliceróis no sangue, independente do tipo de dieta, sendo que o grupo HT apresentou a maior redução. A atividade física não exerceu influência sobre o nível de colesterol total e, quanto às dietas, também não houve efeito dentre os sedentários. Entretanto, dentre os treinados, o grupo hidrolisado apresentou maior nível de colesterol total, sem haver hipercolesterolemia e nem alteração da fração LDL-colesterol. A atividade física exerceu grande influência no nível de HDL-colesterol, visto que os grupos treinados apresentaram maiores concentrações. Contudo, a atividade física não resultou em aumento significativo do HDL-colesterol para o grupo treinado alimentado com caseína. O consumo da proteína hidrolisada fez com que os níveis de ácidos graxos livres do sangue fossem baixos, especialmente entre os ratos sedentários. O protocolo de treinamento provocou posterior diminuição dos níveis de AGL, sendo que o exercício também teve efeito semelhante no grupo que consumiu o isolado. Os níveis de glicose e

insulina não mostraram ser significativamente alteradas nem pelo tipo de proteína na dieta e nem pela atividade física após 48 horas do teste de desempenho físico. A concentração de glicogênio no músculo gastrocnêmio dos animais sedentários não foi influenciada pelo fato de a proteína estar hidrolisada ou inteira. Contudo, o grupo IS apresentou concentração duas vezes maior de glicogênio do que o grupo CS. Para o conjunto treinado, o grupo HT apresentou concentração quase três vezes maior do que os grupos IT e CT. Com relação ao efeito da atividade física, observou-se que, enquanto o treino diminuiu a concentração de glicogênio no grupo isolado, aumentou a do hidrolisado. De modo geral, foi observado que o tipo de proteína na dieta teve pouca influência nos estoques de glicogênio miocárdico. Já em relação ao efeito da atividade física no glicogênio, observou-se que o treinamento diminuiu a concentração deste para o grupo hidrolisado quando comparada a alta concentração presente nos animais sedentários. Com relação ao glicogênio hepático, os animais sedentários apresentaram estoques semelhantes, independente do tipo de dieta, enquanto que o treinamento diminuiu os estoques nos animais que consumiam a caseína. Dentre os grupos sedentários, as concentrações de proteína no músculo gastrocnêmio foram iguais para os animais alimentados com hidrolisado e isolado. No entanto, os músculos dos animais alimentados com a dieta com caseína claramente apresentaram menor quantidade total de proteína, em relação ao hidrolisado. Dentre o conjunto dos treinados, porém, não houve influência do tipo de dieta sobre este parâmetro. A concentração de proteína do miocárdio, por sua vez, não sofreu influência, tanto pelo tipo de dieta, quanto pelo nível de atividade física. Já a concentração de proteína hepática alcançou os níveis mais baixos com a dieta caseína, os quais foram revertidos com o exercício para níveis compatíveis com os das outras fontes protéicas. Considerados em conjunto, estes dados sugerem que, adicionalmente aos já conhecidos benefícios atribuídos às proteínas do soro de leite, os hidrolisados de grau médio podem contribuir para o rato exercitado, e provavelmente humanos, com tempos de exaustão mais longos, aumento do HDL-colesterol (sem afetar a fração LDL), e diminuir os níveis séricos de triacilgliceróis e ácidos graxos livres, talvez devido à promoção da oxidação dos ácidos graxos, enquanto garante reservas mais altas de proteína e glicogênio no músculo gastrocnêmio, mesmo 48 horas após a exaustão. Além disso, os resultados confirmam o efeito benéfico da atividade física em todos os parâmetros estudados, os quais foram consistentes com a noção de que novas modificações da dieta

podem ainda influenciar positivamente o desempenho fisiológico do rato. Além disso, os resultados confirmam o efeito benéfico da atividade física em todos os parâmetros estudados e foram consistentes com a idéia de que modificações na dieta podem ainda influenciar positivamente o desempenho fisiológico de ratos.

Palavras-chave: proteína, dieta, ratos, atividade física, soro de leite, metabolismo.

ABSTRACT

The milk whey proteins have been considered as nutrients with functional activities capable of modulating some physiological responses of the organism. Because of their high biological value and superior chemical score, as compared to other animal origin proteins, and for exhibiting fast digestion and absorption, the milk whey proteins are widely consumed by athletes. This work studied the influence of dietary milk whey isolate and the milk whey protein enzymatic hydrolysate, with medium degree of hydrolysis of 13%, on the metabolism and physical performance of rats. The diets were alternatively prepared with either milk whey protein isolate, milk whey protein hydrolysate or standard casein as the only source of protein. Male Wistar rats were divided into six groups (n = 6 x 12): casein-sedentary (**CS**), isolate-sedentary (**IS**), hydrolysate-sedentary (**HS**), casein-trained (**CT**), isolate-trained (**IT**) and hydrolysate-trained (**HT**). The animals were submitted to a 13-week training protocol that included three exhaustion tests on weeks 8, 12 and 13. Biochemical parameters were determined at 48 hours post-exhaustion. The diet containing the hydrolysate exhibited better results than the other diets in the first, although the intact proteins (casein and isolate) showed indistiguishable results from those of the hydrolysate in the second and third performance tests. It was observed that the animal total serum proteins decreased after exhaustion for the rats fed diets containing either casein or isolate, whereas it remained constant for those fed hydrolysate. The serum albumin, in turn, did not show to be affected by the type of diet, whereas physical training caused its level to rise. It became evident that physical activity greatly decreased the triacylglycerol levels in the blood, regardless of the diet type, emphasizing however that the HT group showed the highest reduction. Physical activity did not influence the level of total cholesterol, neither did the type of diet in the sedentary animals. However, among the trained groups, the hydrolysate diet promoted higher levels of total cholesterol without characterizing states of hypercholesterolemia or an increase of the LDL fraction. Physical activity had great influence on elevating the levels of HDL-cholesterol, while this increase was not significant in the trained-group fed the casein. Consumption of the hydrolysed protein caused the level of free fatty acids in the blood to fall, especially among sedentary rats, while the training protocol produced still an additional decrease of the FFA levels. This second effect was

also observed in the isolate-fed group. The glucose and insulin levels did not show to be significantly affected by either the type of protein in the diet or the physical activity 48 h after the last physical performance test. The mean glycogen concentration in the gastrocnemius muscle of the sedentary animals was not influenced by the fact of the protein being either in the hydrolysed or the intact form, but the IS showed a glycogen concentration twice as high as that of the CS group. As for the trained animals, the HT group showed a glycogen concentration almost three times as high as those of groups IT and CT. Regarding the effect of the physical activity, it was observed that this training protocol decreased the glycogen concentration in the isolate-group, while increasing it in the hydrolysate-group. As a whole, it was observed that at 48 hours post exhaustion, the protein type in the diet had little influence on the myocardial glycogen stores, but training brought about a decrease in the levels of myocardial glycogen in the hydrolysate group as compared to the high levels found in the sedentary group. The hepatic glycogen of the sedentary animals exhibited similar stores, regardless of the diet type, whereas training caused a reduction but only in the casein-fed animals. Within the sedentary groups, the protein concentrations of the gastrocnemius muscle in the hydrolysate and isolate-fed groups did not differ. Nevertheless, in relation to the hydrolysed group, the muscles of the casein-fed animals clearly had lower amounts of total protein. On the other hand, within the trained groups, no influence of the diet type on this parameter was observed. Regarding the protein content of the myocardium, no influence by either diet type or level of physical activity was evident. As for the hepatic protein concentration, the lowest level was reached by the animals fed the casein diet, but physical training was able to revert this state to a level compatible with those fed the other protein sources. Taken together, these data suggest that, additionally to the already known benefits ascribed to the milk whey proteins, whey protein hydrolysates with a medium degree of hydrolysis, may provide the exercising rat, and possibly humans, with such further benefits as greater physical performance, increased HDL-cholesterol (while not affecting the LDL fraction), lower serum triacylglycerol and free fatty acid levels (probably by promotion fatty acid oxidation), while still guarantying higher protein and glycogen stores in the gastrocnemius, even after 48 hours post-exhaustion. Moreover, the results confirmed the beneficial effects of physical

activity on all the parameters studied and were consistent with the notion that modifications of the diet can still positively influence the biological performance of the rat.

Key words: protein, diet, rats, physical activity, milk whey, metabolism.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Estudos têm mostrado que a suplementação da dieta com proteínas proporciona uma melhora do balanço entre a síntese e degradação de proteínas musculares no período pós-exercício (HÁ; ZEMBEL, 2003; TIPTON *et al.*, 2004). Sabe-se que as proteínas podem ser digeridas e absorvidas de forma variada e em velocidades diferentes, conforme o seu tipo, estado de desnaturação e tamanho. As conseqüências fisiológicas e metabólicas decorrentes destes processos também são modificadas, visto que o aproveitamento e o destino dos aminoácidos e peptídeos dependem de um conjunto de reações que estimulam diferentemente as respostas celulares (BOIRE *et al.*, 1997; DANGIN *et al.*, 2001).

O leite é uma das principais fontes protéicas alimentares, sendo um dos mais importantes e um dos mais antigos produtos funcionais disponíveis para os humanos, por esse motivo, cientistas estão desenvolvendo estudos dos componentes do leite, incluindo o soro, e o impacto que eles podem ter na saúde e na doença (MARSHALL, 2004). O leite bovino possui aproximadamente 3,25% de proteínas, sendo que as proteínas do soro do leite (queijo) contribuem com cerca de 20%, e as caseínas com 80% do total. O soro do leite é geralmente obtido durante o processo de fabricação do queijo e é rico em vitaminas, sais minerais e α-lactalbumina (JAYAPRAKASHA; BRUECKNER, 1999; HARAGUCHI *et al.*, 2006), é um produto de alto valor nutricional, pois contêm alto teor de aminoácidos indispensáveis, principalmente os de cadeia ramificada (HERMANSE *et al.*, 1994). Além disso, as proteínas do soro apresentam propriedades fisiológicas importantes, sendo melhor fonte de energia e de aminoácidos quando comparadas às proteínas do ovo, carne, soja ou até à caseína (SGARBIERI, 1996).

As proteínas do soro de leite (*whey protein*), que são solúveis, resultam do resíduo da produção do queijo. Este subproduto se encontra no mercado na forma de concentrados protéicos, isolados protéicos, hidrolisado protéico ou como ingredientes de muitos produtos formulados, servindo também como fonte de peptídeos bioativos.

Proteínas do soro do leite e caseína apresentam diferentes propriedades digestivas. A ingestão de proteínas do soro do leite leva a um aumento rápido no nível de aminoácidos do plasma sangüíneo e, concomitantemente, um aumento na síntese protéica, apresentando um esvaziamento gástrico mais lento em comparação à caseína, que leva mais tempo para

entrar no duodeno, devido à formação coágulos no estômago. Portanto, a caseína é denominada de proteína *slow* e as proteínas do soro do leite como proteínas *fast* (MANNINEN, 2006).

Estudos realizados com dietas contendo proteínas do soro de leite na forma intacta e pré-hidrolisada mostraram que essas proteínas conferem maior resistência à exaustão de animais submetidos ao exercício físico, em comparação à caseína. Constataram ainda, que os animais alimentados com as proteínas do soro mantiveram melhores níveis séricos de glicose e albumina, assim como a capacidade de preservação do glicogênio muscular, do que aqueles que receberam dieta contendo caseína como única fonte protéica (TASSI *et al*., 1998; ABECIA-SORIA, 2003; PIMENTA *et al*., 2006).

As fontes protéicas na nossa alimentação são geralmente consumidas na sua forma intacta para serem posteriormente digeridas ou hidrolisadas no trato gastrintestinal e absorvidas na forma de peptídeos de diversos tamanhos. Os possíveis efeitos de consumir as proteínas na forma pré-hidrolisada tem sido objeto de pesquisas que atualmente apontam para algumas vantagens, incluindo aquelas relacionadas ao exercício físico (TASSI *et al*., 1998; ABECIA-SORIA, 2003; PIMENTA *et al*., 2006).

Segundo os autores acima citados, as vantagens conferidas pela proteína do soro de leite pré-hidrolisada, sobre a caseína foram as mesmas detectadas com relação às proteínas intactas do soro. Ramos (2001), porém, apontou que o efeito das proteínas pré-hidrolisadas pode depender do grau de hidrólise, pois proteínas do soro de leite com alto grau (~31%) na dieta de ratos submetidos ao exercício agudo de natação durante dez dias, em sessões de 15 minutos, não apresentaram diferenças significativas, como foi relatado nos estudos anteriores, onde os hidrolisados continham grau de hidrólise médio (entre 8 e 12%). O autor ainda sugeriu a necessidade de realizar pesquisas com hidrolisados de vários graus de hidrólise.

As proteínas hidrolisadas têm sido pouco estudadas, com relação a seus benefícios para o organismo submetido ao exercício físico, sendo assim, um dos objetivos desse projeto foi estudar as diferenças metabólicas produzidas pela alimentação de grupos de ratos, exercitados e sedentários, com dietas contendo o hidrolisado do soro do leite, ou o isolado do soro de leite, ou a caseína (controle), como única fonte protéica e avaliar suas possíveis vantagens para a saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABECIA-SORIA, M.I. **Efeitos da Alimentação sub-crônica do hidrolisado das proteínas do lactossoro em ratos sedentários e exercitados.** 2003. p.23. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2003.

2. BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P. *et al*. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.94, p.14930-14935, 1997.

3. DANGIN, M.; BOIRE, Y.; GARCIA-RODENAS, C. *et al.* The digestion rate of protein is an independent regulation factor of postprandial protein retention. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism,** Baltimore, v. 280, n. 2, p. E340-E348, 2001.

4. HA, E.; ZEMBEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, p. 251-258, 2003.

5. HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades funcionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição,** v.19, n.4, p.479-488, jul/ago, 2006.

6. HERMANSE, J.E.; OSTERSEN, S.; AAES, O. Effect of the levels of fertilizer, grass and supplementary feeds on nitrogen composition and renneting properties of milk from cows at pasture. **Journal of Dairy Research,** v.61, n.2, p.179-189, may, 1994.

7. JAYAPRAKASHA, H.M.; BRUECKNER, H. Whey protein concentrate: a potencial functional ingredient for food industry. **Journal of Food Science Technology,** v.36, n.3, p.189-204, may, 1999.

8. MANNINEN, A.H. Hyperinsulinaemia, hyperaminoacidaemia and post-exercise muscle anabolism: the search for the optimal recovery drink. **British Journal of Sports Medicine,** v.40, p.900-905, 2006.

9. MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review,** v.9, n.2, p.136-156, 2004.

10. PIMENTA, F.M.V.; ABECIA-SORIA, M.I.; AULER, F.; AMAYA-FARFAN, J. Physical performance of exercising young rats fed hydrolyzed whey protein at a sub-optimal level. **International Dairy Journal,** Barking, v.16, n.9, p.984-991, 2006.

11. RAMOS, A.G. **Utilização das proteínas do soro lácteo por ratos jovens.** 2001. p.83. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de engenharia de Alimentos, Campinas, 2001.

12. SGARBIERI, V.C. **Fontes de proteínas na alimentação**, In: Proteínas em alimentos protéicos. São Paulo, SP. Ed. Livraria Varela, 1996.

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

14. TIPTON, K.D.; ELLIOTT, T.A.; CREE, M.G.; WOLF, S.E.; SANFORD, A.P.; WOLFE, R.R. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. **Medicine & Science in Sports and Exercise**, v.36, n.12, p. 2073-2081, 2004.

OBJETIVOS

GERAL

Estudar a influência do consumo do isolado protéico do soro do leite bovino e seu hidrolisado enzimático (grau de hidrólise médio, ~13%), como única fonte protéica, no metabolismo e no desempenho físico de ratos Wistar.

ESPECÍFICOS

1. Planejar experimento com ratos Wistar, utilizando dietas isoenergéticas, isoprotéicas e isolipídicas que contenham, alternativamente, o isolado protéico do soro do leite ou seu hidrolisado enzimático, em substituição da proteína padrão, caseína. Como referência, será mantido um grupo controle consumindo a dieta completa AIN 93-M, ou seja, elaborado com a proteína padrão, caseína.

2. Instalar e executar protocolo de nove semanas de alimentação e treinamento em esteira para 72 ratos machos de sete semanas de vida. Os dois protocolos de alimentação e treinamento serão conduzidos simultaneamente. O controle do consumo de dieta será feito em dias alternados e a evolução ponderal, semanalmente.

3. Após cada período de treinamento de três etapas, submeter os animais a teste de exaustão em esteira e determinar os pontos de exaustão em cada grupo, comparando os desempenhos físicos.

4. Avaliar o protocolo de treinamento com relação à sua duração máxima necessária para se obter um bom rendimento físico do animal.

5. Retirar os órgãos gastrocnêmio, coração e fígado de todos os animais, findado um período de repouso de 48 horas após a exaustão, comparar a composição dos tecidos, os parâmetros bioquímicos e nutricionais dos grupos de ratos treinados e

sedentários, a saber: glicose sérica, insulina, lactato sangüíneo, albumina sérica, proteínas totais, glicogênio muscular, proteínas musculares, ácidos graxos livres, colesterol, frações lipoprotéicas e triacilgliceróis.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

1 REVISÃO DA LITERATURA

Durante o exercício físico, o corpo humano desenvolve mecanismos celulares e moleculares de adaptação aos estímulos (MAUGHAN *et al.*, 2000). Nos atletas, estes mecanismos de adaptação estão aumentados, devido à prática diária e constante de exercício físico, o qual gera estímulos que requerem respostas cada vez maiores e freqüentes. As alterações metabólicas do organismo e as modificações geradas pelo treinamento induzem respostas bioquímicas (enzimáticas) e fisiológicas (consumo de O_2) acima dos níveis de repouso, tais como alterações nos níveis de glicose plasmática, insulina e lactato muscular (MAUGHAN *et al.*, 2000; MANNINEN, 2004).

A musculatura esquelética possui como principais funções a produção de força para a locomoção, respiração, sustentação corporal e produção de calor. Para que ocorra a contração muscular deve haver a presença de proteínas celulares e energia, resultando no deslizamento da actina sobre a miosina, o que ocasiona contração muscular (POWERS; HOWLEY, 2000; GARRETT; KIRKENDALL, 2003). O músculo esquelético tem a capacidade de se adaptar às mudanças induzidas pelo treinamento físico. Sabe-se que a síntese de proteínas é aumentada durante a fase de recuperação de exercícios prolongados (PHILLIPS *et al.*, 1999; McARDLE; KATCH; KATCH, 2001). A extração de energia dos nutrientes armazenados e sua transferência final para as proteínas contráteis do músculo esquelético influenciam expressivamente a realização dos exercícios (McARDLE; KATCH; KATCH, 2001).

O atleta possui uma alimentação que varia de acordo com o tipo de atividade física, fase de treinamento e momento de ingestão, influenciando assim, o gasto energético e a necessidade de nutrientes. Normalmente esses indivíduos necessitam de uma maior quantidade de carboidratos, pois estes repõem o glicogênio muscular que é o principal substrato energético utilizado no início do exercício.

Os macronutrientes fornecem substratos para a oxidação e subseqüente formação de ATP, como por exemplo, moléculas de triacilgliceróis e de glicogênio armazenadas dentro das células musculares, glicose (derivada do glicogênio hepático) e ácidos graxos livres (provenientes dos triacilgliceróis do fígado e dos adipócitos) que penetram na corrente sangüínea para serem levados ao músculo ativo (IVY; KUO, 1998).

Durante o exercício físico, as vias anaeróbias utilizam fibras musculares brancas (denominadas fibras do tipo II), as quais são predominantemente glicolíticas e possuem reservas de glicogênio e creatinina fosfato maiores. Já, as vias aeróbicas utilizam as fibras vermelhas (denominas fibras do tipo I), as quais são predominantemente oxidativas e possuem maior reserva de lipídios e glicogênio. As fibras musculares utilizadas durante os exercícios vão sendo alternadas de acordo com o tipo de metabolismo energético predominante. Portanto, o tipo de treinamento determina as propriedades contráteis dos músculos, podendo conferir grande capacidade adaptativa à fibra muscular. Os músculos que possuem contração rápida como, o gastrocnêmico, capazes de produzir movimentos pouco repetitivos e rápidos de grande potência, utilizam carboidratos como principal fonte de energia. Os músculos de contração lenta, como o sóleo, são capazes de produzir movimentos repetitivos e lentos e utilizam lipídios e carboidratos como fonte de energia (IVY; KUO, 1998; NIELSEN *et al.,* 2001).

1.1 ATIVIDADE FÍSICA E INGESTÃO DE PROTEÍNA

O exercício exerce alguns efeitos altamente específicos sobre o metabolismo protéico do organismo, como por exemplo, os exercícios de resistência que elevam o conteúdo de proteínas musculares, principalmente aquelas envolvidas no metabolismo oxidativo, possuindo também alguns efeitos imediatos sobre o metabolismo protéico (LANCHA, 2004).

O corpo utiliza três sistemas de energia principais para a provisão da força muscular necessária ao exercício. O primeiro é o sistema do fosfageno que armazena energia das ligações de alta energia do trifosfato de adenosina e da fosfocreatina, ambos encontrados no interior das fibras musculares, sendo que esse sistema permite surtos muito intensos de energia por períodos de 10 a 15 segundos. O segundo é o sistema gicogênio-ácido láctico, o qual libera energia pela conversão do glicogênio em ácido láctico, podendo suprir energia com intensidade de cerca da metade do sistema fosfageno podendo assim sustentar a contração muscular máxima por períodos de 30 a 40 segundos. O último sistema é o aeróbico, que libera energia pela metabolização dos carboidratos, gorduras e proteínas, com o oxigênio. Esse sistema fornece energia com intensidade da ordem de um quarto do sistema fosfageno, mas por períodos limitados, de acordo com a disponibilidade dos nutrientes apropriados (GUYTON, 1981). Portanto, a intensidade e a duração do exercício são fatores determinantes na seleção do substrato energético para o corpo.

Para exercícios de curta duração e alta intensidade, o corpo utiliza os estoques de adenosina trifosfato (ATP) e creatina fosfato (CP). Para o exercício prolongado, usam-se carboidratos, lipídeos e proteínas. O trifosfato de adenosina (ATP) é o único combustível que pode ser usado diretamente pelo músculo esquelético para a contração. Esse estoque no

músculo é relativamente pequeno e por isso deve sofrer contínua ressíntese a partir de seus produtos de degradação: o difosfato de adenosina (ADP) e o monofosfato de adenosina (AMP) (LAYMAN, 1987).

Muitos estudos têm sido publicados nos últimos anos sobre o consumo de proteínas e sua relação com o exercício físico e estes trabalhos têm mostrado que a participação dos aminoácidos no metabolismo energético é mais importante do que inicialmente se pensou. Parece clara a necessidade que os praticantes de atividade física de resistência ou força precisem de um aporte protéico maior. Entretanto, mesmo sem haver definição das necessidades para esportistas sobre proteínas, muitos praticantes de atividade física no Brasil praticam uma alimentação excessivamente rica em proteínas, fazendo uso de suplementos (TIPTON *et al.*, 2004). Isto tem causado preocupação nas autoridades de saúde devido ao risco de problemas hepáticos e renais. Apesar dos indícios, até hoje há pouca evidência científica sobre a relação entre a dieta com alto teor protéico e os efeitos indesejáveis para o fígado e os rins.

Os aminoácidos não possuem a função de substrato energético, na mesma extensão que ocorre com os ácidos graxos, a glicose e o glicogênio, mas funcionam como fontes indiretas de energia, ou seja, como precursores dos intermediários do ciclo de Krebs (McARDLE; KATCH; KATCH, 2001). Observa-se que há mudanças nas concentrações de alguns aminoácidos livres no sangue devido à sua utilização na manutenção do alto fluxo do ciclo de Krebs (ácido cítrico) durante a atividade física. Com isso, ocorre um grande aumento na síntese de intermediários do ciclo de Krebs, o que permite uma alta taxa de oxidação aeróbia durante a atividade prolongada. A manutenção da síntese de intermediários do ciclo retarda a fadiga no músculo com alta depleção de glicogênio (WAGENMAKERS, 1998).

O músculo é o principal sítio de conversão das cadeias carbônicas dos aminoácidos em glutamina, diferente do que ocorre no fígado, onde a maioria dos aminoácidos são normalmente oxidados na célula muscular esquelética. Somente seis aminoácidos podem ser metabolizados, sendo estes os de cadeia ramificada (valina, isoleucina e leucina) e o glutamato, o aspartato e a alanina (WAGENMAKERS, 1998; MAUGHAN *et al.*, 2000; McARDLE; KATCH; KATCH, 2001; LANCHA, 2004). O exercício físico induz o aumento da concentração muscular de alguns aminoácidos, como a alanina, e diminuição de outros, como a leucina.

Até hoje os efeitos do exercício nas necessidades dietéticas de proteínas têm motivado controvérsia. Os estudos científicos vêm demonstrando que o desempenho e a saúde de atletas podem ser beneficiados com a modificação dietética, influenciando a resposta ao exercício de duas formas. Primeiro, o consumo inadequado de carboidratos causa depleção mais rápida do glicogênio muscular e hepático durante o exercício, contribuindo para uma maior utilização de proteínas como substrato energético. Isto pode ativar uma enzima limitante na oxidação de aminoácidos de cadeia ramificada, a cetoácido desidrogenase. Segundo, o alto consumo de proteínas pode promover um balanço de nitrogênio positivo e oferecer condições para a síntese protéica (LEMON, 1991; WEBB *et al*., 1993).

Para indivíduos sedentários, recomenda-se o consumo diário de proteínas entre 0,8 e 1,2g/kg de peso/dia. Para praticantes de exercícios físicos tem sido constatada uma maior necessidade de ingestão, pois, caso contrário, as proteínas seriam chamadas a suprirem parte do fornecimento de energia (CUKIER *et al*., 2005), incluindo a necessidade de síntese protéica muscular pós-exercício (CARVALHO, 2003). Segundo Lemon (1995), pessoas envolvidas em treinos de resistência necessitam de 1,2 a 1,4g de proteína por quilograma de

peso ao dia e atletas de força, de 1,6 a 1,7 g/kg peso/dia, sendo a ingestão após o exercício mais vantajosa para favorecer a recuperação e a síntese protéica muscular.

Segundo Van Loon *et al*. 2000b, o exercício físico exige um maior aporte protéico na dieta. Isso se deve à maior utilização de aminoácidos como fonte energética para o exercício. Na atividade física, a diminuição da disponibilidade de aminoácidos pode limitar o efeito estimulatório da insulina sobre a síntese protéica.

Uma sessão de exercícios de força aumenta a síntese e a degradação protéica pós-exercício, com menor extensão na degradação de proteína muscular, tendo como resultado um balanço protéico muscular menos negativo (BIOLO *et al.,* 1995). Ao mesmo tempo, verifica-se que a ingestão de aminoácidos isoladamente aumenta a taxa de síntese protéica muscular. O principal iniciador dessa síntese é a combinação de exercício de força com aumento da disponibilidade de aminoácidos (TIPTON *et al.*, 2003; TIPTON *et al.*, 2004a; WOLFE, 2006). O perfil de aminoácidos presentes na proteína também é um fator relevante na análise dos efeitos da ingestão protéica sobre o balanço protéico muscular pós-exercícios de força, uma vez que aminoácidos indispensáveis apresentam pequena contribuição para esse processo (BORSHEIM *et al.*, 2002a).

Estudos em humanos demonstram que o efeito anabólico da ingestão de proteínas está relacionado ao aumento da concentração de aminoácidos livres no sangue, que resulta em maior disponibilidade de aminoácidos para o músculo esquelético. Em indivíduos cuja capacidade de anabolismo protéico foi reduzida pela ausência de ingestão de energia protéica, a ingestão de proteínas *fast* (proteínas do soro de leite ou mistura de aminoácidos) induziu significativo aumento da concentração de aminoácidos livres no sangue. Isto resultou em considerável aumento do catabolismo de aminoácidos e na estimulação temporária da síntese protéica (MOSONI; MIRAND, 2003).

Por outro lado, quando aminoácidos forem fornecidos de modo mais contínuo, ou seja, por meio da ingestão de caseína ou em pequenas refeições freqüentes, verificou-se que o catabolismo de aminoácidos não foi estimulado, uma vez que o aumento da concentração de aminoácidos no sangue se apresenta de forma moderada (BOIRIE *et al.*, 1997). Observou-se também menor degradação protéica corporal e maior retenção de aminoácidos oriundos da dieta no fígado com a ingestão de proteínas *slow*, em comparação às do tipo *fast*. A ingestão de energia não-protéica, junto com proteína, induziu uma diferença menor entre proteínas *slow* e *fast*, bem seja porque as taxas de digestão diferem menos ou porque a energia adicional reduz as diferenças no catabolismo de aminoácidos (DANGIN *et al.,* 2002; MOSONI; MIRAND, 2003).

Van Loon *et al.* (2000b) estudaram diferentes tipos de dietas em humanos, sendo estas uma mistura de hidrolisado protéico e proteína intacta, mistura de aminoácidos livres e hidrolisado, contra um grupo controle que ingeria apenas carboidrato. A ingestão da combinação de aminoácidos resultou em 100% de aumento do efeito insulinotrópico, em comparação com a ingestão de apenas carboidratos. A administração de leucina e fenilalanina, em combinação com o proteolisado, promoveu efeito similar, sem causar desconfortos gastrointestinais, como havia ocorrido na administração de aminoácidos livres.

Tipton *et al.* (2004a) verificaram que o uso de proteínas do leite após o exercício, promove o aumento do balanço protéico muscular em indivíduos saudáveis submetidos ao teste de resistência de extensão de pernas. A mudança do balanço protéico de negativo para positivo foi alcançada tanto com caseína quanto com proteínas do soro, mas o pico de leucina, considerada como parâmetro do metabolismo protéico, foi diferente para essas duas fontes protéicas. As proteínas do soro de leite apresentaram uma resposta mais rápida

de aparecimento da leucina no sangue, do que a caseína, demonstrando a sua eficiência em alcançar rapidamente a musculatura.

1.2 PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

Há muito tempo, as proteínas do soro de leite são utilizadas na alimentação humana. Por essa razão e, devido a estas serem de fácil digestão e de alto valor nutricional, seus efeitos têm sido objeto de grande interesse científico e comercial. Essas proteínas contêm aminoácidos nutricionalmente indispensáveis, em quantidades e proporções acima do adequado para o organismo em crescimento (WALZEM *et al.*, 2002), sendo úteis para o enriquecimento de várias fontes de proteína vegetal como milho e glúten de trigo. Entre essas proteínas estão: a caseína, correspondendo a 80% das proteínas totais do leite e, as proteínas do soro (≈20%), incluindo β-lactoglobulina, α-lactalbumina, lactoferrina, imunoglobulinas e o glicomacropeptídeo (MARSHALL, 2004; WONG *et al.*, 1996).

Dentre as principais proteínas do soro de leite, a β-lactoglobulina, corresponde à metade do total de proteínas do soro (45-57%), representando no leite bovino cerca de 3,2 g/L, sendo resistente a ação dos ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago. Já a α-lactalbumina, que corresponde a 15-25%, é rica em triptofano sendo muito utilizada na produção de fórmulas infantis devido à sua similaridade estrutural com a proteína análoga do leite materno. Essas duas proteínas são consideradas fontes de aminoácidos indispensáveis, incluindo os de cadeia ramificada (MARSHALL, 2004; HARAGUCHI *et al.,* 2006).

As proteínas do soro de leite, *whey protein*, mais propriamente conhecidas como sendo do 'soro de queijo', são as proteínas solúveis que compõem o resíduo da produção do

queijo (HARAGUCHI *et al*., 2006). Este subproduto se encontra no mercado na forma de concentrados protéicos, isolados protéicos ou como ingredientes de muitos produtos formulados, geralmente sem a lactose e os minerais, que são os outros componentes majoritários do resíduo. Outros produtos vendidos como suplementos ricos em aminoácidos, também elaborados a partir de proteínas de soro de leite, são os hidrolisados obtidos por tratamento enzimático dos concentrados protéicos.

As proteínas do soro de leite são consideradas nutrientes que possuem atividade funcional, capazes de modular algumas respostas fisiológicas do organismo animal. Estudos realizados em animais, humanos e células *in vitro* têm comprovado que as proteínas do soro do leite possuem eficácia na modulação do metabolismo, aumentando a capacidade do combate a infecções e processos inflamatórios, a capacidade imunomoduladora, estimulando a absorção e função intestinal, aumentando a atividade antibacteriana e antiviral, síntese de hormônios, absorção de minerais e a ação anticancerígena, além do efeito citoprotetor detectado a partir da promoção da síntese de glutationa (SGARBIERI; PACHECO, 1999; PACHECO; BIGHETTI, ANTÔNIO *et al.,* 2006). Essas proteínas solúveis do soro, apesar de serem ricas em aminoácidos essenciais, como lisina, metionina e triptofano (HERMANSE *et al*., 1994), foram consideradas por muito tempo como resíduo de alto potencial poluidor da indústria de laticínios (JAYAPRAKASHA; BRUECKNER, 1999).

As proteínas do soro de leite e caseína apresentam diferentes propriedades digestivas. A ingestão de proteínas do soro de leite leva ao aumento rápido no nível de aminoácidos do plasma sangüíneo e um concomitante aumento na síntese protéica apresentando, portanto, um esvaziamento gástrico mais rápido em relação à caseína, conhecida por formar coágulos no estômago e demorar mais tempo para ser digerida e entrar no duodeno. É por essa razão

que a caseína é denominada de proteína *slow*, enquanto que as proteínas do soro leite, de proteínas *fast*. Aminoácidos provenientes da caseína aparecem no sangue mais lentamente e o pico aminoacídico sangüíneo apresenta menor magnitude, apesar de a resposta perdurar por mais tempo, em comparação à ingestão de proteínas do soro do leite (GRIMBLE; GRIMBLE, 1998; MOSONI; MIRAND, 2003, TIPTON *et al.*, 2004; MANNINEN, 2006).

A concentração de cada aminoácido na proteína também pode influenciar o *turnover* protéico. A insulina, que inibe a proteólise, pode ter sua concentração plasmática influenciada pela concentração plasmática de aminoácidos específicos. A caseína e as proteínas do soro, apesar de ambas serem derivadas do leite, possuem diferentes proporções de aminoácidos. A alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada nas proteínas do soro produz um efeito sinergista, estimulando por um lado, a secreção de insulina. Em adição, a porcentagem de aminoácidos que estimulam a secreção de glucagon, que tem efeito catabólico, é menor nestas proteínas do que na caseína (FRÜNBECK, 1998).

1.2.1 HIDROLISADO PROTEÍCO

Com a hidrólise de proteínas são formados agregados de peso molecular variável, como peptonas, misturas de peptídeos e aminoácidos livres. A hidrólise de proteínas pode ser executada por enzimas, ácido ou base forte, mas o uso de enzimas é o método preferido para a obtenção de hidrolisados para aplicações nutricionais (LAHL; BRAUN, 1994), já que a clivagem específica de ligações peptídicas pelas enzimas tem em seu produto final mais peptídeos e aminoácidos livres (MARSHALL, 2004). Já os processos de hidrólise com ácidos ou base podem converter a forma L dos aminoácidos na forma D, que é de baixa atividade nutricional e potencialmente tóxica (LAHL; BRAUN, 1994). Outra

desvantagem importante desse processo ocorre quando a hidrólise com ácido, oxida cisteína e metionina, destrói serina e treonina, e converte glutamina e asparagina em glutamato e aspartato, respectivamente, reduzindo a qualidade da proteína e o valor biológico (BUCCI; UNLU, 2000).

O consumo de proteína hidrolisada de soro de leite pode preservar a concentração de glicose e albumina, bem como o teor de glicogênio muscular após esforço físico exaustivo. Alguns estudos avaliam o tipo, a forma e a velocidade com que a proteínas são digeridas e seus aminoácidos absorvidos, bem como o tipo de peptídeos gerados, em função da composição da proteína, pois pode ter significativas influências no metabolismo protéico.

Estudo com ratos alimentados com proteína hidrolisada mostrou diferenças metabólicas, apesar de não terem sido encontradas alterações no rendimento do esforço físico (TASSI *et al.*, 1998). Isso nos faz acreditar na possibilidade de haver maior capacidade de recuperação do individuo alimentado com oligopeptídeos, ao invés da proteína intacta. A explicação para os efeitos fisiológicos resultantes da ingestão destas proteínas provavelmente está na velocidade com que a proteína pré-hidrolisada é digerida e absorvida pelo intestino. Já, quando o grau de hidrolise é alto, obtém-se um produto com alta concentração de aminoácidos livres e de mais lenta absorção em relação a produtos com menor grau de hidrólise. Este limite para o grau de hidrólise ainda não está esclarecido.

Tassi *et al*. (1998) verificaram que os animais alimentados com α-lactalbumina mantiveram uma glicemia mais estável, apresentaram maior concentração de albumina sanguínea e maior reserva de glicogênio muscular ao final da atividade física até a exaustão. Ramos (2001), trabalhando com hidrolisado protéico de soro de leite com grau de hidrólise alto (30%) não observou o mesmo efeito, conforme era esperado para proteínas de

mais rápida absorção, devido provavelmente a concentrações muito elevadas de aminoácidos livres. Isso sugere que os aminoácidos livres, estando em maior quantidade, saturaram os sítios de absorção e tiveram maior dificuldade em atravessar a mucosa intestinal, em relação aos peptídeos, apresentando portanto, uma menor eficiência protéica.

Em concordância com o anterior, Van Loon *et al*. (2000a) compararam dietas com a proteína intacta e parcialmente hidrolisada e constataram que duas horas após a ingestão das proteínas, os níveis de aminoácidos plasmáticos eram inferiores para os grupos que ingeriram a forma intacta da proteína.

Tipton *et al.* (2004) avaliaram o efeito da ingestão de uma bebida contendo 20g de caseína ou 20g de proteínas do soro de leite sobre o anabolismo protéico muscular, uma hora após sessão de exercícios de força. Verificaram que a ingestão aguda de ambas as proteínas pós-exercício resultou em aumentos similares no balanço protéico muscular, apesar de haver aumentos diferenciados da concentração sangüínea de aminoácidos. Portanto, a ingestão de caseína e proteínas do soro de leite, após o exercício de força é capaz de estimular o balanço protéico muscular por meio do fornecimento de aminoácidos indispensáveis, ao passo que o consumo das proteínas do soro representa uma estratégia nutricional efetiva para promover a hipertrofia muscular.

Em estudo realizado por Kawase *et al*. (2000), em voluntários hipercolesterolêmicos que consumiram, ora caseína, ora hidrolisado de soro do de leite, os autores observaram que os sujeitos que consumiram o hidrolisado apresentaram significativa redução na concentração de triacilgliceróis, elevação da concentração de HDL colesterol e diminuição do risco cardíaco.

Por outro lado, pesquisas atuais têm mostrado a influência do hidrolisado do soro de leite no sistema cardiovascular, melhorando a ação inibitória da enzima ECA (enzima

conversora de angiotensina). Essa ação está relacionada à inibição enzimática por competição, em virtude da estrutura e geometria molecular desses peptídeos. Assim, na presença de certos peptídeos derivados do soro de leite, a ECA não converte a angiotensina I em angiotensina II, molécula de alto potencial vasoconstritor que inibe a ação do vasodilatador bradicinina, sendo esse um processo importante no controle da hipertensão (MARSHALL, 2004; SGARBIERI, 2004; SILVA; MALCATA, 2005; HARAGUCHI *et al.*, 2006).

Portanto, o uso de hidrolisados protéicos do soro de leite tem recebido atenção especial não somente da indústria alimentícia, devido as suas propriedades funcionais, como também tem sido motivo de estudo relacionados à fisiologia animal.

1.3 GLICOSE SÉRICA

Considerando a sua massa, o músculo esquelético é o principal consumidor de glicose do corpo, imediatamente após a absorção, assim como durante o exercício. A glicose é carreada para dentro do tecido através da difusão facilitada pelos dois transportadores de glicose, GLUT1 e GLUT4, os quais transportam a glicose para dentro do miocito esquelético. Os transportadores GLUT1 e o GLUT3 estão restritos à superfície da célula, enquanto que o GLUT4 é mais abundante, se encontra seqüestrado intracelularmente, mas é rapidamente translocado na direção da superfície da célula em resposta à insulina, o exercício físico ou a hipóxia (MANNIEN, 2004).

O controle da concentração de glicose sangüínea é feito também pela produção de insulina pelo pâncreas. Quando há alta concentração de glicose no sangue, a insulina promove o transporte rápido de glicose para dentro da célula, além do mecanismo tampão

hepático. Quando a concentração de glicose é baixa, o pâncreas é estimulado a secretar glucagon, desdobrando o glicogênio hepático em glicose. No estado pós-prandial, a insulina promove a fixação de glicose pelo músculo e a estocagem como glicogênio. Durante o exercício prolongado, a glicemia é mantida principalmente pela gliconeogênese que utiliza os carbonos de alguns aminoácidos para formar glicose prevenindo a hipoglicemia (GUYTON, 1998; WOJTASZEWSKY *et al.,* 2000).

Durante o exercício físico prolongado ocorre mudança do combustível utilizado pelo organismo, constituído inicialmente por carboidratos, para a gordura. O declínio na utilização do carboidrato durante o exercício ocorre devido, em parte, ao rápido declínio de glicose muscular. Portanto, o treinamento regular tende a aumentar o tamanho das reservas de glicogênio muscular (McARDLE; KATCH; KATK, 2001).

Tassi *et al.* (1998) realizaram um estudo com ratos Wistar machos utilizando três tipos de dieta, as quais foram formuladas com 16% de α-lactalbumina, 16% de hidrolisado de α-lactoalbumina e o grupo controle que recebia 16% de caseína, todas como única fonte protéica. Os ratos foram divididos em grupos sedentários e treinados (natação) e, finalmente levados à exaustão. Imediatamente após a exaustão, os autores relataram que os níveis de glicemia eram menores para os animais que consumiram as proteínas inteiras. Ainda, com relação ao nível de atividade, a tendência foi de as glicemias finais serem superiores nos animais que consumiram o hidrolisado, independente de serem treinados ou sedentários.

Pimenta *et al*. (2006) estudaram o efeito de duas diferentes dietas, uma contendo isolado protéico do soro de leite de vaca e a outra com hidrolisado enzimático das proteínas do soro, em ratos sedentários, treinados em esteira e treinados que foram levados finalmente à exaustão. As diferenças observadas entre as dietas, após 48 horas de repouso,

ainda foram significativas para o parâmetro de glicemia, embora menos expressivas do que quando determinado no ponto de exaustão.

Ramos (2001) não verificou diferença significativa para os níveis de glicose (24 horas após exaustão), entre os grupos de ratos em treinamento físico submetidos à dieta com hidrolisado de grau de hidrolise alto e proteína do soro de leite.

1.4 INSULINA

É um hormônio protéico, secretado pelas células β do pâncreas, que após estímulo da glicemia sinaliza o estado alimentado. A insulina, pela sua função anabólica, estimula a síntese de nutrientes energéticos (glicogênio e triacilglicerol) e a síntese de proteínas. A insulina no fígado inibe a glicogenólise; no músculo, ela aumenta a síntese de glicogênio e, no tecido adiposo ela estimula a síntese de triacilgleceróis. A insulina aumenta a captação de glicose no músculo e no tecido adiposo, resultando em maior concentração de glicose citoplasmática, estimulando a síntese e o armazenamento de glicogênio e triacilgliceróis nestes tecidos, respectivamente. A insulina também estimula a síntese protéica e inibe a degradação de proteínas intracelulares (SILVERTHORN; OBER; GARRISO, 2003).

Considerando que o aumento da concentração plasmática de insulina aparentemente inibe a degradação protéica muscular pós-exercício de força, a adição de carboidratos na refeição contento proteínas pode aumentar o anabolismo muscular (KAASTRA *et al.*, 2006). Esse efeito é parcialmente devido a alterações estimuladas pela insulina no processo de captação de aminoácidos e síntese protéica no tecido muscular. Assim, o consumo concomitante de proteína e carboidratos resulta em maiores efeitos sobre o balanço protéico muscular (MILLER *et al.*, 2003; TIPTON; WOLF, 2004; MANNINEN, 2006).

Borsheim *et al.* (2004b) mostraram que o balanço protéico muscular permaneceu negativo após exercício de resistência quando somente carboidrato foi ingerido. Em contraste, a ingestão de aminoácidos somente aumentou significativamente o anabolismo protéico muscular após exercício de resistência. Os autores concluem que o consumo de ambos, aminoácido e carboidrato, resulta em efeitos ótimos no anabolismo protéico muscular, sugerindo um efeito interativo entre insulina, disponibilidade de aminoácidos e exercício de resistência. Também, é bem estabelecido que o efeito estimulador dos aminoácidos na síntese protéica muscular é melhor após o exercício.

Estudo realizado por Calbet e McLean (2002) teve como objetivo determinar os efeitos de diferentes soluções contendo proteína do soro de leite (ou hidrolisado) na resposta insulínica e na disponibilidade de aminoácidos em humanos saudáveis. Quatro diferentes soluções de 600 mL foram administradas. Para o experimento, uma solução continha somente glicose (25g/L), enquanto que três soluções adicionais com a mesma quantidade de glicose, mais proteína (0,25 g/kg massa corporal). Foi utilizada proteína do soro de leite de vaca e seu hidrolisado. Eles observaram que a ingestão conjunta de glicose e proteína hidrolisada resultou no aumento sinérgico e rápido da insulina plasmática. A proteína hidrolisada estimulou um aumento na insulina plasmática que foi de 2 a 4 vezes maior do que aquela produzida pela solução de proteína do leite intacta e a glicose.

1.5 LACTATO SANGÜÍNEO

Nas fases predominantemente anaeróbias ocorre a formação de lactato que é um metabólito celular, que posteriormente é liberado na corrente sanguínea (WEINECK, 1991). Sua velocidade de produção é dependente do tipo, duração e intensidade do

exercício, assim como, da condição de treinamento do indivíduo (McARDLE; KATCH; KATCH, 1998). Normalmente, quanto maior a velocidade de produção do lactato mais difícil se torna a sua remoção e, portanto, começa a ocorrer o acúmulo desse metabólito na musculatura e no sangue. Em concentrações elevadas, o ácido lático ao ser formado libera H^+, causando acidose e conduzindo à fadiga, e consequentemente à interrupção do exercício (FOX; MATHEWS, 1983).

A partir de amostras sangüíneas, é possível perceber que, no início do exercício existe uma elevação da concentração de lactato, até que o metabolismo aeróbio tenha condições de suprir as necessidades energéticas do exercício. Após esse ponto, em exercício moderado, a concentração de lactato se estabiliza, sugerindo que a sua produção muscular e remoção do sangue circulante encontram-se em equilíbrio. Esta fase de equilíbrio entre a produção e remoção de lactato, tem sido denominada "máxima fase estável" de lactato, sendo que o metabolismo aeróbio é o grande responsável pela energia necessária ao esforço (DENADAI, 1995). Quando o exercício se prolonga, porém, a participação anaeróbia glicolítica torna-se novamente necessária, a produção de lactato volta a se intensificar e seu acúmulo agora ocorre de forma exponencial (MCARDLE; KACTH; KACTH, 1998). Este ponto é denominado limiar de lactato e gera discussão a respeito da concentração em que ocorre. Tem sido aceita a concentração de 5,5 mM em ratos para limiar de lactato, porém, estudos procuram ainda determinar melhor esse ponto, especialmente em ratos (GOBATTO, SIBUYA *et al.,* 2001; PAPOTI *et al.,* 2003).

O acúmulo de lactato durante o exercício intenso e prolongado ocasiona no músculo uma diminuição do pH, fato associado com a inibição da enzima fosfofrutoquinase e redução na glicólise. Nesse mecanismo de inibição da glicólise pelo decréscimo do pH previne-se a acidez dentro da célula, a qual pode ser letal para a mesma ou contribuir com o

processo de fadiga precoce (SAHLIN, 1992; ROSSI; TIRAPEGUI, 1999). Esse acúmulo também é associado à diminuição na geração máxima de força, e é considerado ser um dos principais agentes fadigantes (McARDLE *et al.,* 1998). Já a acidose prejudica o processo de contração muscular por meio de alguns mecanismos pelo aumento na concentração de íons hidrogênio, que interferem no suprimento de energia, afetando uma ou diversas etapas do processo de contração. Outra hipótese seria o aumento da concentração de íons hidrogênio, interferindo diretamente no processo de contração, ou no processo acoplado de excitação e contração (SAHLIN, 1992). A avaliação do lactato plasmático é uma das ferramentas utilizadas para avaliar a transição do trabalho aeróbio para o anaeróbio, e a percepção da fadiga (BIANCHI; GROSSI; BARGOSSI, 1997; ROSSI; TIRAPEGUI, 1999).

A elevação do lactato tem sido listada dentre as causas que acabam por determinar a fadiga muscular no decorrer do exercício (MUCKE; JOLLNER, 1986; PLISK, 1991).

A redução dos níveis de ácido lático, por conseguinte, poderia ser benéfica para o desempenho do indivíduo no exercício. O treinamento físico, como demonstrado classicamente na literatura, determina uma menor elevação de seus níveis para uma mesma carga e intensidade de atividade (MAASEN; BUSSE, 1989). Alguns mecanismos têm sido sugeridos para justificar essa adaptação. Entretanto, têm sido encontrados níveis de lactato sérico elevados, mesmo em indivíduos treinados, na condição de exercício agudo, tendo sido justificados por alguns autores como sendo decorrentes da capacidade aumentada de transporte do lactato da célula para o meio intravascular (OYONO; ENGUELE *et al*, 1990; GOBATTO, 1993).

Com a intensificação do exercício, hidrogênios são retirados do substrato de carboidrato com um maior ritmo do que sua oxidação na cadeia respiratória. Para prosseguir com o metabolismo energético, o excesso de hidrogênio não-oxidativo deve ser

aceito por um substrato diferente do oxigênio. Uma molécula de piruvato, composto intermediário formado no catabolismo dos carboidratos, aceita temporariamente um par de hidrogênios (elétrons). Um novo composto denominado ácido láctico é formado quando o piruvato aceita os hidrogênios adicionais. Portanto, o exercício mais intenso acarreta um maior fluxo de hidrogênio em excesso para o piruvato, com a concentração de ácido láctico aumentada rapidamente dentro do músculo ativo. Durante a recuperação, o excesso de hidrogênios no ácido láctico, não oxidados, a fim de formar de novo uma molécula de piruvato (denominada lactato em sua forma tamponada no sangue). A enzima desidrogenase láctica facilita essa reação (McARDLE; KATCH; KATCH, 2001).

O ácido láctico não deve ser considerado um resíduo do desgaste metabólico. Ao contrário, ele proporciona uma fonte valiosa de energia química que se acumula no corpo durante o exercício físico intenso. Quando se torna disponível novamente uma quantidade suficiente de oxigênio durante a recuperação, ou quando o ritmo do exercício se torna mais lento, o NAD^+ capta os hidrogênios do lactato. Portanto, o lactato no sangue circulante passa a constituir uma reserva temporária de energia, mediada pelo seu retorno para piruvato. A energia potencial nas moléculas de lactato e de piruvato formadas durante o exercício pode ser aproveitada na medida em que seus esqueletos carbônicos podem entrar no ciclo de Cori e serem utilizados para a síntese de glicose (JENTJENS; JEUKENDRUP, 2003).

Tassi *et al.* (1998) constataram que ratos treinados apresentavam menores concentrações de lactato que os ratos sedentários, quando levados à exaustão. Na ausência do treinamento, os animais sedentários atingiram a exaustão em menor tempo, não somente pela obvia falta de condicionamento, mas também possivelmente pelos elevados níveis de lactato no organismo. Por outro lado, esse resultado pode ter sido em parte devido à maior

utilização de ácidos graxos livres em resposta ao treinamento, o que leva a uma menor utilização do glicogênio e, portanto menor concentração de lactato sangüíneo (JENTJENS; JEUKENDRUP, 2003).

Adicionalmente, Pimenta *et al.* (2006) verificaram que o consumo da dieta contendo hidrolisado protéico de soro de leite, como única fonte de proteínas, resultou em menor concentração de lactato sangüíneo, quando comparado com a proteína intacta. Já, considerando os níveis de atividade física, foi encontrada diferença significativa entre as dietas, quando os ratos foram levados à exaustão, confirmando assim a influência do tipo de proteína na dieta e a elevação dos níveis de lactato sangüíneo. Não houve diferença significativa entre os sedentários e treinados sem exaustão, conforme era esperado.

1.6 GLICOGÊNIO

O glicogênio é um polímero de unidades de D-glicose, unidas por ligações α (1-4), com ramificações glicosídicas do tipo α (1-6), a cada 8 a 14 resíduos. Esse polímero tem a função de retirar os excessos de glicose da circulação e armazena-la para uso metabólico posterior, quando os níveis de glicemia diminuem para menos que o normal, sendo esse um processo de liberação constante para tecidos como o cérebro e as células vermelhas do sangue (VOET; VOET, 1990). Os estoques de glicose na forma de glicogênio são fisicamente limitados, visto que as moléculas do polímero devem permanecer altamente hidratadas (LANCHA, 2004). A capacidade do fígado de estocar glicogênio é suficiente apenas para suprir o cérebro com glicose por um período de aproximadamente meio dia, ou seja, até 10% do glicogênio em peso e as células musculares até 1 a 2% do seu peso (VOET; VOET, 1990).

Do ponto de vista quantitativo, o glicogênio muscular representa o combustível mais importante durante exercícios prolongados, de intensidade entre moderado e alto. A função do glicogênio muscular é servir como reserva de combustível para a síntese de ATP durante a contração das fibras, enquanto que a função do glicogênio hepático é manter a concentração de glicose no sangue (glicemia), especialmente nos estágios iniciais do jejum. A síntese de glicogênio muscular esquelético é um processo relativamente lento e a restauração completa pós-exercício dos estoques de glicogênio geralmente leva até 24 horas. A velocidade da síntese depende do grau de depleção do glicogênio e pode ser otimizada pela ingestão adequada de quantidade de carboidrato (KAASTRA *et al.*, 2006).

A síntese de glicogênio muscular ocorre em duas fases distintas. A primeira ocorre logo após o exercício para repor o glicogênio perdido e parece ser independente dos níveis circulantes de insulina, persistindo por aproximadamente 30-60 minutos (JENTJENS; JEUKENDRUP, 2003). Este primeiro estágio é caracterizado pela alta taxa de síntese de glicogênio, que é geralmente atribuída à translocação induzida pela contração do GLUT4 para o sarcolema, resultando em um aumento da permeabilidade da membrana muscular a glicose. Combinado com a ativação da síntese de glicogênio, isto leva a uma alta taxa inicial de síntese de glicogênio muscular (ZACHWIEJA *et al.*, 1991). A segunda fase contrasta com a primeira no sentido de que a taxa de síntese de glicogênio muscular depende dos níveis de insulina em circulação e é aproximadamente 10-30% mais baixa, quando comparada à primeira (JENTJENS; JEUKENDRUP, 2003). Isto explica relatos de que a ingestão de proteína e/ou aminoácidos livres, mais carboidrato (variando de 0,4 a 1 g de carboidrato/kg/h), acelera a síntese de glicogênio muscular após o exercício, em relação à ingestão somente de carboidrato (VAN HALL *et al.*, 2000; VAN LOON *et al.,* 2000 c;

IVY *et al.*, 2002). Estas observações são atribuídas a maior resposta insulínica, seguida da ingestão combinada de carboidrato e proteína.

Vários estudos mostraram que a fadiga aumenta e consequentemente diminui a reserva de glicogênio, demonstrando que a concentração inicial de glicogênio muscular está inversamente relacionada ao desempenho físico e à resistência aeróbica, sendo impossível manter alta intensidade de exercício uma vez que as reservas de glicogênio muscular estejam depletadas (HANSEN *et al.,* 1998; VAN LOON *et al.,* 2000 c).

Zawadzki *et al.* (1992) relataram que o consumo de proteína intacta adicionada a um carboidrato resulta em taxa de síntese de glicogênio mais alta do que aquela obtida com a ingestão de apenas o carboidrato, em situação pós-exercício (taxa de 0,8g/kg/h). Isto foi explicado pelo aumento adicional observado das concentrações de insulina no plasma, após a ingestão da mistura de carboidrato e proteína. Elevadas concentrações de insulina podem levar ao aumento na captação de glicose e o consequente aumento na atividade de síntese de glicogênio, que é o fator determinante da taxa de síntese de glicogênio quando o estoque de substrato é adequado.

1.7 PROTEÍNAS SÉRICAS E MUSCULARES

Tassi *et al.* (1998) realizaram estudo com ratos Wistar machos, os quais foram treinados e submetidos a dietas com 16% de α-lactalbumina, 16% de hidrolisado de α-lactalbumina e o grupo controle que recebia 16% de caseína como única fonte protéica. Observou-se que a dieta que continha proteína parcialmente hidrolisada foi mais capaz de preservar os níveis de albumina sérica após a exaustão. Isto demonstra a vantagem da proteína parcialmente hidrolisada, em relação às demais.

Pimenta *et al.* (2006) também verificaram que a dieta com hidrolisado foi melhor em manter os níveis de albumina sérica do que com o isolado protéico, mesmo após repouso de 48 horas. Observou-se também que os ratos que consumiram a dieta com hidrolisado acumularam maiores reservas de albumina sérica do que aqueles que consumiram o isolado, independente de serem treinados ou não, demonstrando que o consumo do hidrolisado foi altamente favorável à manutenção de melhores estoques de albumina sérica. Quanto às proteínas séricas totais observou-se que a dieta com hidrolisado tiveram o efeito de preservar os níveis durante a exaustão, ao passo que com a dieta contendo o isolado os animais não alcançaram este benefício.

Já quanto ao teor protéico do músculo gastrocnêmio, não foi possível verificar diferenças significativas entre as dietas, apesar de que os valores para os ratos que consumiram o hidrolisado terem sido superiores aos dos ratos com o isolado protéico.

Ramos (2001) não observou diferenças significativas no conteúdo muscular de proteínas para os grupos que consumiam dietas com isolado protéico do soro do leite e seu hidrolisado enzimático com alto grau de hidrólise e nem entre os diferentes níveis de atividade física.

1.8 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos podem ser encontrados no organismo na forma livre (não esterificada) ou como acilésteres graxos, como os triacilgliceróis. Os ácidos graxos esterificados em forma de triacilgliceróis servem como principais reservas de energia no corpo. Já os ácidos graxos livres plasmáticos (transportados pela albumina sérica) seguem uma rota partindo das lipoproteínas circulantes ou dos triacilgliceróis do tecido adiposo, até

a maioria dos tecidos onde podem ser oxidados nas mitocôndrias de tecidos como músculo e fígado para fornecer energia. São precursores de muitos compostos, como, fosfolipídios, prostaglandinas, ésteres de colesterila, glicolipídios e esfingolipídios.

Os ácidos graxos essenciais, denominados de ácido linoléico (ômega 6) e ácido α-linolênico (ômega 3), não podem ser sintetizados pelo organismo e possuem como principal papel ser componentes de todas as membranas celulares. O organismo pode elongar o a cadeia do ácido linoléico, produzindo outros dois ácidos graxos essenciais: ácido eicosapentanóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA). Estes ácidos são encontrados em óleos de peixe de água salgada. Os ácidos graxos essenciais são necessários para a formação de prostaglandinas ou eicosanóides, que atuam de maneira similar aos hormônios e são responsáveis por várias funções como: produção dos hormônios esteróides, regulação da pressão sangüínea, respostas a alergias, inflamação, transmissões nervosas (NESTEL *et al*., 2002).

As gorduras intracelulares e extracelulares (ácidos graxos livres, triacilgliceróis intramusculares e triacilgliceróis) no plasma circulante, ligados às lipoproteínas proporcionam entre 30 e 80% da energia para a atividade física. Essa contribuição energética da gordura depende do atual estado nutricional e da aptidão da pessoa e da intensidade e duração do exercício. A utilização da gordura para a obtenção de energia no exercício leve e moderado varia também paralelamente com o fluxo sangüíneo através do tecido adiposo (um aumento de três vezes na taxa não é incomum) e através do músculo ativo. O tecido adiposo libera mais ácidos graxos para serem fornecidos ao músculo ativo quando o fluxo sangüíneo aumenta com o exercício. Assim sendo, quantidades relativamente maiores de gordura dos depósitos de tecidos adiposo participam no

metabolismo energético. A contribuição energética dos triacilgliceróis intramusculares varia provavelmente entre 15 e 35% com atletas treinados em *endurance* utilizando a maior quantidade de gordura muscular (McARDLE; KATCH; KATCH, 2001).

A disponibilidade de carboidratos também influencia, de forma inversa, a utilização de gordura para a obtenção de energia. Com reservas adequadas, os carboidratos, passam a constituir o combustível preferido, particularmente durante o exercício aeróbico de alta intensidade. Essa preferência resulta da utilização rápida dos carboidratos para a obtenção de energia, em comparação com a taxa de 30 a 50% mais baixa de fracionamento das gorduras (McARDLE; KATCH; KATCH, 2001).

1.9 COLESTEROL E TRIACILGLICERÓIS NO SANGUE

Os principais lipídios circulantes no sangue humano são: colesterol livre, triacilgliceróis, fosfolipídios e ésteres de colesterol, que são transportados na forma de corpúsculos esféricos complexos de tamanho e densidade variável, que são as lipoproteínas (MAHAN; STUMP, 2002).

Os lipídios são macromoléculas complexas que contém núcleo hidrofóbico onde se encontram ésteres de colesterol e triacilgliceróis, envolvidos por uma camada de colesterol livre, proteínas e fosfolipídios denominados de apolipoproteínas. São classificadas em: lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e quilomícrons. Os quilomícrons são chamados de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, de maior tamanho e menor densidade, são os principais carreadores de gordura derivada da dieta. As VLDL são carreadores dos triacilgliceróis formados no fígado a partir de carboidrato; as LDL são ricas em colesterol,

sendo responsável por cerca de 65% dos níveis de colesterol total no sangue, tem significado especial na formação de arteriosclerose, as quais, associadas a altos níveis séricos de colesterol, alteram as paredes arteriais; já as HDL têm como função transportar o excesso de colesterol das membranas para o fígado onde pode ser convertido ou degradado em ácidos biliares, elas reduzem os ésteres de colesterol celular nas células espumosas devido a função anti-aterogênica (KITAYAMA *et al.*, 2006).

O colesterol está presente em todos os tecidos animais, em especial nos tecidos nervosos. É um componente essencial das membranas celulares, nas quais regula a fluidez. As formas de armazenamento e transporte são seus ésteres de ácidos graxos, ele é sintetizado na maioria dos tecidos, particularmente no fígado e na mucosa intestinal. No ser humano ele é derivado da dieta e da síntese endógena.

Kajikama *et al*. (1994) investigaram o efeito das proteínas do soro de leite e da caseína na formação das "células espumosas" e verificaram que houve inibição do acúmulo de ésteres de colesterol nos macrófagos em maior intensidade quando se utilizou a caseína, eles atribuíram estes efeitos principalmente a lactoferrina.

Os triacilgliceróis são os principais lipídios ingeridos e armazenados dentro do corpo, no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético. Os triacilgliceróis ingeridos são transportados na forma de lipoproteínas complexas.

Existe evidência de que o tipo de proteína dietética pode afetar as atividades da enzima lipogênica. Morifuji; Aoyama (2002) concluíram que a proteína de soja diminui o nível de triacilglicerol hepático quando comparado com a caseína, os autores atribuíram este efeito a diferenças na composição de aminoácidos entre a proteína da soja e da caseína.

Morifuji *et al*. (2005) realizaram estudo com 28 ratos machos alimentados com dieta contendo caseína ou proteína do soro de leite. Os animais foram treinados (natação) durante

duas semanas e os pesquisadores concluíram que as duas dietas não tiveram efeito significativo no nível de triacilgliceróis sérico, glicose, insulina e glucagon.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABECIA-SORIA, M.I. **Efeitos da Alimentação sub-crônica do hidrolisado das proteínas do lactosoro em ratos sedentários e exercitados.** Campinas, 2003. p.23. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

2. BIANCHI, G.P.; GROSSI, G.; BARGOSSI, A.M. May peripheral and central fatigue be correlated? Can we monitor them by means of clinical laboratory tools? **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness,** v.37, p.194-199, 1997.

3. BIOLO, G.; MAGGI, S.P.; WILLIAMS, B.D. *et al*. Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v.268, p.E514-520, 1995.

4. BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P. *et al*. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.94, p.14930-14935, 1997.

5. BORSHEIM, E.; TIPTON, K.D.; WOLF, S.E. *et al.* Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism,** v.283, p.E648-E657, 2002a.

6. BORSHEIM, E.; CREE, M.P.; TIPTON, K.D *et al.* Effect of carbohydrate intake on net muscle protein synthesis during recovery from resistance exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.96, p.674-678, 2004b.

7. BUCCI, I.R.; UNLU, I. Protein and amino acid supplements in exercise and sport. In: **Energy-yielding macronutrients and energy metabolism in sports nutrition.** Eds: Wolinsky, I.; Driskell, J.A.; Boca Raton, F.L.: CRC Press, p.191-212, 2000.

8. CALBET, J.A.; MACLEAN, D.A. Plasma glucagons and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. **Journal of Nutrition**, v.132, p.2174-2182, 2002.

9. CARVALHO, T. et al. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comparação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte,** v.9, n.2, p. 57-68, mar/abr, 2003.

10. CUKIER, C.; MAGNONI, D.; ALVAREZ, T. **Nutrição baseada na fisiologia dos órgãos e sistemas.** São Paulo: Sarvier, 2005.

11. DANGIN, M.; BOIRIE, Y.; GUILLET,C. *et al*. Influence of the protein digestion rate on protein turnover in young and elderly subjects. J. Nutr, v.132, p.3228S-3233S, 2002.

12. DENADAI, B.S. Limiar anaeróbico: considerações fisiológicas e metodológicas. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde,** Londrina, v.1, n.2, p.74-88, 1995.

13. FOX, E.L.; MATHEWS, D.K. **Bases fisiológicas da educação física e dos desportos.** Rio de Janeiro: Interamericana, 1983.

14. FRÜHBECK, G. Slow and fast dietary proteins. **Nature**, London, v.391, n.2, p.843, 1998.

15. GARRETT, W.E., KIRKENDALL, D.T. **A Ciência do Exercício e dos Esportes.** São Paulo: Artmed, p.911, 2003.

16. GOBATTO, C.A. **Alterações metabólicas decorrentes do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados**. Campinas, 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia - Fisiologia.

17. GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R.; SIBUYA, C.Y. *et al.* Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A,** v.130, p.21-27, 2001.

18. GRIMBLE, R.F.; GRIMBLE, G.K. Immunonutrition: Role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. **Nutrition**, v.14, n.7-8, p.605-610, 1998.

19. GUYTON, A.C. **Fisiologia humana**. Ed.6, Rio de Janeiro: Guanabara, 1998.

20. GUYTON, A.V. Tradução: Alcyr Kraemer et al. **Tratado de Fisiologia Médica.** Ed 6, Rio de Janeiro: Guanabara, 1981.

21. HANSEN, P.A.; NOLTE, L.A.; CHEN, M.M.; HOLLOSZY, J.O. Increased GLUT-4 translocation mediates enhanced insulin sensitivity of muscle transport after exercise. **J. Appl. Physiology,** v.85, p.1218-1222, 1998.

22. HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades funcionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição,** v.19, n.4, p.479-488, jul/ago, 2006.

23. HERMANSE, J.E.; OSTERSEN, S.; AAES, O. Effect of the levels of fertilizer, grass and supplementary feeds on nitrogen composition and renneting properties of milk from cows at pasture. **Journal Dairy Research,** v.61, n.2, p.179-189, may, 1994.

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

25. IVY, J.L.; GOFORTH, H.W.; DAMON, B.M.; McCAULEY, T.R.; PARSONS, E.C.; PRICE, T.B. Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate-protein supplement. **Journal of Applied Physiology**, v.93, p.1337-1344, 2002.

26. JAYAPRAKASHA, H.M.; BRUECKNER, H. Whey protein concentrate: a potencial functional ingredient for food industry. **Journal of Food Science Technology,** v.36, n.3, p.189-204, may, 1999.

27. JENTJENS, R.; JEUKENDRUP, A.E. Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. **Sports Medicine**, v.33, n.2, p. 117-114, 2003.

28. KAASTRA, B.; MANDERS, R.J.F.; VAN BREDA, E. *et al*. Effects of Increasing Insulin Secretion on Acute Postexercise Blood Glucose Disposal. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.38, n.2, p. 268-275, 2006.

29. KAJIKAWA, M.; OHTA, T.; KAWASE, K.; SHIMAMURA, S.; MATSUDA, I. Lactoferrin inhibits cholesterol accumulation in macrophages mediated by acetylated or oxidized low-density lipoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1213, n.1, p. 82-90, 1994.

30. KAWASE, M.; et al. Effects of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. **Journal of Dairy Science,** v.83, n.2, p.255-263, February, 2000.

31. KITAYAMA, K.; KOGA, T.; INABA, T.; FUJIOKA, T. Multiple mechanisms of hypocholesterolemic action of panctimibe, a novel acyl-coenzyme A: choslesterol acyltransferase inhibitor. **European Journal of Pharmacology**, v.543, p.123-132, 2006.

32. LANCHA JR. A.H. **Nutrição e metabolismo aplicados à atividade motora.** São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

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

34. LAYMAN, D.K. Energy and protein metabolism during exercise. **Cereal Foods World,** v.32, n.2, p.178-181, february, 1987.

35. LEMON, P.W.R. Effect of exercise on protein requirements. **Journal of Sports Sciences,** v.9, n.1, p,53-70, January, 1991.

36. LEMON, P.W.R. Do athletes need more dietary protein an aminoacids? **Internatioal Journal of Sport Nutrition,** v.5, p.S39-61, 1995.

37. MAASSEN, N.; BUSSE, M.W. The relationships between lactic acid and work load: a measure for endurance capacity or an indicator of carbohydrate deficiency? **European journal of applied physiology and occupational physiology,** v.58, n.7, p.728-739, 1989.

38. MAHAN, L.K.; STUMP, S.E. Krause – **Alimentos, Nutrição & Dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2002. p. 41-49.

39. MANNINEN, A.H. Protein hydrolysates in sports and exercise: a brief review. **Journal of Sports Science and Medicine**, v.3, p. 60-63, 2004.

40. MANNINEN, A.H. Hyperinsulinaemia, hyperaminoacidaemia and post-exercise muscle anabolism: the search for the optimal recovery drink. **British Journal of Sports Medicine,** v.40, p.900-905, 2006.

41. MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review,** v.9, n.2, p.136-156, 2004.

42. MAUGHAN, R.; GLEESON, M.; GREENNHAFF, P.L. **Bioquímica do exercício e do treinamento.** São Paulo: Manole, 2000. p.34-44.

43. McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Fisiologia do exercício:** energia, nutrição e desempenho humano. 3.ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998.

44. McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Nutrição para o Desporto e o Exercício**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.149-152, 2001.

45. MILLER, S.L.; TIPTON, K.D.; CHINKES, D.L. *et al*. Independent and combined effects of amino acid and glucose after resistance exercise. **Medicine & Science in Sports and Exercise,** v.35, p.449-455, 2003.

46. MORIFUJI, M.; AOYAMA, Y. Dietary orotic acid effects antioxidant enzyme mRNA levels and oxidative damage to lipids and proteins in rat liver. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.403-410, 2002.

47. MORIFUJI, M.; SAKAI, K.; SANBONGI, C.; SUGIURA, K. Dietary whey protein downregulates fatty acid synthesis in the liver, but upregulates it in skeletal muscle of exercise-trained rats. **Nutrition**, v.21, p.1052-1058, 2005.

48. MOSONI, L.; MIRAND, P.P. Type and timing of protein feeding to optimize anabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care,** v.6, p.301-306, 2003.

49. MUCKE, R.; JOLLNER, I. Muscle fibre conduction velocity during fatiguing and non-fatiguing isometric arm contractions. **Biomedica Biochimica Acta,** v.1, p.577-589, 1986. OU 1986;45(1-2):S77-80.

50. NESTEL, P. *et al*. The n-3 fatty acids eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid increase systemic arterial compliance in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.326-330, 2002.

51. NIELSEN, J.N.; DERAVE, W.; KRISTIANSEN, S.; RALSTON, E.; PLOUG, T.; RICHTER, E.A. Glycogen synthase localization and activity in rat skeletal muscle is strongly dependent on glycogen content. **The Journal of Physiology**, v.531, p. 757-769, 2001.

52. OYONO-ENGUELLE, S.; MARBACH, J.; HEITZ, A.; OTT, C.; GARTNER, M.; PAPE, A.; VOLLMER, J.C.; FREUND, H. Lactate removal ability and graded exercise in humans. **J. Appl. Physiol,** v.68, p.905-911, 1990.

53. PACHECO, M.T.B.; BIGHETTI, E.; ANTÔNIO, M. *et al*. Efeito de um hidrolisado de proteínas de soro de leite e de seus peptídeos na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.1, p.47-55, 2006.

54. PAPOTI, M.; ALMEIDA, P.B.L.; PRADA,F.J.A. *et al.* Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição. **Motriz,** Rio Claro, v.9, n.2, p.97-104, mai/ago, 2003.

55. PHILLIPS, S.M.; TIPTON, K.D.; FERRANDO, A.A.; WOLFE, R.R. Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turn over. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.276, n.39, p. E118-124, 1999.

56. PIMENTA, F.M.V. **Efeitos do consume do hidrolisado das proteínas do soro lácteo no desenvolvimento físico e no metabolismo protéico do rato exercitado.** Campinas, 2003. p.50. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

57. PLISK, S.S. Anaerobic metabolic conditioning: a breef review of theory, strategy and practical application. **Journal of Applied Sport Science Research**, v.5, p.22-34, 1991.

58. POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. **Fisiologia do Exercício – Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho.** 3. ed. Barueri: Manole, p.527, 2000.

59. RAMOS, A.G. **Utilização das proteínas do soro lácteo por ratos jovens.** Campinas, 2001. p.83. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de engenharia de Alimentos.

60. ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição. **Rev. Paul. Educ. Fís.,** São Paulo, v.13, n.1, p.67-82, jan/jun, 1999.

61. SAHLIN, K. Metabolic factors in fatigue. **Sports Medicine,** v.13, n.2, p.99-107, 1992.

62. SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology,** v.2, p. 7-19, 1999.

63. SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, dezembro, 2004.

64. SILVA, S.V.; MALCATA, F.X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal,** v.15, n.1, p.1-15, January, 2005.

65. SILVERTHORN, A. C.; OBER, W.C.; GARRISON, C.W. **Fisiologia Humana – Uma abordagem Integrada.** 2° ed. Barueri: Manole, p.99, 2003.

66. TASSI, E.M.M. **Desenvolvimento de dietas para o desempenho físico. Comparação de oligopeptídeos de α-lactoalbumina com a proteína intacta como fonte protéico-energética no rato.** Campinas, 1996. p.79. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

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

68. TIPTON, K.D.; BORSHEIM, E.; WOLF, S.E. *et al*. Acute response of net muscle protein balance reflets 24-h balance after exercise and amino acid ingestion. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism,** v.284, p.E76-89, 2003.

69. TIPTON, K.D.; ELLIOTT, T.A.; CREE, M.G.; WOLF, S.E.; SANFORD, A.P.; WOLFE, R.R. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. **Medicine & Science in Sports and Exercise**, v.36, n.12, p.2073-2081, 2004a.

70. TIPTON, K.D.; WOLFE, R.R. Protein and amino acids for athletes. **Journal of Sports Sciences,** v.22, n.1, p.65-79, 2004.

71. VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry.** New York: J. Wiley, 1990.

72. VAN HALL, G.; SARIS, W.H.; VAN DE SCHOOR, P.A.; WAGENMAKERS, A.J. The effect of free glutamine and peptide ingestion on the rate of muscle glycogen resynthesis in man. **International Journal of Sports Medicine**, v.21, p.25-30, 2000.

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

74. VAN LOON, L.C.; KRUIJSHOOP, M.; VERHAGEN, H *et al*. Ingestion of protein hydrolysate and amino acid-carbohydrate mixtures increases postexercise plasma insulin responses in men. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.2508-2513, 2000b.

75. VAN LOON, L.J.C.; SARIS, W.H.M.; KRUIJSHOOP, M.; WAGENMAKERS. A.J.M. Maximizing post-exercise muscle glycogen syntesis: carbohydrate supplementation and the application of amino acid/protein hydrolyzate mixtures. **American Journal of Clinical Nutrition,** v.72, p.106-111, 2000c.

76. ZACHWIEJA, J.J.; COSTILL, D.L.; PASCOE, D.D.; ROBERGS, R.A.; FINK, W.J. Influence of muscle glycogen depletion on the rate of resynthesis. **Medicine & Science in Sports and Exercise**, v.23, p.44-48, 1991.

77. ZAWADZKI, K.M.; YASPELKIS, B.B.D.; IVY, J.L. Carbohydrate-protein complex increases the rate of muscle glycogen storage after exercise. **J. Appl. Physiol.,** v.72, p.1854-1859, 1992.

78. WAGENMAKERS, A.J.M. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human psysiology and metabolism. **Exercise and Sport Sciences Reviews,** v.26, p.287-314, 1998.

79. WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we way be overlooking. **Critical Reviews in Food Science and Nutrtion,** v.42, n.4, p.353-375, july, 2002.

80. WEBB JR, K.E.; DIRIENZO, D.B.; MATTHEWS, J.C. Recent Development in Gastrintestinal Absorption and Tissue Utilization of Peptides: A review. **Journal Dairy Science,** v.76, n.1, p.351-361, january, 1993.

81. WEINECK, J. **Biologia do Esporte.** São Paulo: Manole, 1991.

82. WOJTASZEWSKI, J.F.P.; HANSEN, B.F.; GADE, J.; KIENS, B.; MARKUNS, J.F.; GOODYEAR, L.J. Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle. **Diabets**, New York, v.49, 2000.

83. WOLFE, R.R. Optimal nutrition, exercise, and hormonal therapy promote muscle anabolism in the elderly. **Journal of the American College Surgeons**, v.202, p.176-180, 2006.

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

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

EFEITO DO CONSUMO DA PROTEÍNA HIDROLISADA DO SORO DE LEITE BOVINO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE ALGUNS TECIDOS DE RATOS SEDENTÁRIOS E EXERCITADOS

Carolina Cauduro Bensabath Carneiro Leão

INTRODUÇÃO

2.1 INTRODUÇÃO

O exercício físico tem profundo efeito no metabolismo das proteínas, no consumo de O_2 acima dos níveis de repouso, no transporte de aminoácidos e de glicose, na concentração de lactato muscular e glicogênio. Nos últimos anos tem-se verificado um avanço importante da nutrição esportiva, com base em princípios fisiológicos e bioquímicos (BAHR; REJERSTED, 1991; JEUKENDRUP *et al.,* 1999; TRIPTON *et al.,* 1999; BURKE, 2000; SGARBIERI, 2004).

Sabe-se que aminoácidos e peptídios, como precursores da síntese protéica, exercem papel fundamental no organismo. O exercício físico, em geral, requer um maior aporte protéico, o que se deve a uma maior utilização de aminoácidos como fonte energética no metabolismo. Na atividade física, a diminuição da disponibilidade de aminoácidos pode limitar o efeito estimulatório da insulina sobre a síntese tecidual de proteínas. Excessos na ingestão de proteínas podem, contudo, proporcionar efeitos negativos no metabolismo hepático e renal (LEMON, 1991; SGARBIERI, 2004).

Embora haja pouco embasamento teórico sobre o uso das proteínas do soro de leite para melhorar o desempenho de atletas, o interesse quanto ao uso destas proteínas vem crescendo. Porém, ainda hoje não se sabe qual a melhor forma de consumo e qual a quantidade ideal dessas proteínas a serem ingeridas.

As proteínas do soro de leite são altamente digeríveis e rapidamente absorvíveis pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e de outros tecidos. Além disso, a composição aminoácidica das proteínas do soro de leite é tal que ultrapassa o perfil de referência (DRIs, 2002 – FNB/IOM) para quase todos os aminoácidos essenciais, exceto os aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), que não se encontram em quantidades suficientes para atender às recomendações para todas as idades (SGARBIERI, 2004). Devido ao seu escore químico, as proteínas do soro de leite, também podem alterar a síntese protéica e de glicogênio, já que pode ocorrer um aumento na secreção de insulina estimulada pela concentração de aminoácidos de cadeia ramificada. Porém, uma vez reduzida a disponibilidade de aminoácidos, o estímulo da insulina sobre a síntese protéica pode diminuir (BIOLO *et al.,* 1997; BIOLO *et al.,* 1999).

Estudos anteriores em nossos laboratórios (PIMENTA *et al*., 2006) mostraram que o consumo de proteolisado do soro do leite, como única fonte protéica para ratos jovens submetidos ao exercício físico, mostrou-se superior à proteína intacta na performance do animal, segundo parâmetros de lactato, albumina e proteínas séricas totais. Anteriormente (TASSI *et al*., 1998), ação semelhante em ratos exercitados já tinha sido sugerida em outro estudo com o hidrolisado da α-lactalbumina bovina.

As proteínas hidrolisadas têm sido pouco estudadas, com relação a seus benefícios para o organismo submetido ao exercício físico, desse modo, um dos interesses desse projeto foi estudar esses efeitos em ratos exercitados em relação aos sedentários e suas possíveis vantagens para a saúde humana. Tendo em vista os efeitos positivos observados no rato, foi considerado de interesse pesquisar alguns fenômenos bioquímicos que poderiam começar a explicar os achados anteriores.

O objetivo deste trabalho foi verificar possíveis alterações metabólicas ocorridas nos tecidos no tecido gastrocnêmio, coração, fígado e sangue de ratos Wistar alimentados com dietas contendo isolado do soro de leite e seu proteolisado (grau de hidrolise ≈ 13%) e caseína (controle) e submetidos ao exercício físico em esteira.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Animais e Ensaio Biológico

O ensaio biológico teve a duração de 9 semanas e foram utilizados 72 ratos machos da linhagem Wistar *specific pathogen free* (SPF), recém-desmamados, com 21 dias e pesando ~ 58g, procedentes do Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – Instituto de Biologia – IB, Unicamp, sob protocolo n° 1339-1/2007.

Numa fase de 4 semanas anteriores ao ensaio, os amimais foram mantidos em gaiolas individuais de crescimento, com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura de 23 ± 1 ºC (UR 50 a 60%). Neste período, os animais foram alimentados com dieta comercial não purificada (formulação centesimal constante), do próprio fabricante (Labina, Purina, Brasil). Os animais tiveram livre acesso às dietas e à água e, durante a terceira e quarta semanas, receberam sessões de familiarização com a esteira e adaptação à movimentação.

Ao final das quatro semanas, foi feita a exclusão daqueles indivíduos (~50%) que mostraram a menor disposição para correr. Os selecionados foram divididos em 6 grupos de 12 ratos, sendo estes com diferentes tratamentos de dieta e treinamento (Figura 1). Estes grupos foram submetidos a um período de 9 semanas de ensaio com dieta experimental AIN 93-M.

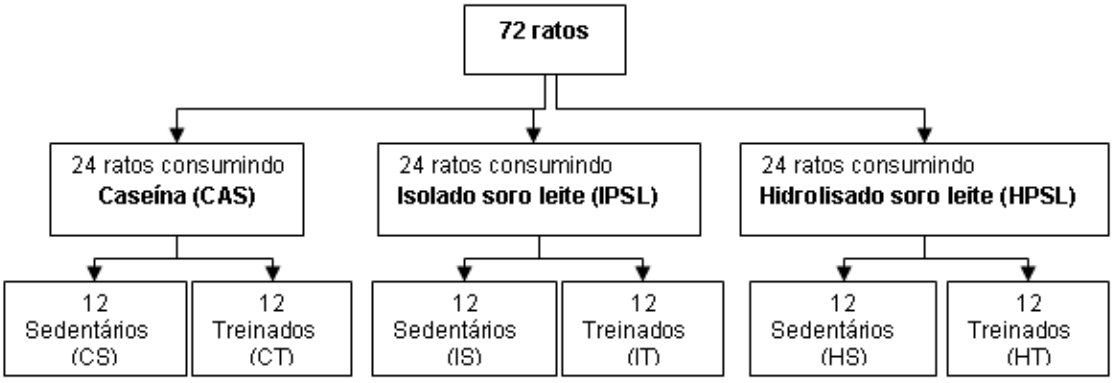


Figura 1: Esquema de divisão dos animais por dieta e tipo de atividade física. **CS:** dieta com caseína e sedentários, **CT:** dieta com caseína e treinados, **IS**: dieta com isolado e sedentário, **IT:** dieta com isolado e treinado, **HS:** dieta com hidrolisado e sedentários, e **HT:** dieta com hidrolisado protéico e treinados.

2.2.2 Dietas Experimentais

Após o período de adaptação, deu-se início ao experimento, para o qual as dietas experimentais administradas aos animais foram elaboradas de acordo com a formulação da *American Institute of Nutrition* AIN 93-M (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR, 1993), as quais possuem teor de proteína bruta de 12% (PELLET, 1980). As fontes protéicas utilizadas nas dietas foram: isolado (Hilmar – 9410) e hidrolisado (Hilmar – 8360) do soro de leite, ambos da Hilmar Ingredients^{TM} (USA), e a caseína (Agroquímica São Paulo, SP), que foi utilizada como controle.

Os teores de proteína bruta, tanto do isolado, como do seu hidrolisado enzimático e caseína foram determinados pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1997). Posteriormente as dietas foram elaboradas de forma a serem isoprotéicas (12%), isoenergéticas e isolipídicas (cerca de 300 kcal/100g).

O grau de hidrólise do hidrolisado do soro do leite utilizado na preparação da dieta foi de ~13%, segundo o fabricante (Hilmar Ingredients^{TM} - USA). As dietas experimentais tiveram sua composição centesimal determinada pelos métodos: fibra bruta (AOAC, 1995), lipídeos, umidade (Instituto Adolfo Lutz, 1985), cinzas e proteína (AOAC, 1997) e carboidratos por cálculo da diferença.

A análise dos aminoácidos das dietas que continham isolado, hidrolisado e caseína, foi realizada segundo a metodologia cromatográfica descrita por White, Hart e Fry (1986) e Hangen, Frost e Augustin (1989). As proteínas contidas nas farinhas foram hidrolisadas com ácido clorídrico 6N, a 100 ºC, durante 24 horas. Após hidrólise, foi adicionado às amostras fenilisotiocianato (PITC). Os aminoácidos derivatizados foram separados em coluna de fase reversa e quantificados com detector UV a 254nm. A quantificação foi feita por calibração interna multinível, utilizando ácido alfa-aminobutírico (AAAB) como padrão interno.

2.2.2.1 Composição das Dietas

A composição das dietas experimentais e composição centesimal média das dietas encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Composição das dietas (g/kg de dieta) utilizadas no ensaio biológico.

Ingredientes	Dieta com hidrolisado	Dieta com isolado	Dieta com caseína
Amido de milho	458,41	473,85	461,11
Amido dextrinizado	152,58	157,71	153,47
Sacarose	98,44	101,75	99,01
Caseína[1]	-----	-----	147,07
Isolado protéico[2]	-----	127,36	-----
Hidrolisado protéico[3]	151,26	-----	-----
Óleo vegetal	40	40	40
Fibra (celulose)	50	50	50
Mistura mineral[4]	35	35	35
Mistura vitamínica[4]	10	10	10
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Tert-butilhidroquinona	0,008	0,008	0,008
L-cistina	1,8	1,8	1,8
Total	100,01	999,998	1000,005

[1] 81,6% de proteína; [2] 94,2% de proteína; [3]79,3% de proteína; [4] Reeves, Nielsen e Fahet, 1993.

Tabela 2: Composição centesimal média das dietas experimentais (base seca).

Componente	Caseína (C)	Isolado (I)	Hidrolisado (H)
Energia kcal/100g	397,53 ± 3,3[a]	398,82 ± 2,88[a]	405,23 ± 0,43[b]
Carboidrato (%)	77,24 ± 0,96[a]	81,21 ± 4,58[a]	77,65 ± 1,07[a]
Proteínas (%)	12,54 ± 0,40[a]	11,53 ± 0,66[a]	12,40 ± 0,81[a]
Lipídeos (%)	4,26 ± 0,15[b]	3,94 ± 0,19[a]	4,99 ± 0,13[c]
Cinzas (%)	3,14 ± 0,30[a]	2,90 ± 0,29[a]	3,55 ± 0,15[b]
Fibra bruta (%)	2,80 ± 0,81[b]	2,32 ± 0,65[b]	1,38 ± 0,19[a]

Valores: média ± desvio padrão. Letras diferentes na horizontal representam diferença significativa ($p < 0,05$).

A Tabela 2 apresenta a composição das dietas em termos de fibra bruta, lipídeos, cinzas, proteínas e carboidratos. Esta avaliação mostra que as três dietas foram aproximadamente isoprotéicas e isocalóricas. Com relação ao teor de lipídico observa-se que as diferenças, embora não expressivas, foram significativas entre todas as dietas, sendo o maior valor encontrado na dieta H. Quanto ao teor de fibra bruta, a diferença para menor entre a dieta H e as outras duas foi significativa. Com relação ao teor protéico observa-se que não houve diferença significativa ($p = 0,054$) entre as dietas. O conteúdo energético da dieta H pode ser atribuído ao maior teor lipídico.

2.2.3 Controle da Evolução Ponderal e Ingestão Alimentar

Quando se iniciou o período de treinamento, os animais foram transferidos para gaiolas coletivas de até cinco indivíduos. Durante o período de administração da ração comercial e dieta experimental os animais foram pesados semanalmente, inclusive no dia de sacrifício e o controle da ingestão alimentar média foi feito por meio da pesagem dos comedouros em dias alternados.

2.2.4 Protocolo de Treinamento e Característica do Treinamento Físico

Primeiramente todos os ratos foram adaptados à esteira rolante durante a terceira e a quarta semanas, antes de dar início ao experimento. Esta fase consistiu em colocá-los na esteira durante 5 dias/semana, começando com 5 minutos, na velocidade em 5 m/min, na terceira semana e, 10 minutos na velocidade de 10 m/min, na quarta. No final, dois grupos (sedentários e treinados) foram formados com os animais que não se recusavam a correr. Dentre cada um destes grupos, os animais foram divididos de acordo com o tipo de dieta administrada, formando os seguintes grupos: caseína- sedentário (CS), isolado-sedentário (IS), hidrolisado-sedentário (HS) e grupos caseína-treinado (CT), isolado-treinado (IT) e hidrolisado-treinado (HT). No que se refere à dieta, os animais foram selecionados por sorteio.

A esteira rolante é composta por uma plataforma inclinável e dispositivo de choque elétrico na extremidade de partida para evitar a interrupção da atividade física, além de um painel de controle de inclinação e velocidade.

O treinamento foi realizado com freqüência de 5 dias/semana, sempre no mesmo horário e mantendo a mesma seqüência entre os grupos. A duração do treinamento foi de 9 semanas.

O treinamento seguiu um protocolo de Hohl (2007), adaptado, truncando-o até a duração das nove semanas.

Os animais do grupo sedentário (n = 36) foram submetidos a 10 minutos de esteira com velocidade de 12 m/min, três vezes na semana, durante todo o período do experimento, de forma a minimizar o fator estresse do grupo treinado.

O protocolo de treinamento propriamente dito (Tabela 3) teve a duração de 9 semanas. Até o final da primeira semana, os animais alcançaram a velocidade de 15m/min, por 20 minutos. No final da segunda semana, a meta foi de 20m/min, correndo por 30 minutos. Na terceira semana, 22,5m/min, por 45 minutos. Na quarta semana a velocidade era de 25m/min, por 60 minutos, sendo que nas restantes 4 semanas, a velocidade e o tempo continuaram sem alteração. Por fim, na nona semana, o número de sessões de treinamento dobrou, deixando um intervalo de 4 horas entre uma sessão e outra. A Tabela 3 apresenta o protocolo de exercício realizado pelos animais.

Tabela 3: Protocolo de treinamento contínuo de 9 semanas.

Semanas	Velocidade (m/min)	Tempo (min)	Número de sessões diárias	Intervalo entre as sessões (h)
1ª	15	20	1	-
2ª	20	30	1	-
3ª	22,5	45	1	-
4ª	25	60	1	-
5ª a 8ª	25	60	1	-
9ª	25	60	2	4

2.2.5 Testes de Desempenho – Exaustão

Testes de desempenho foram realizados logo após a 4ª (teste 1), 8ª (teste 2), e 9ª (teste 3) semanas de treinamento, sempre 48 h após a última sessão de treino semanal (dia de descanso). Assim, três testes de desempenho foram realizados ao longo do estudo, refletindo o estado do animal nas diferentes fases do treinamento, conforme descrito na Tabela 4.

Todos os testes foram realizados com os animais correndo em esteira sem inclinação, ajustada na velocidade inicial de 12m/min. A cada 2 min incrementou-se a velocidade em 1m/min até atingir os 20m/min. A partir dessa velocidade, o incremento da velocidade passou a ser de 2m/min a cada 3 minutos, até o animal atingir o seu ponto de exaustão. A exaustão foi definida no momento em que o animal demorava 30 segundos sem poder-se afastar da base da baia. No momento da exaustão, a corrente era desligada e o rato removido da esteira. Os tempos de exaustão foram registrados em segundos. Os ratos sedentários não foram submetidos ao teste de desempenho.

Tabela 4: Protocolo do teste de desempenho.

Duração (min)	**Velocidade (m/min)**
Início	12
2	13
4	14
6	15
8	16
10	17
12	18
14	19
16	20
18	22
21	24
24	26
:	:

2.2.6 Sacrifício dos Animais

Antes do sacrifício os animais, tinham ficado de repouso por um período de 48 horas, sendo as últimas 12 horas, sem alimento. Os ratos treinados foram sacrificados 48 horas após a exaustão (último teste de desempenho), ou seja, quando se completou a décima terceira semana de experimento, inclusive para os sedentários. Os órgãos (coração, fígado e músculo gastrocnêmio) foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em biofreezer (a gordura externa de cada órgão foi retirada manualmente). O sangue de cada animal também foi coletado e centrifugado (1462g) por 15 minutos. As análises foram realizadas no mesmo dia da eutanásia ou segui-se a recomendação de cada protocolo. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (80mg/kg de peso) e sedados com cloridrato de xilazina (8mg/kg de peso) para retirar todo o sangue por punção cardíaca, seguido de retirada dos órgãos.

2.2.7 Determinações Analíticas

2.2.7.1 Ácidos graxos livres

A concentração de ácidos graxos livres foi determinada por meio do método enzimático colorimétrico, conforme descrito por Trout; Estes e Friedbekg (1960); Dole; Meinertz (1960); Duncombe (1964); Itaya; Ui (1965); Novak (1965), utilizando o kit comercial da Wako Chemicals® (Neuss, Alemanha), conforme descrição do fabricante.

2.2.7.2 Lípidios séricos

As determinações dos lipídeos séricos foram realizadas empregando os métodos enzimáticos colorimétricos, utilizando para a quatificação de triacilgliceróis o kit comercial

Laborlab (n° 02700), segundo metodologia descrita por Fossati (1982) e McGowan *et al.* (1983). Para colesterol total e colesterol-HDL foram utilizados kits comerciais Bioclin K053 e K015, respectivamente (Trinder, 1969; Allain *et al.*, 1974; Carl; Edward, 1994; Henry, 1996;). Para a quantificação de colesterol-VLDL, foi utilizada a equação de Friedewald, que estima os valores através do seguinte cálculo:

$$Colesterol - VLDL = \frac{Triacilglicerol}{5}$$

$$Colesterol - LDL = ColesterolTotal - \left(HDL - VLDL \right)$$

2.2.7.3 Glicose sérica

A concentração de glicose sérica foi determinada pelo método enzimático glicose oxidase-peroxidase, conforme descrito por Trinder (1969) e Henry; Cannon e Winkelman (1974), utilizando o kit comercial Laborlab (n° 02200), conforme descrição do fabricante.

2.2.7.4 Insulina sérica

Para a determinação de insulina sérica foi utilizada a metodologia por radioimunoensaio, segundo metodologia descrita por Filiputti (2006). Foram transferidos para os tubos 0,1mL de soro (em duplicata), os quais receberam 0,2mL de solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com ^{125}I (traçador) em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl a 0,9% e solução aquosa de albumina a 0,5%. Em seguida, foram preparados os seguintes controles:

- 3 tubos denominados *totais* que receberam somente 0,2mL do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I para quantificação da radiação máxima.

- 3 tubos denominados *ligação não-específica* contendo 0,2mL do tampão fosfato com insulina marcada ^{125}I e 0,1mL de tampão fosfato, para determinação de possíveis interferentes no ensaio pelos componentes do tampão.
- 3 tubos denominados referência contendo 0,2mL de solução tampão fosfato com insulina marcada ^{125}I e anticorpo anti-insulina e 0,1mL de tampão fosfato, constituindo assim o zero de insulina da curva padrão.

Em seguida, foi preparada em triplicata, uma série de tubos contendo 0,1mL de insulina padrão nas seguintes concentrações: 0,02; 0,039; 0,078; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5 e 5,0 ng/mL para a montagem da curva padrão. Cada tubo recebeu 0,2mL de solução tampão fosfato, contendo insulina marcada ^{125}I e anticorpo anti-insulina. Os tubos das amostras, controle e padrão após serem preparados, foram agitados em vortex e estocados a 4 °C, durante 48 horas, antes de prosseguirem para incubação.

Após esse período, com exceção dos *totais* para análise de radiação máxima, os tubos receberam 0,2mL de uma solução contendo 2,5% de carvão (Norit A), 0,5% de albumina e 0,25% de Dextran T70. Os tubos foram deixados em repouso durante 20 minutos e em seguida centrifugados durante 20 minutos (1462 g) a 4 °C. O sobrenadante foi então descartado e a radioatividade contida em cada tubo, avaliada em contador de radiação gama. Os três tubos elaborados para análise de radiação máxima não tiveram o sobrenadante descartado, sendo a radiação dos mesmos avaliada diretamente. Com base nos valores que foram obtidos nos tubos contendo insulina conhecida, elaborou-se uma curva padrão que foi utilizada para o cálculo dos valores desconhecidos das amostras. Os resultados foram expressos em ng/mL de insulina secretada durante o experimento *in vivo*.

2.2.7.5 Proteínas totais e albumina séricas

A definição dada para proteína total é a soma da albumina e globulina sérica. Para a concentração de albumina sérica, foi utilizado o método colorimétrico obtido pela reação com verde de bromocresol. Para a quantificação de proteína total sérica, foi utilizado o método biureto, método colorimétrico, no qual os íons de cobre presentes no reagente em

meio alcalino reagem com as ligações peptídicas das proteínas, formando um complexo de cor violeta, proporcional ao teor de proteínas. Para as duas análises foi utilizado o kit comercial Laborlab (n° 03800), segundo metodologia descrita por Henry; Sobel e Berkman (1957); Doumas; Watson e Biggs (1971).

2.2.7.6 Dosagem da concentração de lactato sanguíneo

Para realizar a medição do lactato sanguíneo foi cortada a ponta da cauda do animal e imediatamente o sangue foi coletado em tubo capilar e transferido sobre a tira reativa (BM-Lactate, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), a qual se introduz no lactímetro (Accusport, Boehringer Mannhein GmbH Biochemica, Alemanha), onde foi realizada a leitura da concentração de lactato. Esta medição foi feita na oitava semana de treinamento. Para os ratos sedentários foi feita uma única medição e para os treinados foram feitas cinco medições, sendo a primeira antes de iniciar o exercício, a segunda com meia hora de treino, a terceira com uma hora, a quarta uma hora após e a quinta duas horas após o treinamento. Objetivando a comparação entre a obtenção do lactato em repouso, durante o exercício e após.

2.2.7.7 Quantificação do Glicogênio

A determinação de glicogênio dos órgãos: coração, fígado e músculo gastrocnêmio foi realizada com base no método empregado por Lo *et al.* (1970).

Foram utilizados os seguintes reagentes:

1) Solução de hidróxido de potássio a 30% (KOH) saturada com sulfato de sódio. Grãos de KOH (300g, 73201 Merk, grau p.a.) dissolvidos em água destilada e saturada com sulfato de sódio (Fisher S-421 anidro, certificado ACS).

2) Álcool etílico 95%

3) Fenol 5%. Cristais de fenol (250g, Mallincrodt 9928, p.a.) dissolvidos em água destilada até completar 5 litros.

4) Ácido sulfúrico 96-98% (Fisher A-300, grau p.a.)

5) Soluções de glicogênio padrão. Pó de glicogênio (25mg), dissolvidos em água até completar 5mL, para fornecer uma solução estoque de 5mg/mL. Soluções de trabalho do padrão serão preparadas por diluição volumétrica de solução estoque.

Procedimentos:

Foram retiradas amostras de aproximadamente 25mg de fígado, 30mg de músculo gastrocnêmio e 35mg do miocárdio. Todas as amostras foram imediatamente transferidas para um prato de pesagem e toda gordura, tecido conectivo e sangue foram removidos com pinça e tesoura cirúrgica. Estas amostras foram imediatamente transferidas para um tubo rosca e colocadas em nitrogênio líquido. Após, as amostras foram transferidas com pinça tipo fórceps para o fundo de um tubo Falcon contendo 500µL de KOH 30% saturado com Na_2SO_4, sendo o tecido completamente imerso na solução e esse foi mantido em gelo até que todos os tubos fossem preenchidos. Os tubos foram fechados e levados ao banho-maria em água fervente por 30 minutos, até obter uma solução homogênea (digestão alcalina). Os tubos foram removidos do banho-maria e colocados no gelo. Em seguida foi adicionado 1,1mL de etanol a 95% para precipitar o glicogênio resultante da digestão alcalina. As amostras foram deixadas no gelo por 30 minutos, sendo então centrifugadas a 840 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado dissolvido em 3mL de água nanopura (Milli-Q) e agitado no Vortex.

Da solução obtida retirou-se 1mL para um tubo de ensaio e adicionou-se 1mL da solução de Fenol 5% ao novo tubo. Adicionou-se 5mL de H_2SO_4 98% rapidamente sobre a superfície da amostra (10 a 20 segundos) tomando cuidado para não cair na borda do tubo, assegurando uma boa mistura entre os dois. Reservou-se por 10 minutos. Após agitação, os

tubos foram colocados para esfriar em banho-maria de 25 a 30°C por 15 minutos. Em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro (Beckman-Coulter DU-640) com comprimento de onda à 490nm. Como branco foi utilizada uma mistura de 1mL de água Milli-Q com 1mL de fenol 5% e 5 mL de H_2SO_4 98%.

Todos os testes foram realizados em duplicata, a fim de minimizar erros.

Curva Padrão:

Para a padronização da técnica foi feita a curva padrão obtida a partir da adição de fenol, empregando-se soluções de glicogênio com concentrações que variaram de 5 a 100µg/ml. As médias das leituras de absorbância foram plotadas contra as respectivas concentrações de glicogênio adicionadas. Cada ponto foi a média de três determinações. O coeficiente angular desta curva padrão foi utilizado para a determinação da concentração do glicogênio nas amostras.

O cálculo da concentração de glicogênio das amostras foi efetuado utilizando-se a equação abaixo:

$$C = (A_{490}/k) \bullet (V/v) \bullet (10^{-4}/w)$$

Onde:

C = Concentração de glicogênio (g/100g de tecido)
A_{490} = Absorbância a 490nm
k = Coeficiente angular da curva padrão de glicogênio
V = Volume total da amostra de glicogênio
v = Volume da alíquota da amostra usada no ensaio
w = Massa do tecido

2.2.7.8 Determinação da proteína muscular

A determinação da proteína muscular dos órgãos: coração, fígado e gastrocnêmio foi realizada com base no método empregado por Lowry *et al*. (1951).

Foram utilizados os seguintes reagentes:

1. Preparo da solução A: 0,4g de tartarato de sódio e potássio com 20g de carbonato de cálcio ($NaCO_3$) e 1g de NaOH dissolvido em 50mL de água. O volume foi completado para 200mL, com água destilada.

2. Preparo da solução B: 0,4g de tartarato de sódio e potássio, 0,2g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, dissolvidos em 150mL de água destilada, adicionado 0,08 de NaOH. O volume foi completado para 200mL, com água destilada.

3. Preparo da solução C: Reagentes de Folin (Merck) mais água na proporção 1:14.

4. Solução para digestão do músculo: 20mg de tecido (músculo) aproximadamente e 100 µL de $HClO_4$ foram colocados em tubo Falcon e digeridos em banho-maria a 100°C por 60 minutos e após este procedimento foram centrifugados a 840 x g por 30 minutos.

5. Após este procedimento, 10µL do sobrenadante foi retirado para um tubo de ensaio adicionado 1,0 mL de água destilada.

6. Em seguida, adicionou-se 0,9 mL de solução A e levou-se por 10 minutos em banho-maria à 50°C.

7. À esse conteúdo, foi adicionado 0,1mL de solução B e esperou-se 10 minutos em temperatura ambiente.

8. O passo seguinte foi adicionar 3,0 mL da solução C e levar por 10 minutos em banho-maria à 50°C. Esperou-se resfriar em temperatura ambiente.

9. Finalizada a oitava etapa, o conteúdo obtido foi agitado em Vortex e levado à leitura em espectrofotômetro Beckman DU-640, em 650nm.

10. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Para a padronização da técnica foi feita a curva padrão da seguinte maneira:

Concentração padrão (solução mãe)

10 μL de proteínas totais (4,4 g/dL) + 3,2 mL de água destilada

Padrão I - 1,25 mg/dL

0,1 mL do padrão + 1,0 mL de água destilada, seguido da sexta etapa.

Padrão II – 3,73 mg/dL

0,3 mL do padrão + 0,8 mL de água destilada, seguido da sexta etapa.

Padrão III – 6,23 mg/dL

0,5 mL do padrão + 0,6 mL de água destilada, seguido da sexta etapa.

Padrão IV – 8,72 mg/dL

0,7 mL do padrão + 0,4 mL de água destilada, seguido da sexta etapa.

Padrão V – 11,21 mg/dL

0,9 mL do padrão + 0,2 mL de água destilada, seguido da sexta etapa.

Cada ponto da curva padrão foi a média de três determinações. O coeficiente angular desta curva padrão foi utilizado para a determinação da concentração de proteína muscular nas amostras.

O cálculo da concentração de proteína muscular das amostras foi efetuado utilizando-se a equação abaixo:

$$\frac{\sum[\ ]CP}{\sum[\ ]AbsP}\cdot La\cdot\frac{100}{Peso(mg)}=\left(\frac{mg}{100mg}\right)$$

Onde:

CP = Curva Padrão

AbsP = Absorbância do padrão

La = Leitura da absorbância da amostra

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o software SPSS® (*Statistical Package for Social Sciences*) (SPSS 1999), para realização das análises estatísticas dos resultados obtidos. Inicialmente foi realizado o teste de aderência dos dados à distribuição normal ou de Gauss, denominado Shapiro-Wilk (usado para amostras menores ou iguais a 50 casos por grupo). Em seguida, para as variáveis que se mostraram paramétricas (normais), foi realizada a análise de variância (ANOVA) bivariada entre as médias para verificar a existência de diferença estatística entre os grupos. Para os resultados significativos aplicou-se o teste de Tukey que, por sua vez, localiza a diferença entre os grupos. Por outro lado, para as variáveis não-paramétricas (não-normais) utilizou-se o teste Kruskal-Wallis para verificar se havia diferença estatística entre os grupos e, em seguida, o teste de Mann-Whitney U, em caso de resultado significativo (MALHOTRA, 2006). O último teste localiza a diferença entre os grupos. As diferenças entre as médias dos grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil Aminoacídico das Dietas Contendo Proteínas Caseína, Isolado e Hidrolisado

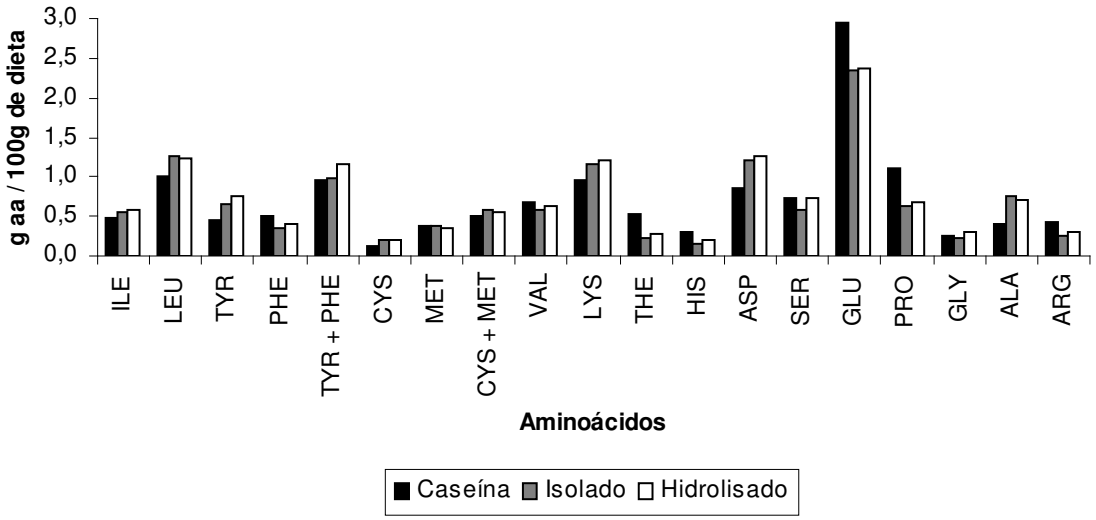


Figura 2: Perfil aminoacídico total das dietas com caseína, isolado e hidrolisado protéico de soro de leite, mostrando a similaridade entre a composição das dietas I e H.

A Figura 2 mostra o perfil aminoacídico das dietas utilizadas para o ensaio biológico. Nota-se que não houve grandes variações quanto ao fornecimento de aminoácidos nas dietas contendo isolado e hidrolisado, apesar de não ter sido realizada uma análise estatística de diferença de médias. As variações foram consistentes com a premissa de que as fontes protéicas oferecidas se diferenciam principalmente quanto à forma físico-química. No entanto, a dieta contendo caseína apresentou variações mais expressivas no seu perfil de aminoácidos.

Consumo de Dieta

Os animais receberam a dieta experimental durante 9 semanas, apresentando um consumo médio diário de 25,65 ± 4,36g para o grupo caseína sedentário, 20,34 ± 2,60g para o grupo isolado sedentário, 21,00 ± 4,59g para o grupo hidrolisado sedentário, 20,47 ± 3,57g para o grupo caseína treinado, 18,58 ± 4,12g para o grupo isolado treinado e 19,69 ± 2,83g para o grupo hidrolisado treinado. Dessa forma, constata-se que em geral não houve diferença de consumo entre os grupos, exceto para o grupo caseína sedentário que apresentou um consumo ligeiramente maior.

Segundo Parreira (1993) e Azevedo (1994), o treinamento físico intenso é capaz de provocar diminuição do apetite quando executado agudamente, já que o exercício pode ser um agente causador de estresse, com alterações fisiológicas e metabólicas no organismo. Ainda, pode ocorrer diminuição da ingestão alimentar durante o exercício físico intenso porque há estímulo da quebra de glicogênio hepático, elevando a glicemia plasmática, e dessa forma gerando perda do apetite (STEVENSON, 1967). Portanto, em treinamentos intensos o consumo alimentar e o ganho de peso são geralmente inferiores nos animais treinados (PIMENTA, 2003). No presente trabalho não foi possível fazer qualquer afirmação a respeito da relação entre o consumo de dieta e o nível de atividade física.

Evolução Ponderal

Nas primeiras quatro semanas os animais foram alimentados com dieta comercial, já que nesta etapa esperava-se somente aguardar o crescimento. De acordo com a Figura 3 pode-se constatar que não houve diferença nos ganhos de peso entre todos os grupos, já que as curvas apresentaram um comportamento linear e coeficientes angulares constantes (~36 g/semana, nas duas primeiras semanas). Nas semanas 3 e 4, deu-se início à adaptação geral dos animais à atividade física. Apesar disso, observou-se que o crescimento permaneceu constante (~36 g/semana), não havendo diferença significativa (p=0,535) entre os grupos, tanto em termos de nível de atividade física, quanto em termos das dietas administradas. A partir da quinta semana, iniciou-se o período de dieta experimental juntamente com o

protocolo de atividade física. Durante as semanas 1, 2, 3 e 4, seguiu-se o protocolo descrito na seção de Material e Métodos.

Observa-se, ainda na Figura 3, que durante as semanas 5 a 8, houve uma diminuição na taxa de crescimento dos animais (média ~26 g/semana), embora sem diferença estatística. Uma vez que esta diminuição do crescimento ocorreu para todos os grupos de maneira igual, independentemente do nível de atividade física, atribui-se esta queda à mudança da dieta comercial pelas dietas experimentais. Pela mesma razão, não foi observada diferença de crescimento entre os grupos que possa se relacionar às dietas experimentais. Já, nas semanas 9 a 12, tanto a velocidade da esteira quanto o tempo de exercício foram mantidos nos níveis atingidos na semana 13. No entanto, durante este período, percebeu-se uma diminuição do crescimento dos animais (média ~14 g/semana), já que os coeficientes angulares das curvas nesta região foram inferiores aos dos intervalos que vão, da quinta à nona semana e, da décima à décima terceira semana. Entretanto, não foi possível detectar diferença estatística entre os grupos neste período, exceto para o grupo caseína sedentário que mostrou pesos superiores em relação a todos os outros grupos treinados.

Na semana 13, o número de sessões de treinamento foi dobrado, com tempo de recuperação de 4 horas entre uma sessão e outra. Neste caso, houve diferença significativa ($p=0,001$) entre o grupo caseína-sedentário e os grupos caseína-treinado, isolado-treinado, hidrolisado-treinado e isolado-sedentário. Não houve diferença entre a caseína e o hidrolisado para os sedentários, mas, a houve entre o caseína-treinado e o hidrolisado-sedentário. Por não ter ocorrido diferença estatística entre os grupos treinados e os grupos sedentários, sugere-se que tal diferença estatística obtida entre o grupo caseína sedentário e os grupos treinados deve-se à influência do maior consumo de dieta pelo caseína-sedentário ao longo de todo o experimento. Contudo, quando se comparam os grupos caseína-sedentário e caseína-treinado, a partir da décima semana, observa-se que houve diferença significativa nos pesos, e isto pode ser atribuído à atividade física, já que a dieta não teve alteração.

Resumindo, não foi detectada influência da dieta ou da atividade física no crescimento dos animais, exceto para o grupo sedentário alimentado com caseína que apresentou a maior da taxa de ganho de peso. Isto é, quando a proteína era do soro do leite,

o sedentarismo não promoveu aumentos de peso tão grandes quanto a caseína. Logo, sugere-se que, embora não tenha havido análise da composição corporal dos animais, o acréscimo de peso esteja relacionado à natureza da proteína, não sendo ainda possível descartar qualquer influência da idade na resposta do crescimento ao longo do período de vida.

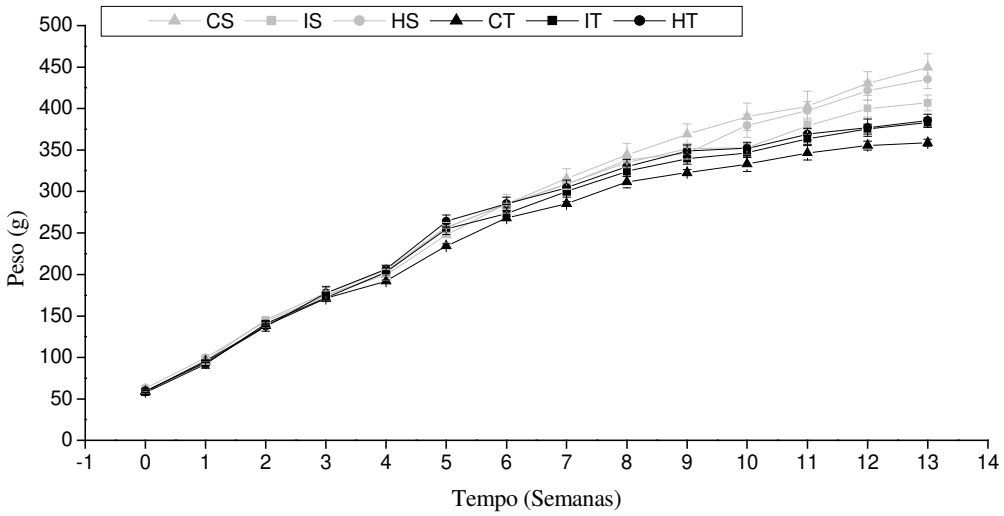


Figura 3: Ganho de peso dos animais durante ensaio biológico. Cada valor representa à média dos dados ± desvio padrão. Para as semanas 9, 10 e 11, o grupo CS se diferenciou dos grupos CT e IT. Na semana 12, o grupo CT se diferenciou também do grupo HT. Já na semana 13 as diferenças se registraram entre o grupo CS e CT, IT, HT, IS e o grupo CT se diferenciou do grupo HS. Os valores de p variaram entre 0,001 e 0,041.

Teste de Desempenho

Realizaram o teste de desempenho os grupos caseína-treinado (CT), isolado-treinado (IT) e hidrolisado-treinado (HT), com a finalidade de comparar o desempenho físico, no término das semanas 8, 12 e 13, e avaliar a influência de cada dieta (os grupos sedentários não realizaram o teste; Tabela 5). Os momentos nos quais o teste de desempenho foi aplicado coincidem com os momentos nos quais houve alterações no nível de atividade física.

Tabela 5: Tempos médios de exaustão (segundos) nos testes de desempenho realizados por todos os grupos treinados.

	GRUPOS		
SEMANAS	CT	IT	HT
8	$2687,85 \pm 397,34^{aA}$	$2511,57 \pm 70,75^{aA}$	$3266,53 \pm 779,33^{b}$
12	$2990,42 \pm 491,19^{AB}$	$2888,35 \pm 429,77^{B}$	$3056,81 \pm 225,09$
13	$3127,21 \pm 545,67^{B}$	$3431,00 \pm 503,57^{C}$	$3235,44 \pm 519,89$

Valores correspondem às médias ± desvio padrão de 12 animais por grupo. Letra minúscula refere-se à diferença estatística entre os grupos na mesma semana. Letra maiúscula refere-se à diferença estatística entre as semanas para o mesmo grupo.

Foi utilizado como medida de desempenho o tempo de exaustão, que foi considerado como o momento em que o rato não mais saía da base da esteira, portanto não conseguia se esquivar do choque provocado pela esteira.

Observa-se na Figura 4 e na Tabela 5 que as proteínas intactas (caseína e isolado) produziram efeitos semelhantes entre si, ao passo que o hidrolisado se destacou por produzir um efeito máximo desde a oitava semana de treinamento. Assim, no primeiro teste de desempenho (oitava semana), o grupo hidrolisado (HT) atingiu a exaustão em tempo 23% maior do que o grupo isolado (IT, p=0,001) e 18% maior do que o do grupo caseína (CT, p=0,015). Por sua vez, os grupos alimentados com as proteínas inteiras alcançaram o seu melhor desempenho somente em momento posterior à oitava semana, enquanto o grupo do hidrolisado manteve o bom desempenho até o final da décima terceira semana, notando-se que não houve diferença estatística discernível entre os desempenhos dos três grupos nas duas últimas semanas.

Tendo em vista estes resultados, teria sido interessante verificar em que momento do treinamento, anterior à oitava semana, os animais que consumiram a proteína hidrolisada poderiam ter alcançado o seu máximo rendimento. Tal questão, entretanto, poderá ser abordada em experimentos futuros.

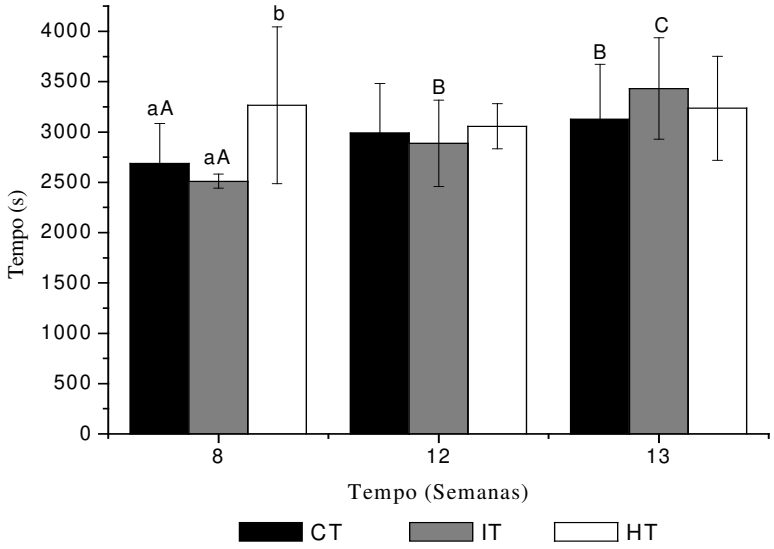


Figura 4: Tempos médios de exaustão nos testes de desempenho (CT: caseína-treinado, IT: isolado-treinado, HT: hidrolisado-treinado). Letra minúscula refere-se às diferenças dentro de uma mesma semana. Letra maiúscula refere-se às diferenças entre as semanas para o mesmo grupo.

Observou-se diferenças nos comportamentos dos animais ao longo das 13 semanas do experimento, razão pela qual a dispersão dos dados foi relativamente grande. Essas diferenças podem ser devida a vários fatores, dentre os quais o mais importante seria a individualidade bioquímica, implicada em respostas metabólicas não controladas e susceptibilidade variável às condições do experimento. Foi observada, por exemplo, alguma resistência de certos animais do grupo hidrolisado a aceitarem o exercício todos os dias. Nesses casos, o animal era instado a prosseguir, empurrando-o com o dedo, evitando assim qualquer estresse indesejado.

Tassi *et al*. (1998) em seu estudo com ratos submetidos à natação e alimentados com dietas contendo α-lactalbumina e um hidrolisado enzimático da mesma proteína encontraram que o proteolisado enzimático forneceu uma vantagem física ao animal exercitado, em relação à proteína intacta. O mesmo foi encontrado por Abecia-Socia (2003) e Pimenta *et al.* (2006), que realizaram o experimento com ratos submetidos ao treinamento físico em esteira, utilizando como fonte protéica para as dietas o isolado e hidrolisado do soro do leite com grau de hidrólise de 7,8% e verificaram que o grupo de animais treinados

que consumia dieta com hidrolisado obteve um melhor desempenho físico. Entretanto, estudo semelhante realizado por Ramos (2001) com ratos submetidos a treinamento e testes de natação e que consumiam um hidrolisado do soro do leite revelou que tais observações não se confirmavam. A explicação para tal divergência de resultados aparentemente está no grau de hidrólise, pois este processo determina o tamanho dos peptídeos que compõem os hidrolisados. A proteína utilizada por Tassi *et al*. (1998), Pimenta *et al*. (2006) e de Abecia-Soria (2003), tinham graus de hidrólise de entre 8 e 12%, enquanto que a proteína hidrolisada que Ramos (2001) utilizou tinha alto grau de hidrolise (~31%). O hidrolisado utilizado no presente experimento possuía ~13%.

DETERMINAÇÕES SANGUÍNEAS

Proteínas Séricas Totais e Albumina Sérica

Tabela 6: Concentrações de proteínas séricas totais e albumina sérica, obtidas para os seis grupos de ratos, 48 horas pós-exaustão.

	Grupos					
	CS	IS	HS	CT	IT	HT
Proteínas totais (g/dL)	$9,64^{bc}$ ± 0,74	$9,97^{c}$ ± 0,61	$9,11^{bc}$ ± 0,98	$6,23^{a}$ ± 0,24	$8,42^{b}$ ± 1,07	$9,54^{bc}$ ± 0,46
Albumina sérica (g/dL)	$11,16^{ab}$ ± 0,94	$10,99^{ab}$ ± 1,38	$10,36^{a}$ ± 1,70	$13,12^{bc}$ ± 3,33	$13,59^{c}$ ± 2,78	$13,78^{bc}$ ± 3,47

Os valores estão expressos em média e desvio padrão de 6 animais por grupo. Letras diferentes apresentam diferença estatística (maior valor encontrado de p = 0,046) entre as médias.

Proteínas Séricas Totais

Os efeitos das dietas sobre as proteínas totais séricas dos ratos treinados e sedentários estão ilustrados na Figura 5. Os valores de proteínas séricas encontrados foram da mesma ordem de grandeza dos encontrados em outros trabalhos realizados em nossos laboratórios. No estado sedentário, a concentração de proteínas séricas totais não apresentou mudança significativa no que diz respeito às dietas; isto é, não houve diferença entre as dietas sem haver a intervenção do exercício exaustivo, ou seja, uma situação que reflete o ensaio biológico clássico, com nenhuma ou mínima atividade física. Quando os animais treinados foram submetidos ao teste de exaustão, o grupo caseína-treinado mostrou queda significativa na concentração de proteínas séricas totais, ao passo que os grupos que consumiram as proteínas do soro mantiveram seus níveis. Conclui-se então que, mesmo 48 horas após a exaustão, o consumo das proteínas do lactossoro mostrava ser vantajoso na conservação do estado fisiológico normal do animal.

Fazendo as comparações para cada grupo, entre o estado sedentário e treinado, notou-se que, tanto a caseína, quanto o isolado, produziram diminuição no nível de proteínas séricas após a exaustão, enquanto que o hidrolisado não. Este resultado sugere que uma dieta a base de caseína, ou mesmo proteína do lactossoro, não previne a degradação das proteínas sanguíneas durante a forte demanda de energia no teste de exaustão.

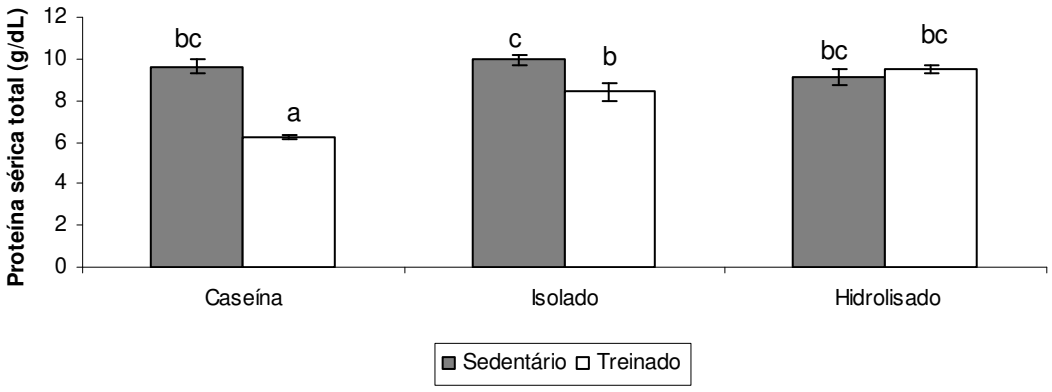


Figura 5: Concentração de proteínas séricas totais (g/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 6 animais por grupo.

Pimenta *et al.* (2006) também observaram que a dieta com hidrolisado preservou os níveis de proteínas totais durante a exaustão, enquanto que a dieta com isolado não atingiu tal beneficio. Já entre os sedentários, os diferentes tipos de dieta não tiveram efeito nos níveis de proteínas séricas, sugerindo novamente que nas condições de reclusão sedentária, diferenças entre as dietas não são perceptíveis ao pesquisador.

Albumina Sérica

Quanto aos níveis de albumina sérica, observa-se que não houve diferença significativa entre todos os grupos sedentários, sendo que a caseína foi a proteína da dieta que produziu o mais alto nível de albumina sérica, como mostrado na Tabela 6 e Figura 6. No caso dos treinados, nota-se que também não houve diferença significativa entre as três dietas, após 48 horas de repouso. Quando a atividade física e a exaustão foram considerados, todos grupos mostraram aumento nos níveis de albumina, sendo que o grupo isolado-treinado foi maior que o isolado-sedentário e, analogamente, o hidrolisado-treinado foi maior que o hidrolisado-sedentário. Portanto neste experimento, o treinamento e a exaustão favoreceram o aumento dos níveis de albumina sérica.

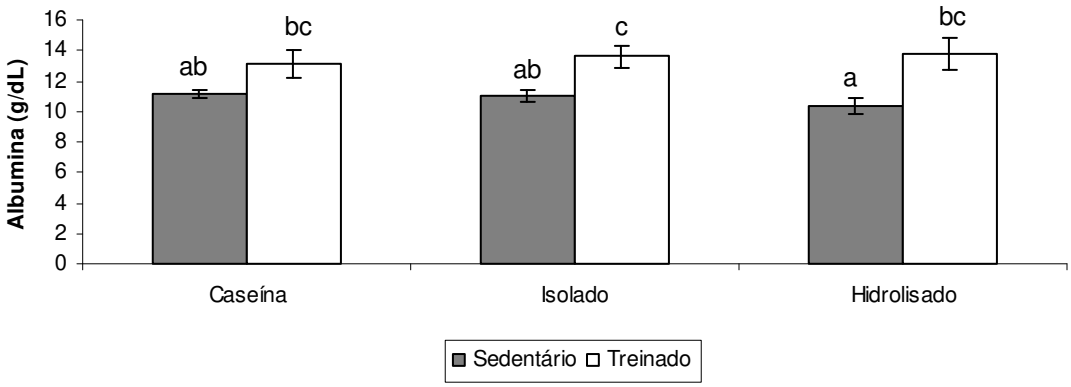


Figura 6: Concentração de albumina sérica (g/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 6 animais por grupo.

Tassi *et al.* (1998), trabalhando com ratos treinados submetidos a dietas com caseína, proteína α-lactalbumina intacta e hidrolisada, observaram valores superiores de albumina sérica para os ratos alimentados com um hidrolisado da α-lactalbumina.

Pimenta *et al.* (2006) encontraram que a dieta com hidrolisado foi mais eficaz em manter os níveis de albumina sérica, já a dieta com isolado não foi capaz de preservar os níveis de albumina, havendo uma diferença significativa dentro das categorias sedentários, treinados-exaustos. Portanto, verificou-se que a dieta com hidrolisado foi sempre mais eficaz em preservar os níveis de albumina sérica, mesmo depois de um período de recuperação de 48 horas.

O presente estudo encontrou resultados divergentes com os encontrados por Tassi *et al*. (1998) provavelmente devido ao fato de que esses autores observarem os parâmetros séricos imediatamente após a exaustão, enquanto que os nossos dados se referem a um período posterior à recuperação de 48 horas. Durante esse período, o organismo devidamente alimentado tem a oportunidade de restaurar seus parâmetros fisiológicos. No trabalho de Pimenta *et al*. (2006), a não concordância pode ser explicada pela diferença de idade dos animais que, além de serem mais novos nesse trabalho, os nossos tiveram treinamento durante 9 semanas, em comparação às 4 de Pimenta *et al*. (2006). Assim, os animais do nosso experimento, a atividade física melhorou os níveis de albumina, para as dietas de isolado e hidrolisado, enquanto no trabalho de Pimenta *et al*. (2006), as dietas tiveram efeito e o exercício, não.

Lactato Sanguíneo

Com as concentrações de lactato sanguíneo, as medidas foram obtidas na última semana, no último dia de treinamento, ou seja, antes da atividade física exaustiva dos grupos treinados, com o objetivo de avaliar o impacto da dieta durante o treinamento diário, e não, após a exaustão. Tassi *et al.* (1998) e Pimenta *et al.* (2006), já tinham demonstrado que o consumo da dieta com hidrolisado trazia a vantagem de amortecer a elevação dos níveis de lactato no soro de ratos jovens submetidos à exaustão. O efeito redutor dos níveis de lactato foi observado tanto nos animais treinados-exaustos, quanto nos simplesmente

treinados. Foi interessante perceber, ainda naquele estudo, que as diferenças entre as concentrações dos animais sedentários que consumiram o hidrolisado e aqueles que consumiram o isolado foram da mesma ordem de grandeza daquelas encontrada nos treinados.

Nesta ocasião, porém, decidimos estudar a evolução dos níveis de lactato ao longo do treinamento do dia, no final de nove semanas de treinamento. Por um lado, o acúmulo de lactato dos animais sedentários não mostrou ter sido afetado pela dieta, embora, a média dos alimentados com o hidrolisado tenha mostrado ser mais baixa do que os alimentados com caseína ou isolado. Já, observando os animais treinados, no início do exercício, foi notado que o treinamento pregresso tinha produzido elevação dos níveis de lactato, com relação aos sedentários, embora, apenas os alimentados com o hidrolisado mostravam níveis significativamente superiores. É provável que, tanto a idade dos animais, quanto o prolongado regime de atividade física tenham influído nos resultados, mostrando pouca ou nenhuma diferença entre as diferentes dietas, com relação ao acúmulo de lactato sanguíneo após um período de repouso. É importante ressaltar que os níveis de lactato aqui encontrados foram considerados normais para as duas categorias de animais em repouso.

Tabela 7: Lactato sérico, em repouso, obtido para os diferentes grupos de ratos.

	Repouso (Tempo 0)					
Grupos	CS	IS	HS	CT	IT	HT
Lactato (mmol/L)	1,94 [a] ± 0,78	2,08 [a] ± 0,88	1,66 [a] ± 0,68	2,20 [ab] ± 0,78	2,07 [ab] ± 0,86	2,76 [b] ± 0,81

Os valores estão expressos em média e desvio padrão de 12 animais por grupo. Letras diferentes apresentam diferença estatística (maior valor encontrado de $p = 0,030$) entre as médias.

Já, as concentrações de lactato sanguíneo dos grupos treinados, medidas em vários momentos ao longo e após um treino na última semana, mostraram que, para os grupos isolado e hidrolisado, não há influencia nem da dieta nem da duração da atividade física, visto que não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 8 e Figura 7). Com o treino e, na ausência do exercício exaustivo, as elevações do lactato foram moderadas,

sendo que para o grupo caseína a concentração de lactato manteve-se constante durante todo o treino, aumentando significativamente após 1 hora do término da atividade física, com retorno à concentração inicial 1 hora mais tarde.

Tabela 8: Concentração de lactato sanguíneo (mmol/L), em diferentes momentos, obtido para os grupos treinados.

Lactato (mmol/L)	Tempo 0	Após 30 min	Após 1 h de AF	Após 1 h do término da AF	Após 2 h do término da AF
CT	$2,20^{A}$ ± 0,78	$1,71^{A}$ ± 0,46	$1,43^{aA}$ ± 0,21	$2,80^{B}$ ± 0,54	$1,91^{A}$ ± 0,82
IT	2,07 ± 0,86	1,85 ± 0,54	$1,91^{ab}$ ± 0,66	2,34 ± 0,66	2,08 ± 0,95
HT	2,57 ± 0,52	2,18 ± 0,64	$2,01^{b}$ ± 0,41	2,55 ± 0,40	2,42 ± 0,87

Os valores estão expressos em média e desvio padrão de 12 animais por grupo. Letras diferentes apresentam diferença estatística (maior valor encontrado de p = 0,033) entre as médias. Letras maiúsculas correspondem às linhas; as minúsculas, às colunas.

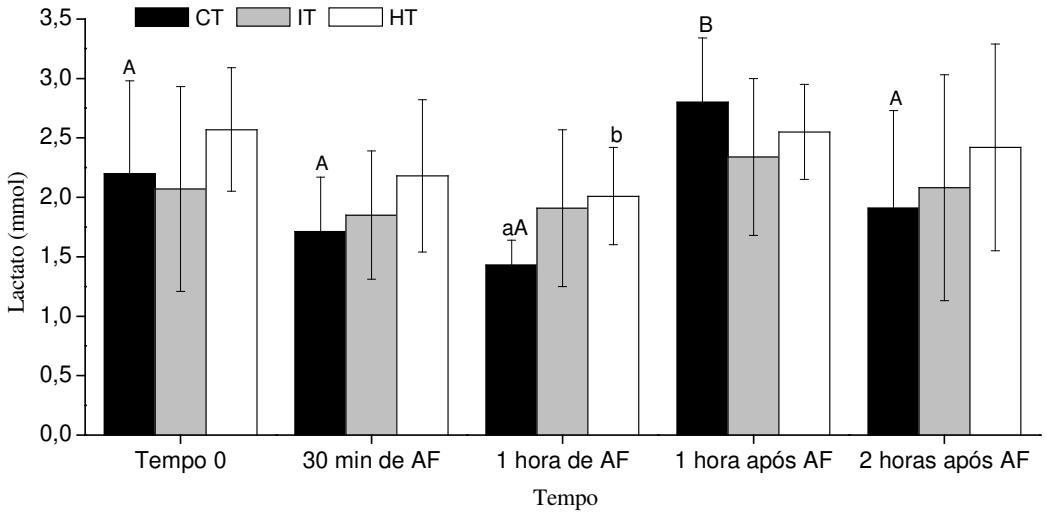


Figura 7: Concentração de Lactato sanguíneo (mmol/L) nos diferentes momentos, para os grupos treinados (média ± desvio padrão). Letras maiúsculas diferentes correspondem às médias, nos diferentes tempos para o mesmo grupo e letras minúsculas diferentes correspondem entre os diferentes grupos para o mesmo tempo.

O lactato é um intermediário metabólico vantajoso entre as formas de estoque de carboidrato (glicose e glicogênio) e produtos metabólicos finais (CO_2 e H_2O). A vantagem do lactato como intermediário metabólico é que este se difunde rapidamente entre os compartimentos teciduais, possui baixo peso molecular, não requer insulina para seu transporte e atravessa a barreira celular da membrana mediante o transporte facilitado (BROOKS, 1991). O aumento dos níveis de lactato sanguíneo é fenômeno comum na resposta do organismo ao exercício físico agudo, imputado por alguns como sendo decorrente do aumento da velocidade glicolítica, que não é acompanhada de utilização (oxidação) de piruvato na mitocôndria, ou na síntese de glicose (redução), resultando assim na produção e acúmulo de lactato (HOLLOSZY; BOOTH, 1976; GOBATTO, 1993; WASSERMAN; BEAVER; WHIPP, 1986).

Além disso, o lactato sanguíneo é um bom indicador da intensidade do exercício, uma vez que, em humanos, suas concentrações circulantes refletem a razão entre a sua produção e remoção, seja por oxidação ou por redução (BROOKS, 1986).

A avaliação da concentração de lactato sanguíneo foi efetuada como uma medida capaz de fornecer indicação acerca da intensidade de exercício imposta aos animais (KESKINEN *et al.*, 1989).

Pimenta *et al.* (2006) encontraram que, nos ratos jovens que consumiram o isolado, os valores de lactato foram superiores aos que consumiram o hidrolisado. Deve ser mencionado, porém, que estes animais que consumiram o hidrolisado atingiram seu ponto de exaustão muito tempo depois que os do grupo do isolado, havendo, portanto desenvolvido um trabalho expressivamente maior. Não há possibilidade de comparar os nossos resultados com aqueles de Pimenta *et al*. (2006), tendo em vista que os protocolos de treinamento e o momento das medições, além das idades dos animais, foram diferentes.

Gallani (1995) verificara que há elevação significativamente menor dos níveis de lactato sanguíneo em ratos treinados, em comparação com sedentários, quando submetidos ao exercício, comprovando o fato de que o exercício físico regular contribui para a adaptação de lactato pelo músculo durante a atividade de contração.

Kokubun (1990) já havia concluído anteriormente que as análises bioquímicas do lactato sanguíneo realizadas em sessões de exercício agudo de natação, com sobrecarga fixa

e progressiva, evidenciaram flutuações muito grandes dos níveis de lactato sanguíneo, tanto nos ratos treinados como nos sedentários.

A literatura relata também haver efeito do treinamento físico submáximo no sentido de diminuir as concentrações de ácido lático para uma mesma sobrecarga de trabalho (FOX *et al.,* 1991; COGGAN *et al.,* 1993; AZEVEDO, 1994). Por outro lado, existem resultados de diversos estudos recentes, que mostram haver aumento na concentração de lactato sanguíneo em indivíduos treinados. Jacobs (1986), por exemplo, sugeriu que há um aumento na capacidade de transporte de lactato da fibra muscular para a circulação sanguínea em indivíduos treinados, o qual pode explicar a elevação rápida dos níveis séricos. OYONO-ENGUELLE *et al.* (1990) também demonstraram em indivíduos bem condicionados haver aumento da concentração de lactato sanguíneo devido à sua maior remoção do músculo durante o exercício agudo. O aumento de transporte do lactato do tecido muscular para o sangue foi verificado por Roth (1991), estudando ratos submetidos a treinamento de velocidade e endurance.

Sendo assim, pode se concluir que a resposta do organismo ao processamento metabólico do lactato gerado durante o exercício dependerá de vários fatores, dentre os quais a forma em que a proteína dietética é fornecida poderá ter influência sem, no entanto, estar sujeita ao tipo de protocolo de exercício, idade do animal e tempo transcorrido, após finalização do exercício.

A Tabela 9 mostra os resultados das determinações sanguíneas de triacilglicerol, colesterol total e frações e ácidos graxos livres, para os diferentes grupos.

Tabela 9: Parâmetros sanguíneos obtidos para os diferentes grupos de ratos.

	Grupos					
	CS	IS	HS	CT	IT	HT
Triacilglicerol (mg/dL)	142,33 ^{d} ± 22,25	157,30^{cd} ± 98,62	151,69^{cd} ± 67,45	116,55^{c} ± 59,09	61,06 ^{a} ± 8,76	44,41 ^{b} ± 20,18
Colesterol Total (mg/dL)	143,47 ^{abc} ± 19,38	141,96^{abc} ± 19,94	121,38^{ab} ± 24,16	121,08 ^{a} ± 39,13	148,40 ^{abc} ± 26,15	158,18^{c} ± 19,23
LDL-colestrol (mg/dL)	73,38 ^{a} ± 17,59	74,19^{ab} ± 28,84	68,11 ^{a} ± 31,10	70,34 ^{a} ± 27,35	94,94^{ab} ± 16,89	104,95 ^{b} ± 18,22
HDL-colesterol (mg/dL)	45,16 ^{b} ± 8,08	34,14 ^{a} ± 6,87	33,59 ^{a} ± 9,53	46,33^{b} ± 11,26	47,69 ^{b} ± 9,45	45,49 ^{b} ± 9,79
Relação LDL/HDL	1,64 ± 0,51	2,26 ± 0,87	1,97 ± 0,76	1,54 ± 0,43	2,06 ± 0,35	1,98 ± 1,27
Ácidos Graxos Livres (mmol/L)	1,18 ^{abc} ± 1,18	1,31 ^{c} ± 0,50	0,85 ^{b} ± 0,20	0,78 ^{ab} ± 0,22	0,66 ^{a} ± 0,15	0,63 ^{a} ± 0,20

Os valores estão expressos em média e desvio padrão de 12 animais por grupo. Letras diferentes apresentam diferença estatística (maior valor encontrado de p = 0,046) entre as médias.

Triacilglicerol

Conforme pode ser visto na Tabela 9 e a Figura 8, ficou evidente que a atividade física exerce uma grande influência na concentração de triacilgliceróis, já que houve diferença significativa entre todos os grupos sedentários e treinados (p = 0,046 caseína; p = 0,046 isolado; p = 0,001 hidrolisado), observando-se que, com a atividade física, houve diminuição substancial dos níveis de triacilgliceróis para todas as proteínas. Além disso, observou-se que, dentre os grupos treinados, também se registrou influência devida aos tipos de proteína, sendo os níveis mais baixos encontrados nos animais que consumiram as proteínas do

lactossoro, e dentre essas duas dietas, o menor valor de todas correspondeu à dieta com hidrolisado do soro do leite (maior valor de $p < 0,004$). No entanto, deve-se ressaltar que a influência devida às dietas está associada à atividade física, visto que esta influência não ocorreu para os grupos sedentários.

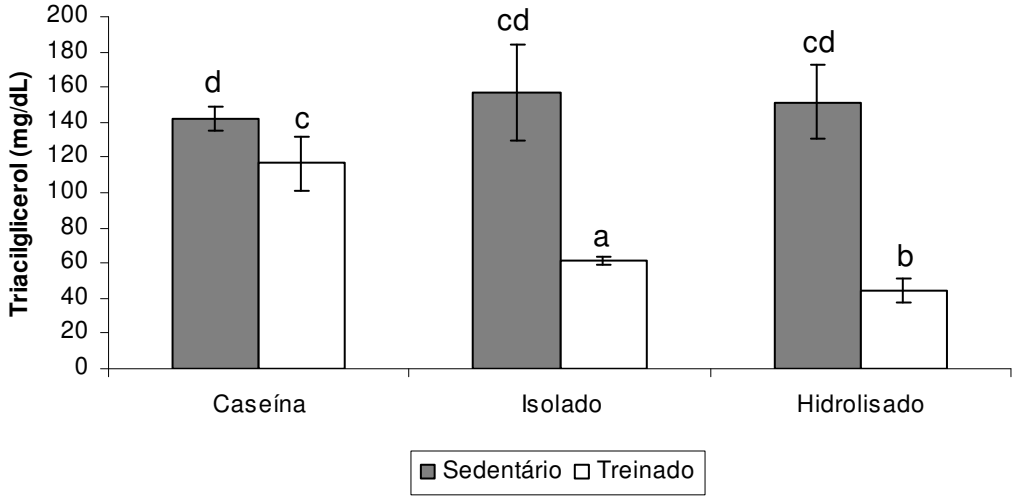


Figura 8: Concentração de Triacilglicerol (mg/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

Abecia-Soria (2003) verificou em seu experimento que os grupos que foram alimentados com isolado de soro de leite apresentaram concentrações menores de triacilglicerol do que os que foram alimentados com hidrolisado de soro de leite, independente da atividade física. No entanto, observou diferença significativa entre os grupos isolado-treinado e hidrolisado-treinado. Estes resultados, de uma forma geral sugerem que a menor diminuição dos triacilgliceróis nos animais que receberam o hidrolisado pode significar um melhor preparo do organismo para o estado metabólico acelerado.

As concentrações de triacilgliceróis também podem ser influenciadas por outros fatores. Morifuji; Aoyama (2002), por exemplo, realizaram estudo com ratos machos alimentados com dieta contendo caseína ou proteína da soja durante 14 dias e concluíram que a proteína de soja diminui o nível de triacilgliceróis hepáticos quando comparado com

a caseína, os autores atribuíram este efeito a diferenças na composição de aminoácidos entre a proteína da soja e da caseína.

Morifuji *et al*. (2005a) realizam estudo com 28 ratos machos alimentados com dieta contendo caseína ou proteína do soro de leite e foram divididos em grupos treinados e sedentários. O treino consistia de natação, seis vezes por semana durante duas horas, tendo duração de duas semanas. Os pesquisadores concluíram que as duas dietas não tiveram efeito significativo no nível de triacilglicerol sérico, glicose, insulina e glucagon.

Colesterol Total

Em geral, a atividade física não exerceu influência sobre o nível de colesterol total, já que não houve diferença significativa entre os blocos de treinados e sedentários (menor valor $p > 0,092$), mas houve entre os grupos que consumiram o hidrolisado (HS x HT, $p = 0,021$). Neste caso, o grupo treinado apresentou um nível de colesterol total maior, conforme visto na Tabela 9 e na Figura 9. Com relação às dietas, não houve diferença significativa dentre os sedentários (menor valor de $p > 2,58$). Por outro lado, dentre os treinados, houve diferença significativa entre os grupos caseína e hidrolisado ($p = 0,020$), sendo que o grupo hidrolisado apresentou o maior nível de colesterol total. Além disso, nota-se que o efeito da dieta com hidrolisado é o mesmo que o do isolado, uma vez que o valor de 'p' para a diferença entre estes grupos foi de $p = 0,951$.

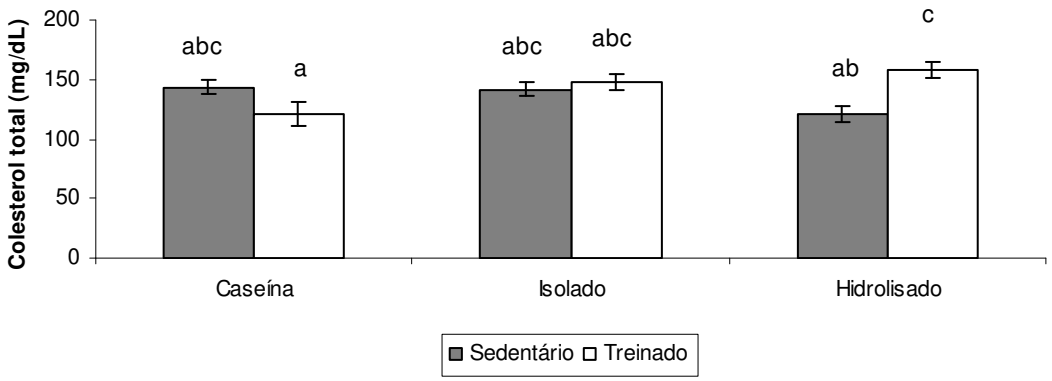


Figura 9: Concentração de Colesterol total (mg/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

Abecia-Soria (2003) não encontrou em seu estudo diferenças significativas na concentração de colesterol entre nenhum dos grupos analisados, podendo concluir que o tipo de exercício não teve influência sobre este parâmetro estudado. Resultados similares foram achados por NAGAOKA *et al.,* 1991; ZHANG; BEYNEN, 1992; RAMOS, 2001.

Segundo Nagaoka *et al.* (1991), o tipo e a quantidade de proteína podem influenciar a concentração de colesterol sérico. As proteínas de origem animal geralmente exercem um efeito hipercolesterolemiante, quando comparadas com as de origem vegetal, podendo causar diferentes graus de hipercolesterolemia.

Nagaoka *et al.* (1992) realizaram estudos com ratos, comparando os efeitos das proteínas do soro de leite com a de soja, e verificando que as concentrações de colesterol e lipídios totais foram significativamente diminuídas nos grupos alimentados com as proteínas do soro de leite, em comparação aos grupos alimentados com as proteínas de soja.

Jacobucci *et al.* (2001) realizaram estudo com ratos e verificaram efeito positivo na redução do colesterol sanguíneo, semelhante àquela produzida pela proteína de soja, mas contrário ao do grupo alimentado com caseína, o qual mostrou aumentar a lipidemia hepática e a colesterolemia sanguínea.

Colesterol Frações

Com relação à fração LDL-colesterol, dentre o grupo sedentário observa-se que a dieta não teve influência, já que não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 1$), conforme ilustrado na Tabela 9 e na Figura 10. Entretanto, dentre o grupo treinado constata-se que houve diferença significativa apenas entre os grupos caseína e hidrolisado ($p = 0,025$), sendo que o grupo hidrolisado apresentou um valor 48% maior que o do grupo caseína. Com relação à atividade física, nota-se que esta não exerceu grande influência no nível de LDL-colesterol, visto que não houve diferença significativa entre os blocos dos grupos sedentários e dos treinados ($p > 0,3$), exceto para aqueles alimentados com o hidrolisado, tendo o grupo treinado apresentado um valor 52% maior que o do que seu correspondente sedentário ($p = 0,010$).

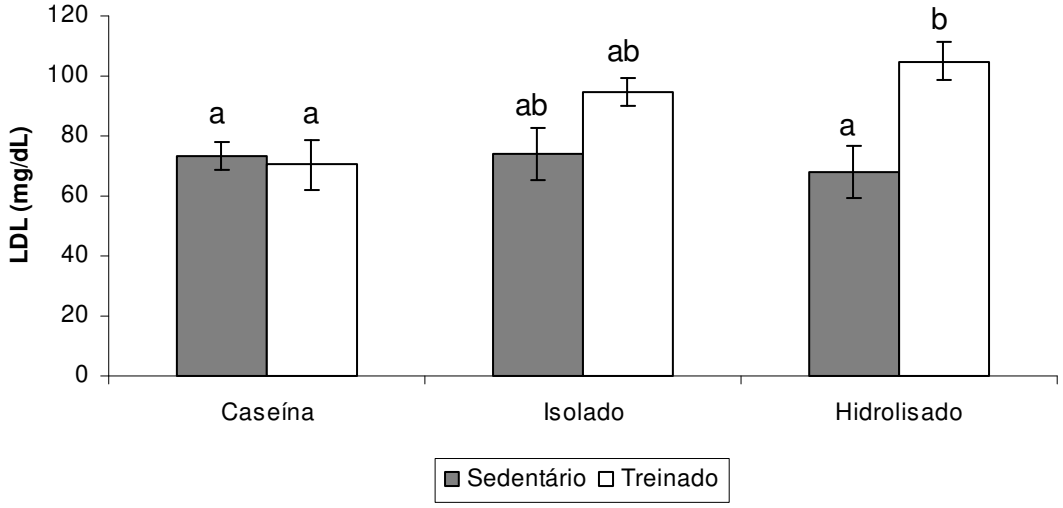


Figura 10: Concentração de LDL-colesterol (mg/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

O grupo hidrolisado-treinado apresentou maior concentração desta fração que o grupo caseína-treinado por razão de a sua dieta conter maior concentração lipídica (Tabela 9 e na Figura 10). Entretanto, essa não poderia ser uma explicação, visto que a dieta do grupo isolado-treinado possuía teor de gordura inferior ao da dieta de caseína.

Desde que a atividade física não afetou os níveis de LDL-colesterol nos grupos alimentados com isolado e caseína e, tendo em vista que as dietas não afetaram estes níveis para o grupo sedentário, poder-se-ia concluir que o aumento do LDL-colesterol observado no grupo hidrolisado-treinado encontra-se em algum outro determinante bioquímico, sensível, tanto à dieta com hidrolisado, quanto a atividade física.

Com relação à fração HDL-colesterol na categoria dos sedentários, observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos isolado e hidrolisado ($p = 1$), conforme Tabela 9 e Figura 11, embora a diferença entre o grupo caseína e demais ($p = 0,21$ isolado; $p = 0,17$ hidrolisado) tenha sido significativa, cabendo à caseína a maior concentração. No caso do conjunto dos treinados, observa-se que o tipo de dieta não exerceu influência no nível de HDL-colesterol ($p > 0,990$). Com relação à atividade física, nota-se que esta sim exerceu grande influência no nível de HDL-colesterol, visto que houve diferença significativa entre

os blocos dos sedentários e dos treinados (p = 0,037 isolado; p = 0,029 hidrolisado), tendo os grupos treinados apresentado maiores concentrações. Contudo, não se observou o mesmo resultado para o grupo caseína, já que este não apresentou diferença significativa com relação à atividade física (p = 1).

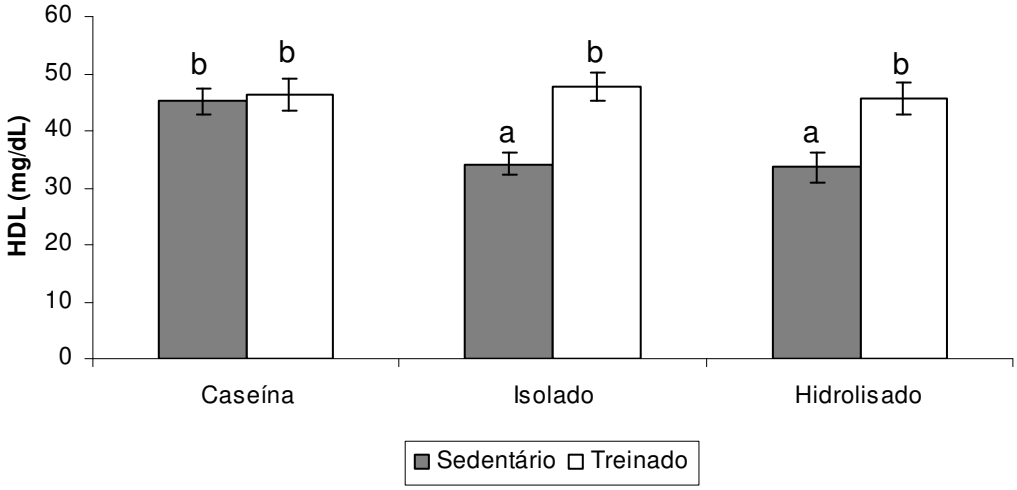


Figura 11: Concentração de HDL-colesterol (mg/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

É importante salientar que os aumentos nas frações LDL, causados pelo consumo das proteínas do soro do leite, não devem comprometer os atributos positivos para a saúde associados a esta classe de proteínas, visto que tais aumentos foram compensados por aumentos das frações HDL, de tal forma que a relação LDL-colesterol/HDL-colesterol permaneceram praticamente da mesma ordem que foi observada no grupo controle (caseína-sedentário).

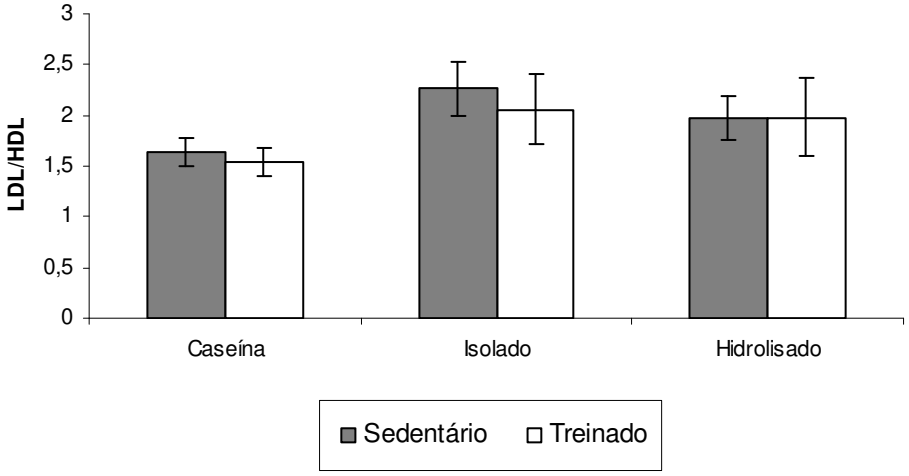


Figura 12: Concentração de LDL/HDL nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

Sautir *et al.* (1983) estudaram por 7 semanas o efeito de dietas contendo 23% de proteínas do soro de leite (whey protein S70), caseína, ou proteínas de soja ou de girassol, em ratos sedentários. Esses autores observaram que os níveis de colesterol total nos ratos com 10 semanas de vida foram mais altos nos animais que receberam a dieta contendo caseína, do que a dieta com proteína do soro de leite. Verificaram também que os níveis de colesterol sérico total e de HDL-colesterol foram idênticos nos grupos alimentados com proteína de soro, girassol ou soja. Contudo, o colesterol hepático foi significativamente mais baixo nos ratos em dieta com proteína de soro, em comparação às demais. Esta aparente divergência com os nossos resultados pode ser devida à composição da dieta, especialmente da proteína. Enquanto as dietas de Sautir et al. foram formuladas com maior conteúdo protéico, e a proteína continha 30% de material não protéico ou aminoacídico, os nossos produtos continham apenas entre 6% (isolado) e 19% (hidrolisado) desses constituintes. Aqueles autores, ainda, não relataram as relações LDL/HDL, enquanto que no nosso caso, os valores dessa razão não se alteraram significativamente.

Ácidos Graxos Livres (AGL)

Em geral, a proteína hidrolisada da dieta teve influência nos níveis de ácidos graxos livres (AGL) no sangue, especialmente para os ratos sedentários. Os níveis de AGL foram mais elevados nos ratos sedentários do que naqueles que foram submetidos ao protocolo de treinamento, sendo que para os treinados, as proteínas da dieta não tiveram nenhuma influência. Ainda, observou-se que o consumo das proteínas inteiras promoveu um maior acúmulo de AGL do que no caso da proteína hidrolisada.

Registrou-se diferença significativa devida ao exercício para os grupos isolado e hidrolisado (IS x IT, p = 0,001; HS x HT, p = 0,026), tendo ocorrido uma redução de aproximadamente 50% para o grupo isolado e de 26% como resultado do treinamento, conforme mostrado na Tabela 9 e na Figura 13. Contudo, a queda para o grupo caseína entre os grupos treinados e sedentários não foi significativa (p = 0,786). No que se refere às dietas, é pertinente mencionar que as proteínas não tiveram influência quando houve intervenção do treinamento (p > 0,074). O valor de p para a diferença entre os grupos isolado e hidrolisado foi de 0,003.

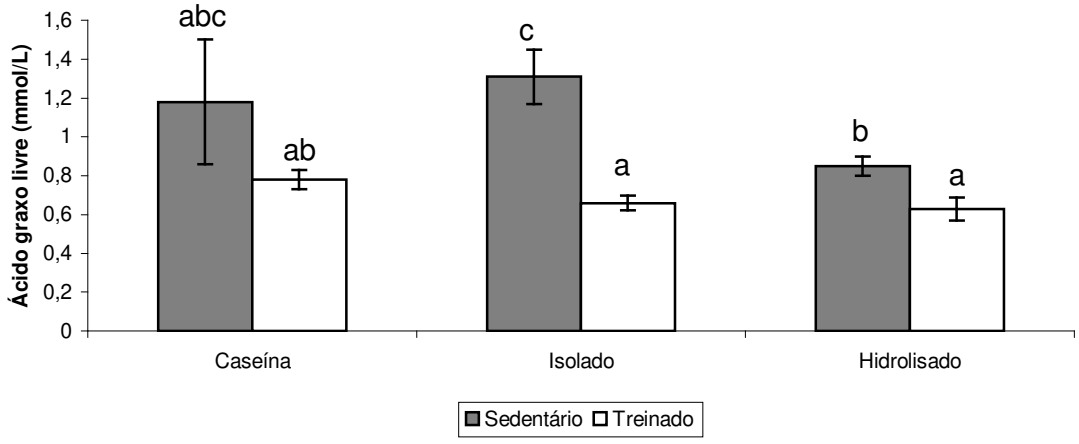


Figura 13: Concentração de ácidos graxos livres (mmol/L) nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

Abecia-Soria (2003) não encontrou diferença significativa nos níveis séricos de AGLs, 48 horas após exaustão, como resultado da forma de apresentação da proteína (inteira ou hidrolisada) nas dietas de ratos sedentários, treinados e treinados, levados à exaustão. Por outro lado, os grupos isolado-sedentário e isolado-treinado possuíam quase a mesma concentração de AGL, mas quando estes foram comparados com o grupo isolado-exaustão, observou-se uma diminuição significativa deste último, obtendo a média mais baixa de todos os grupos. Os dados levam à conclusão que, com exceção da exaustão, a atividade física realizada não teve influência sobre tal parâmetro.

Segundo Costill *et al.* (1977) a concentração sérica de AGL aumentada está relacionada com a diminuição da utilização do glicogênio, enquanto que o decréscimo nos AGL pode resultar na depleção das reservas de glicogênio. Nas fases iniciais do exercício vigoroso, o organismo utiliza os triacilgliceróis do músculo esquelético para suprir a falta de glicose e, somente depois de uma ou mais horas de exercício, o sistema apela aos estoques lipídicos do tecido adiposo (HOLLOSZY e KOHRT, 1996). Os níveis mais elevados de AGL encontrados na categoria sedentários do nosso experimento podem ser interpretados de acordo com as informações acima, como sendo a expressão do baixo consumo de ácidos graxos do músculo ou dos adipócitos, por razão dos tipos de proteína ou da atividade, especificamente, quando comparamos a proteína do lactossoro hidrolisada com a não hidrolisada. Na sua condição intacta, a proteína induziu à maior concentração de AGL, do que no caso da proteína hidrolisada. Por sua vez, a atividade física trouxe uma evidente diminuição nos níveis de AGL, sem haver diferença entre as proteínas.

Os resultados obtidos estão em concordância com os resultados de Tassi *et al.* (1998), que encontraram maiores concentrações de ácidos graxos livres nos grupos sedentários do que nos treinados.

Gobatto (1993) também verificou que as concentrações plasmáticas de ácidos graxos em ratos alimentados com dietas normoprotéicas, após 12 horas de jejum e em repouso, apresentaram valores mais elevados nos animais do grupo sedentário, do que nos grupos treinados. O autor interpretou os resultados observados nos animais dos grupos treinados como resultado provável da maior oxidação de AGL, em resposta ao treinamento físico. Porém, como não foram realizadas análises dos conteúdos plasmáticos hormonais, resta a dúvida de se as concentrações circulantes de epinefrina e ACTH, possivelmente

aumentadas após jejum de 12 horas, não devessem elevar a atividade lipolítica nos adipócitos dos animais treinados, resposta amplamente relatada na literatura como adaptativa ao exercício físico regular. Coerente com a explicação fornecida para a reduzida concentração sanguínea de AGL nos animais treinados é a maior glicemia observada nesses animais (Tabela 10). A elevada concentração sanguínea de glicose resultaria na menor liberação de AGL do tecido adiposo, como resultado do aumento da disponibilidade de glicerol-3-P, base para a reesterificação dos AGL (NEWSHOLME; LEECH, 1989). Essa explicação justifica a redução plasmática dos AGL, mas não elucida a hiperglicemia observada nos grupos treinados.

Glicose e Insulina

A Tabela 10 mostra as médias das determinações sanguíneas de glicose e insulina, para os diferentes grupos. Os resultados foram obtidos nas semanas 12 e 13. Na semana 12, o sangue foi extraído 24 horas após o término do treinamento. Já, na semana 13 a amostra de sangue foi obtida 48 após o treinamento, sendo que nessa semana os animais foram expostos a um nível de atividade física 100% maior que na semana 12.

Tabela 10: Parâmetros médios de glicose e insulina séricas, nas semanas 12 e 13 do experimento, obtidos para os diferentes grupos de ratos.

	Grupos					
	CS	IS	HS	CT	IT	HT
Glicose 12°Semana (mg/dL)	$98,70^{abc}$ ± 17,65	$127,92^{c}$ ± 22,16	$84,90^{aA}$ ± 15,37	118^{bc} ± 15,11	$116,97^{bc}$ ± 21,71	$94,90^{abA}$ ± 28,25
Glicose 13°Semana (mg/dl)	$110,17^{ab}$ ± 13,30	$100,40^{a}$ ± 32,70	$121,08^{abB}$ ± 21,93	$127,83^{b}$ ± 18,74	$125,93^{b}$ ± 12,71	$135,09^{bB}$ ± 28,41
Insulina 12°Semana (ng/mL)	$2,20^{bA}$ ± 1,10	$2,64^{b}$ ± 1,63	$1,89^{ab}$ ± 1,30	$1,28^{ab}$ ± 0,69	$0,93^{ab}$ ± 0,64	$0,30^{a}$ ± 0,17
Insulina 13°Semana (ng/mL)	$4,84^{bB}$ ± 2,05	$3,24^{b}$ ± 2,12	$1,72^{a}$ ± 1,61	$1,10^{a}$ ± 0,49	$1,50^{a}$ ± 1,27	$0,76^{a}$ ± 0,75

Os valores estão expressos em média e desvio padrão de 12 animais por grupo. Letras minúsculas diferentes na horizontal representam diferença estatística entre as médias na mesma semana. Letras maiúsculas na vertical representam diferença estatística entre as médias das diferentes semanas.

Glicose Sérica

Conforme ilustrado na Tabela 10 e na Figura 14, em geral pode-se dizer que a resposta dos animais na semana 12 diferiu da resposta da última semana, apenas para o grupo hidrolisado, independente de serem treinados ou sedentários e, lembrando que na semana 13, os animais executaram o dobro do esforço que na semana anterior. Destaque-se, porém que no que se refere à interferência de dieta no nível de glicose do conjunto dos sedentários, não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,226$), exceto que o grupo isolado e hidrolisado na semana 12 ($p = 0,013$). Dentre o conjunto treinado, verificou-se também que não houve influência do tipo de dieta na concentração de glicose sanguínea, tanto para a semana 12, quanto para a 13.

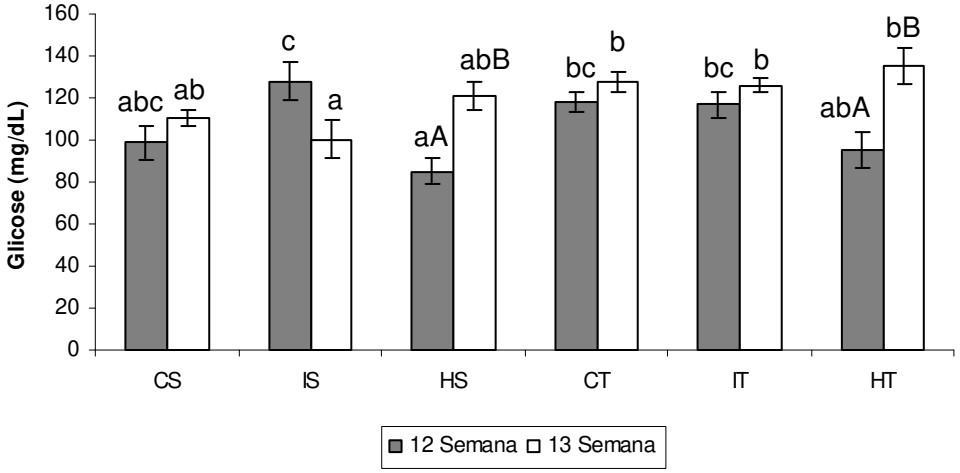


Figura 14: Concentração de glicose sanguínea (mg/dL) nas semanas 12 e 13 do ensaio biológico, nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

Com relação à atividade física, observa-se que, em geral, esta não exerceu influência sobre a concentração de glicose sanguínea, já que não houve diferença significativa entre o conjunto dos grupos treinado e sedentário, tanto na semana 12, quanto na 13 ($p > 0,005$), exceto para os grupos alimentados com dieta contendo isolado do soro do leite e, somente na 13 semana ($p = 0,042$), tendo o grupo treinado apresentado um valor aproximadamente 25% maior do que o do grupo sedentário.

A análise da evolução do nível de glicose entre a semana 12 e a 13, indica que houve um aumento significativo deste parâmetro de uma semana para outra, apenas para o grupo hidrolisado ($p < 0,001$), independente do nível de atividade física. O fato não é relatado na literatura e a sua relevância fisiológica também não é conhecida, mas é claramente um resultado associado ao tipo de proteína, tendo em conta que o fenômeno também foi observado com o grupo hidrolisado-sedentário. Pode-se dizer que o efeito foi conseqüência da dieta, mas, é possível que se trate de uma reação do organismo do animal ao tempo que transcorreu entre o treinamento e a tomada da amostra de sangue.

Gobatto (1993) realizou um estudo com ratos submetidos à natação e alimentados com caseína. Havia 3 grupos, sendo 1 sedentário, 1 treinado e 1 recuperado da desnutrição e treinado. O protocolo experimental durou 7 semanas, sendo a primeira de adaptação ao

exercício e as outras 6 de treinamento. O exercício era realizado durante 5 dias/semana sendo 30min com sobrecarga de 5% do peso corporal seguido de 30min sem sobrecarga. O sacrifício ocorreu após 48 horas de descanso. Ele verificou que a glicemia de repouso mostrou valores semelhantes nos animais treinados, porém significativamente maiores que a dos animais do grupo sedentário. Esses resultados estão em harmonia com os nossos, embora as condições pós treinamento dos animais do nosso experimento tenham sido diferentes.

Em estudo de Pimenta *et al.* (2006), não foi encontrada diferença significativa nas glicemias dos ratos em resposta às dietas. No caso dos grupos hidrolisado-sedentário e hidrolisado-exausto, por exemplo, os autores não encontraram diferença significativa. É necessário lembrar, porém, que no estudo de Pimenta *et al.*, as amostras de sangue dos ratos foram obtidas 48 horas após a última sessão de exercício exaustivo, sendo que no nosso caso, além das 48 horas, os animais passaram por novo treinamento, antes de retirar a amostra.

Ramos (2001) também não verificou diferença significativa para os níveis de glicose (24h após a exaustão), entre os grupos de ratos em treinamento físico submetidos à dieta com concentrado protéico de soro de leite, e seu hidrolisado de grau de hidrolise alto. Enquanto que Tassi *et al.* (1998) verificaram diferença entre os resultados dos ratos que consumiram dieta com hidrolisado, sendo para esses os níveis de glicose sérica sempre maiores que dos ratos alimentados com a proteína intacta, ou que a caseína. Porém, em seu estudo, essa autora determinou todos os seus parâmetros logo em seguida da exaustão. Deve ser lembrado que, no experimento de Ramos, as características do hidrolisado eram muito diferentes, tanto às de Tassi *et al*. (1998), quanto às do nosso experimento.

Morifuji *et al*. (2005b) realizaram estudo com 24 ratos machos que foram divididos em grupos sedentário e treinado, tendo cada grupo sido alimentado com dieta contendo caseína ou proteína do soro de leite. Os ratos do grupo exercitado foram treinados com natação durante duas semanas, seis vezes por semana e com tempo de duração de cada treino de 120 minutos. Os animais foram sacrificados 18 horas após o último treino. E verificaram que a concentração de glicose sérica foi significativamente menor no grupo treinado do que para os sedentários, porém o tipo de dieta não afetou este parâmetro.

Insulina

A partir dos resultados ilustrados na Tabela 10 e na Figura 15, nota-se que, na semana 12, o tipo de dieta não exerceu influência no nível de insulina, tanto para o grupo treinado, quanto para o sedentário, já que as diferenças não foram significativas entre os grupos. O mesmo resultado é observado na semana 13, exceto para o grupo hidrolisado-sedentário que foi significativamente menor que os outros grupos sedentários (p = 0,001 caseína; p = 0,036 isolado).

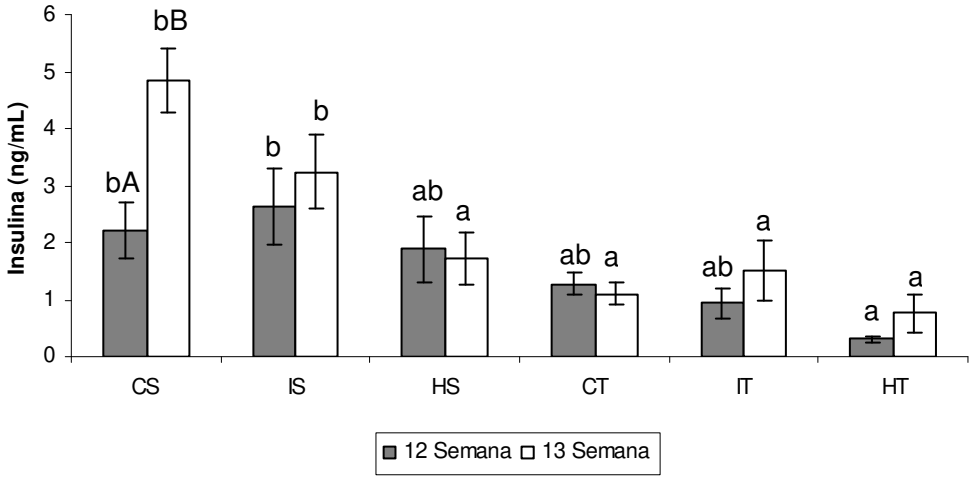


Figura 15: Concentração de insulina sanguínea (ng/mL) nas semanas 12 e 13 do ensaio biológico, nos diferentes grupos de atividade física e dietas. As amostras foram tomadas 24 horas, na 12 semana, e 48 horas pós-exercício, na 13 semana.Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

Com relação à atividade física, observa-se que, na semana 12, esta não exerceu influência sobre o nível de insulina, uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos alimentados com a mesma dieta, porém expostos a níveis de atividade física diferentes. Entretanto, na semana 13, os resultados apontaram diferença significativa entre o grupo caseína-sedentário e o caseína-treinado (p = 0,001), bem como entre o grupo isolado-sedentário e o grupo isolado-treinado (p = 0,044), tendo os grupos treinados apresentado valores substancialmente inferiores. Lembrando que a medida de insulina realizada na semana 12 foi feita 24 horas após o término da atividade física, enquanto que a realizada na semana 13 foi feita 48 horas após o término da atividade física, além dos

animais terem sido expostos a um nível de atividade física duas vezes maior do que aquele empregado na décima segunda semana.

Analisando a evolução do nível de insulina, da semana 12 para a 13, observa-se que em geral não houve diferenças significativas, independentemente do nível de atividade física, exceto para o grupo caseína-sedentário, que mostrou um acréscimo considerável ($p < 0,001$). Este resultado sugere que, enquanto a caseína é susceptível a aumentos insulinêmicos estimulados pela atividade física, as proteínas do soro do leite (isolado e hidrolisado) proporcionam maior estabilidade aos aumentos de nível provocados pelo exercício.

Nesse sentido, estes resultados estão de acordo com os de Abecia-soria (2003), que observou em seu estudo que o nível de atividade física não exerceu efeito na concentração de insulina circulante, embora não haja concordância quando a autora afirma que o hidrolisado promove a liberação de maiores quantidades de hormônio, particularmente para os grupos levados à exaustão e os sedentários.

Sabe-se que a ingestão de aminoácidos livres leva a um aumento da concentração de insulina, sendo que através dessa liberação os aminoácidos são retidos dentro da célula. Esse mecanismo difere do de outros hormônios, em que os aminoácidos não são necessariamente aproveitados dentro da célula.

É interessante notar que, se o fator determinante de uma maior secreção de insulina for a taxa de liberação de aminoácidos no sangue, o hidrolisado com alto grau de hidrolise deveria produzir um efeito insulinimiante maior do que outro, com grau de hidrólise menor. Entretanto, o que se observa é que o consumo do hidrolisado leva a concentrações sanguíneas de insulina menores ou iguais àquelas correspondentes ao isolado.

Farrel; Caston; Rodd; Engdahl (1992) sugeriram que a menor secreção de insulina em indivíduos treinados ocorria por adaptações próprias das células beta, independente de controle extrínseco. A diminuição do nível insulinêmico no repouso, em conseqüência do treinamento, pode estar ligada à maior sensibilidade periférica do hormônio.

Morifuji *et al*. (2005b) verificaram que a concentração de insulina sérica foi significativamente menor no grupo treinado do que para os sedentários, porém o tipo de dieta não afetou este parâmetro.

Anthony *et al*. (2007) realizaram estudo com ratos machos que foram divididos em sedentários e treinados, tendo cada grupo sido alimentado com dieta contendo somente carboidrato, carboidrato e proteína de soja ou carboidrato e proteína do soro do leite. Todos os ratos treinaram em esteira durante oito dias a 26 m/min durante 15 minutos e, após esta adaptação, os ratos que se recusavam a correr foram excluídos do experimento. Os ratos do grupo exercitado foram treinados em esteira durante um dia, com treino de 120 minutos, a 26m/min. Os animais foram gavados com as dietas correspondentes aos grupos e foram sacrificados 2 horas após a gavagem. Os autores verificaram que a concentração de insulina sérica uma hora após o exercício físico foi significativamente maior para os grupos treinados do que para o grupo sedentário, independentemente do tipo de dieta. A concentração no grupo alimentado com proteína do soro do leite foi significativamente maior do que para o grupo alimentado com carboidrato somente, e o alimentado com carboidrato mais proteína de soja obteve a concentração de insulina intermediária.

DETERMINAÇÕES TECIDUAIS

Os valores médios dos teores de glicogênio muscular e de proteína muscular, obtidos a partir de amostras de tecidos de animais treinados e sedentários, alimentados com os três diferentes tipos de dieta, estão descritos nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Conteúdo, após 48 horas de descanso, de glicogênio muscular (gastrocnêmio), glicogênio hepático e glicogênio no coração.

	Grupos					
	CS	IS	HS	CT	IT	HT
Glicogênio Gastrocnêmio (g/100g de tecido)	$0,07^{a} \pm 0,03$	$0,15^{b} \pm 0,04$	$0,13^{ab} \pm 0,13$	$0,06^{a} \pm 0,03$	$0,08^{a} \pm 0,06$	$0,22^{c} \pm 0,07$
Glicogênio Miocárdio (g/100g de tecido)	$0,08^{a} \pm 0,05$	$0,09^{a} \pm 0,06$	$0,14^{b} \pm 0,06$	$0,06^{a} \pm 0,05$	$0,06^{a} \pm 0,03$	$0,06^{a} \pm 0,04$
Glicogênio Hepático (g/100g de tecido)	$0,79^{b} \pm 0,45$	$0,65^{ab} \pm 0,38$	$0,55^{ab} \pm 0,34$	$0,29^{a} \pm 0,25$	$0,55^{ab} \pm 0,35$	$0,38^{ab} \pm 0,28$

Os valores estão expressos em média e desvio padrão de 12 animais por grupo. Letras diferentes apresentam diferença estatística entre as médias.

Glicogênio no Gastrocnêmio

Após o jejum de 12 horas, a concentração de glicogênio no músculo gastrocnêmio dos animais sedentários, conforme ilustrado na Tabela 11 e na Figura 16, não foi influenciada pelo fato de a proteína do soro do leite estar hidrolisada ou inteira na dieta (isolado e hidrolisado), uma vez que não houve diferença significativa entre estes grupos. Contudo, o grupo isolado apresentou uma concentração duas vezes maior de glicogênio do que o grupo caseína (p = 0,001). Para o conjunto dos treinados, o grupo alimentado com o hidrolisado apresentou uma concentração de glicogênio quase três vezes maior do que os grupos alimentados com isolado e caseína (p = 0,001; p = 0,001 respectivamente).

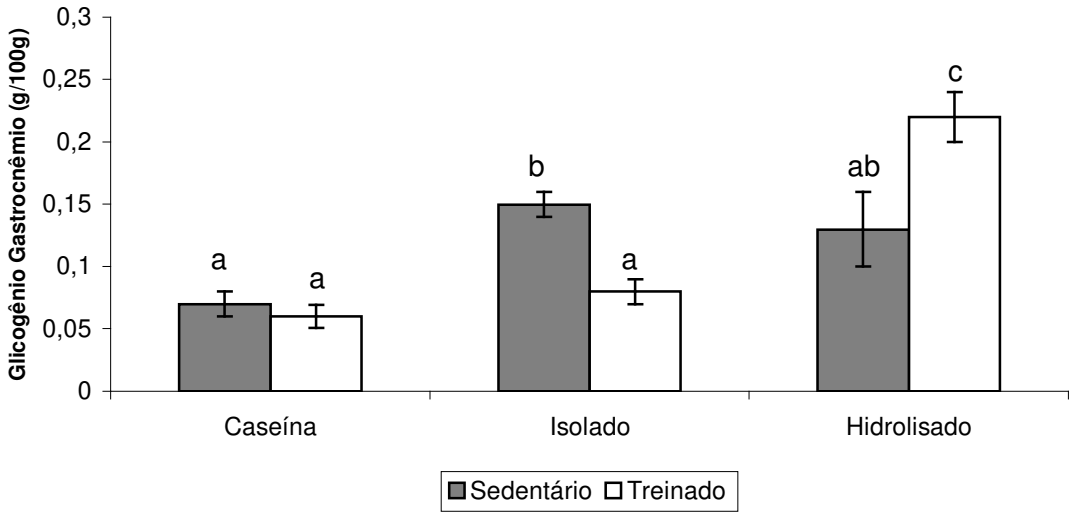


Figura 16: Concentração de glicogênio no gastrocnêmio (g/100g), nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

Com relação ao efeito da atividade física no teor de glicogênio, após 24 horas de repouso e mais 12 de jejum, observa-se que o treino diminuiu a concentração de glicogênio para o grupo isolado (p = 0,010), enquanto que o animal que consumiu o hidrolisado registrou aumento dos estoques (p = 0,035). Enquanto isso, a atividade física não exerceu efeito sobre a concentração de glicogênio nos animais alimentados com caseína (p = 0,712).

O aumento dos níveis de glicogênio nos animais do grupo HT deveria ser entendido como sendo o resultado de um sistema que produz trabalho com maior eficiência do que os animais dos grupos CT e IT, de tal forma que, no final do período de recuperação, foi possível para o primeiro mostrar superioridade na forma de um maior estoque de glicogênio. Tanto o aumento da concentração de glicogênio para o grupo hidrolisado treinado, quanto a diminuição para o grupo isolado treinado, porém, podem ser considerados como sendo resultado da combinação da atividade física com a dieta, não sendo possível analisar a parcela de influência que cabe a cada um deles.

Comparando o isolado com o hidrolisado após a recuperação, observou-se que o aumento registrado na concentração de glicogênio do gastrocnêmio dos animais treinados que consumiram o hidrolisado (HT) ocorreu na direção contrária à diminuição do grupo que consumiu o isolado (IT). Esse comportamento levou-nos a concluir que a velocidade de reposição dos estoques normais de glicogênio promovida pelo consumo do isolado foi menor que aquela promovida pelo hidrolisado. Note-se também que o comportamento do grupo isolado foi semelhante ao do grupo caseína.

A depleção de glicogênio depende da intensidade e duração do exercício imposto. Contudo, o treinamento por longos períodos tende a promover alterações metabólicas, resultando numa maior facilidade de formar maiores estoques de glicogênio muscular em grupos treinados, em relação a animais sedentários (HASHIMOTO *et al*., 1982; AZEVEDO, 1994).

Tassi *et al.* (1998) atribuiram a maior concentração de glicogênio muscular pós-exaustão encontrada no grupo consumindo dieta com o hidrolisado, a uma gliconeogênese hepática aumentada, que pouparia o glicogênio muscular e liberaria mais glicose para o plasma.

Pimenta *et al.* (2006) verificaram que, após período de recuperação de 48 horas, não se registrava diferença significativa entre os grupos, seja quanto aos tipos de dieta (hidrolisado e isolado) ou quanto aos níveis de atividade física. A não detecção de um efeito nos estoques de glicogênio muscular neste caso, muito provavelmente se deve ao fato de que, durante o período de recuperação os dois grupos de animais tiveram tempo suficiente para repor seus estoques normais. Entretanto, este é um tema que deve ser investigado mais em detalhe para descartar a influência do tipo de proteína.

Por outro lado, Abecia-Soria (2003) encontrou em seu estudo que os grupos sedentários alimentados com os dois tipos de proteínas (hidrolisado e isolado) tiveram concentrações finais de glicogênio muscular significativamente inferiores às dos grupos que foram submetidos à atividade física. Segundo a autora, este resultado era esperado, visto que a atividade física influência positivamente ao acúmulo de glicogênio muscular pós-recuperação.

Luciano; Rostom de Mello (1998) realizam experimento com ratos Wistar, onde o treinamento consistiu de natação com sobrecarga equivalente a 2% do peso corporal por 1h/dia durante cinco dias por semana, durante 4 semanas, sendo os grupos controle-sedentário, controle-treinado, diabético-sedentário e diabético-treinado. O sacrifício ocorreu após 48 horas de repouso. Os autores encontraram que o glicogênio no músculo gastrocnêmio aumentou em função do treinamento físico nos grupos controle e diabético.

Segundo Taylor, 1972; Ericksson, 1973, o treinamento físico aumenta a atividade enzimática e o conteúdo de glicogênio muscular, melhorando a resistência à fadiga por evitar a queda nos níveis de glicose circulante.

Os efeitos do treinamento no glicogênio hepático também são conhecidos. Farrel *et al*. (1992) avaliaram, os teores de glicogênio hepático e muscular visando confirmar a eficácia do treinamento sobre as reservas desse substrato. Com relação ao fígado, no entanto, esses autores observaram apenas diminuição das reservas em voluntários diabéticos, sem alterações decorrentes do treinamento. É importante lembrar, ainda, que os transportadores de glicose (GLUTs) do tecido hepático se comportam diferentemente daqueles do tecido muscular e, portanto, as respostas ao treinamento físico deverão ser previsivelmente diferentes nos dois tecidos. Houve maior acúmulo de glicogênio muscular nos diabéticos treinados, em comparação com os controles treinados, o qual foi relacionado pelos autores com os níveis séricos elevados de ácidos graxos livres, normalmente encontrados em diabéticos. A baixa utilização da glicose no diabético, somada à maior utilização dos AGL, impede a glicogenólise, promovendo a poupança do glicogênio.

Morifuji *et al*. (2005b) realizaram estudo com 24 ratos machos que foram divididos em grupos sedentário e treinado, tendo sido cada grupo alimentado com dieta contendo caseína ou proteína do soro de leite. Os ratos do grupo exercitado foram treinados em natação durante duas semanas, seis vezes por semana e com tempo de duração de cada

treino de 120 minutos. Os animais foram sacrificados 18 horas após o último treino. Os autores verificaram que houve um aumento no conteúdo de glicogênio muscular para os animais treinados e que o grupo alimentado com proteína do soro de leite teve reserva significativamente maior de glicogênio muscular, quando comparado com o grupo treinado que consumiu a caseína.

Glicogênio no miocárdio

De modo geral foi observado que o tipo de proteína na dieta teve pouca influência nos estoques de glicogênio miocárdico. Dentre o conjunto dos sedentários, porém, o grupo de animais que consumiu a dieta contendo o hidrolisado registrou aumento significativo da concentração de glicogênio (p = 0,035 X caseína; p = 0,048 X isolado), conforme pode ser visto na Tabela 11 e na Figura 17.

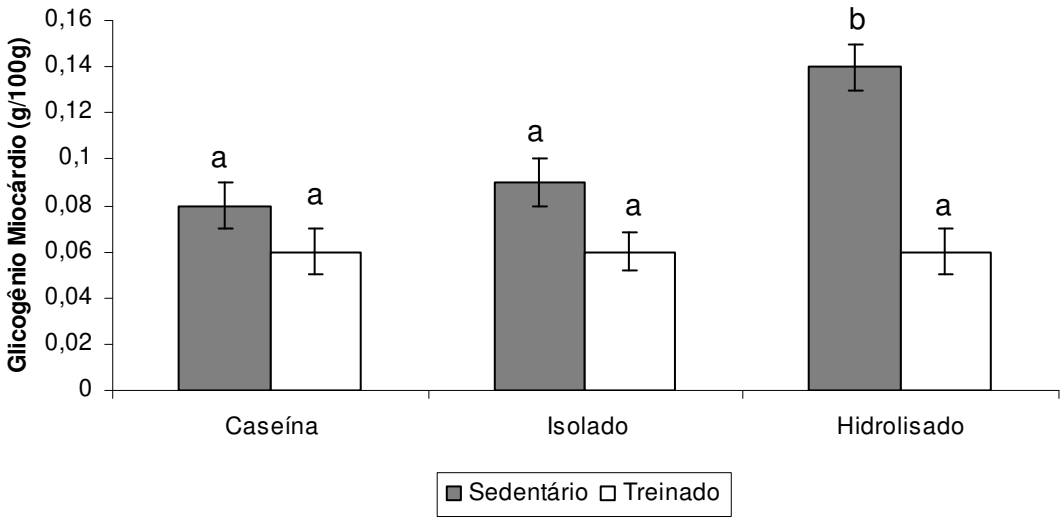


Figura 17: Concentração de glicogênio no miocárdio (g/100g), nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

Por sua vez, com relação à atividade física, observa-se que o treinamento produziu uma diminuição expressiva e significativa (p = 0,001) da concentração de glicogênio nos

animais alimentados com o hidrolisado, até alcançar concentrações da mesma ordem que as produzidas pela caseína e o isolado. Tanto o aumento quanto a diminuição do glicogênio miocárdico são evidentemente resultado da interação dos dois fatores, sendo que tanto o significado do aumento, quanto o mecanismo da diminuição, deverão permanecer sem esclarecimento até que seja conduzida uma pesquisa com esse objetivo.

Abecia-soria (2003) verificou que apenas os animais que foram submetidos à exaustão tiveram aumento significativo nos estoques de glicogênio do miocárdio. O treinamento, por si só, já teve efeito significativo na concentração de glicogênio do músculo cardíaco. Segundo a autora, o significado deste achado pode ser de importância para a fisiologia do miocárdio, visto que a proteína hidrolisada aumentou a capacidade de estocagem de glicogênio, além do aumento causado pelo treinamento. Ainda deve ser levado em consideração o fato do que os animais alimentados com hidrolisado e submetidos à exaustão realizaram 2,6 vezes mais trabalho do que aqueles que consumiram a proteína intacta. Porém não houve interação entre o estado da proteína na dieta e o nível de atividade física.

Segundo Bianchi; Grossi; Bargossi (1997), o exercício intenso e prolongado leva a uma diminuição intramuscular do conteúdo de glicogênio, que está associado com aumento do IMP e amônia através da enzima AMP desaminase. Esta formação de IMP, inversamente relacionada com o nível de glicogênio, parece estar também associada ao estresse metabólico, desde que o nível de IMP também foi relacionado ao lactato muscular e ao decréscimo de fosfocreatina. Assim, o exercício prolongado até a depleção do glicogênio muscular, está associado à deficiência energética e a aos teores dos nucleotídeos de adenina (ROSSI; TIRAPEGUI, 1999).

Glicogênio Hepático

Com relação ao tipo de dieta, observa-se na Tabela 11 e na Figura 18 que, tanto os animais sedentários quanto os treinados acabaram com estoques semelhantes de glicogênio no fígado. Já, com relação à atividade física, os animais caseína-treinado mostraram média final significativamente inferior aos animais caseína-sedentário ($p = 0,005$).

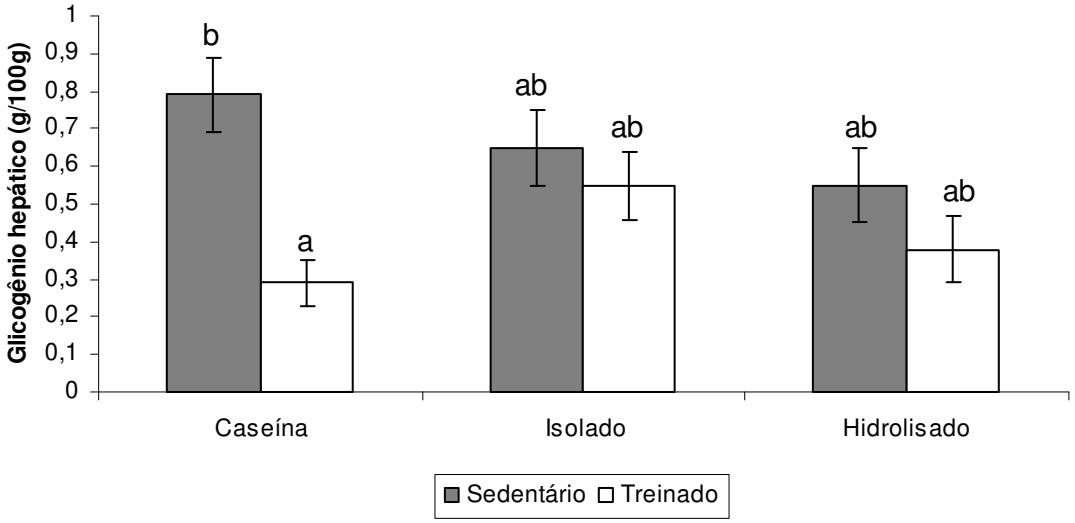


Figura 18: Concentração de glicogênio hepático (g/100g), nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

A primeira interpretação deste resultado é a de que o consumo da dieta contendo as proteínas do soro do leite (hidrolisadas ou não) suportou o metabolismo acelerado do protocolo de treinamento, permitindo a remanescência de um saldo positivo nos estoques de glicogênio, após um período de recuperação de 48 horas. Uma outra possibilidade é a de as proteínas do soro terem promovido a ativação do sistema glicogênio sintase, permitindo assim a ressíntese do glicogênio em taxas mais elevadas do que se registrou com a caseína.

Abecia-Soria (2003) em sua pesquisa com animais sedentários, treinados e treinados-exauridos, encontrou diferenças significativas na concentração de glicogênio hepático, sendo maior nos grupos que consumiram a dieta com hidrolisado do que os alimentados com isolado do soro de leite. Os animais dos grupos isolado-sedentário e hidrolisado-sedentário foram os que apresentaram menores estoques de glicogênio hepático, sendo o grupo isolado o que apresentou a mínima concentração. Já, o grupo treinado que consumiu a dieta com hidrolisado mostrou maior acúmulo de glicogênio hepático. Observou também que a exaustão não resultou em depleção do glicogênio para os animais que consumiram a dieta com isolado. Já, a dieta com hidrolisado a exaustão levou uma diminuição do

glicogênio. Foi possível observar que houve interação entre as dietas e entre o nível de atividade, com exceção do isolado treinado e exausto.

Ramos (2001), por sua vez, realizou um estudo com ratos submetidos à atividade física, os quais foram alimentados com hidrolisado de soro de leite de alto grau de hidrólise, em comparação com o isolado e a caseína. Ele não encontrou diferenças significativas entre as concentrações de glicogênio hepático, com relação às três dietas estudadas. Contudo, a dieta contendo o hidrolisado apresentou a menor concentração.

Gobatto (1993) verificou que o grupo treinado apresentou maior concentração de glicogênio hepático em relação aos animais do grupo sedentário. E relata que isso pode ter ocorrido devido aos ratos treinados terem seguido um protocolo de exercício 48 horas antes do sacrificio, o qual pode ter propiciado ao grupo treinado um maior aporte de lactato. Este precursor neoglicogênico é citado como um dos mais importantes substratos fornecedores de esqueleto de carbono necessário à síntese de glicogênio no fígado (KATZ; McGARRY, 1984). Isso poderia explicar os maiores teores de glicogênio nos grupos treinados, em relação aos sedentários. Gobatto (1993) verificou também nos animais treinados, a diferença embora ainda presente, não teve a mesma magnitude observada nos animais sedentários, não tendo diferença significativa. Desses achados, o autor ainda sugere que o treinamento físico tenha prevenido a depleção de glicogênio hepático em resposta ao exercício agudo.

Era esperada a ocorrência de depleção de glicogênio hepático em resposta a um estresse como o exercício agudo de natação, com a finalidade de manter a glicemia constante e garantir a oferta adequada de substrato energético na forma de glicose ao músculo em exercício (GALLANI, 1995).

Luciano; Rostom de Mello (1998) verificaram que houve redução das reservas de glicogênio hepático nos grupos diabéticos (41% e 38% nos DS e DT respectivamente), porém, não registranso-se influência do treinamento sobre esse parâmetro.

Segundo Azevedo (1994), após o exercício agudo de natação, houve aumento de glicogênio hepático nos animais treinados e uma menor depleção do mesmo em comparação aos sedentários. Entretanto, Morifuji *et al*. (2005b) verificaram que o conteúdo de glicogênio hepático no grupo alimentado com proteína do soro do leite e treinado foi significativamente maior do que o grupo alimentado com caseína e treinado.

Tabela 12: Conteúdo de proteína muscular (gastrocnêmio), proteína hepática e proteína do miocárdio.

	Grupos					
	CS	IS	HS	CT	IT	HT
Proteína Gastrocnêmio (mg/100mg de tecido)	11,28 ^{a} ± 0,91	12,42 ^{ab} ± 1,27	12,71 ^{b} ± 1,05	13,43 ^{b} ± 1,05	12,73 ^{b} ± 1,05	12,11 ^{ab} ± 1,69
Proteína Coração (mg/100mg de tecido)	10,93 ± 1,54	10,99 ± 1,32	10,80 ± 1,47	11,06 ± 1,43	11,58 ± 0,88	11,86 ± 1,06
Proteína Fígado (mg/100mg de tecido)	11,45 ^{a} ± 1,12	11,47 ^{a} ± 2,51	13,39 ^{bc} ± 1,83	13,39 ^{bc} ± 1,12	13,28 ^{b} ± 0,85	14,24 ^{c} ± 0,94
Peso Gastrocnêmio (g)	4,01 ± 0,24	3,72 ± 0,41	3,86 ± 0,32	3,79 ± 0,25	3,89 ± 0,24	3,86 ± 0,23
Peso Coração (g)	1,26 ^{b} ± 0,25	1,05 ^{a} ± 0,19	1,13 ^{ab} ± 0,13	1,05 ^{a} ± 0,08	1,09 ^{ab} ± 0,14	1,13 ^{ab} ± 1,21
Peso Fígado (g)	14,08 ^{b} ± 1,82	11,19 ^{a} ± 1,88	10,71 ^{a} ± 1,83	10,27 ^{a} ± 1,28	10,62 ^{a} ± 1,56	10,66 ^{a} ± 1,61

Os valores estão expressos em média e desvio padrão de 12 animais por grupo. Letras diferentes apresentam diferença estatística entre as médias.

Proteína Muscular (Gastrocnêmio)

Tanto a influência da dieta quanto do nível de atividade física na concentração de proteína no músculo gastrocnêmio podem ser apreciadas a partir dos resultados apresentados na Tabela 12 e na Figura 19. Dentre o grupo sedentário, não houve diferença significativa entre os grupos hidrolisado e isolado no que se refere à concentração de proteína ($p = 0,990$). No entanto, nota-se que há diferença para menor no caso dos animais alimentados com a dieta contendo caseína ($p = 0,001$), com relação ao hidrolisado. Dentre o conjunto dos treinados, constata-se que não houve influência do tipo de dieta sobre o parâmetro analisado ($p > 0,078$).

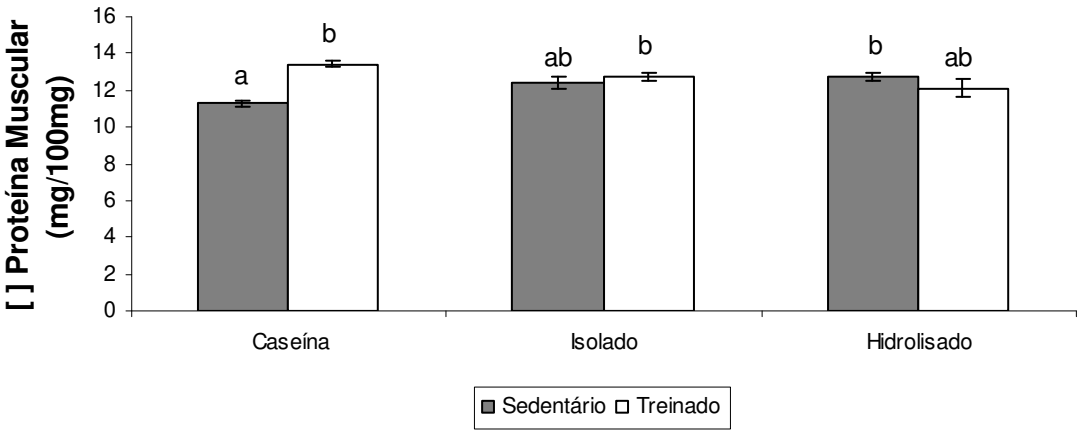


Figura 19: Concentração de proteína no gastrocnêmio (mg/100mg), nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

Com exceção para a caseína, a atividade física não exerceu nenhuma influência, quer sobre a concentração de proteína no órgão, quer sobre a quantidade de proteína por gastrocnêmio. Isto depreende-se do fato que em não havendo diferença entre as massas dos órgãos, as diferenças em concentração determinam as diferenças em conteúdo total entre os grupos.

Considera-se pertinente ressaltar que o exercício teve o efeito de aumentar a concentração de proteína muscular, o qual não foi verificado com nenhuma das dietas contendo a proteína do soro do leite. Esse resultado sugere que, no animal sedentário, a caseína proporciona condições bioquímico-nutricionais que garantem concentrações de proteína no gastrocnêmio um pouco inferiores àquelas proporcionadas pela proteína do soro do leite.

As proteínas do soro do leite têm sido apontadas por terem um efeito estimulador do aumento da massa muscular em certos casos, em relação ao exercício físico. Agin *et al.* (2001), por exemplo, trabalhando com portadores do HIV submetidos a atividade física e consumindo dieta com o soro do leite, observaram aumento no conteúdo de massa muscular. Pimenta *et al.* (2006), entretanto, verificaram que os níveis de proteína muscular, por grama de músculo, não mostraram alteração nem em função da dieta, nem em função

da atividade física. Tassi *et al.* (1998) e Ramos (2001) não observaram diferenças significativas no conteúdo de proteínas para os diferentes tipos de dietas, nem para os diferentes níveis de atividade física.

Embora salientado que o protocolo experimental de Pimenta *et al*. (2006) diferiu na sua menor duração, assim como outras diferenças com os protocolos de Tassi *et al*. (1998) e Ramos (2001), com os resultados do estudo atual, é possível afirmar que as proteínas do soro do leite não produzem aumento significativo na massa ou na proteína muscular do gastrocnêmio.

Proteína no Miocárdio

Como pode ser visto na Tabela 12 e na Figura 20, tanto o tipo de dieta quanto o nível de atividade física não influenciaram a concentração de proteína (g/100mg de tecido; menor valor de p = 0,268), mesmo tendo o grupo caseína-sedentário apresentado média de peso ligeiramente superior aos demais. Por outro lado, tendo em conta que a massa cardíaca dos animais alimentados com a caseína diminuiu com o exercício, pode se afirmar que o teor total de proteína do órgão teve uma diminuição nesse grupo. O significado deste achado não é evidente, já que não foram encontrados estudos na literatura que possam servir de base para a nossa discussão. Todavia, nota-se um comportamento oposto entre os teores de proteína de cada órgão, como resultado do exercício no grupo alimentado com a caseína. Enquanto houve um aumento na proteína total do gastrocnêmio, houve diminuição no teor cardíaco, mesmo considerando que, no primeiro caso, o aumento se deveu à elevação da concentração, enquanto, no segundo, a queda se deveu à diminuição da massa do órgão.

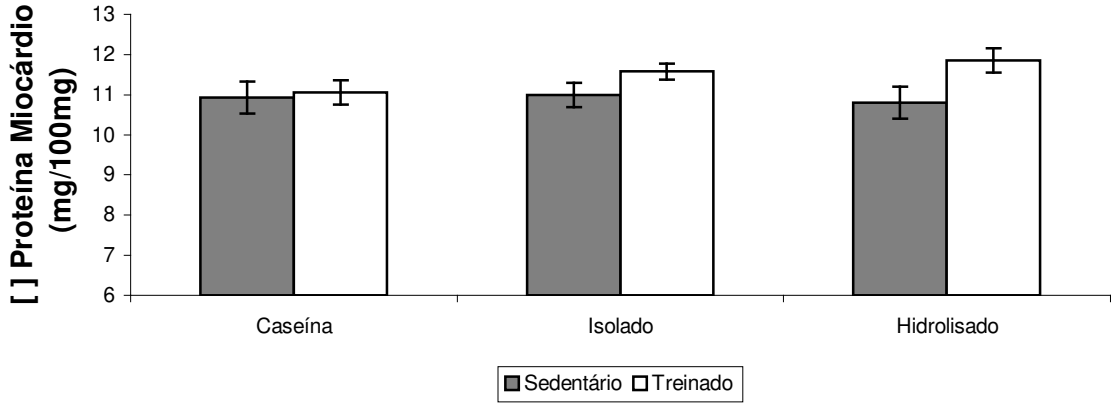


Figura 20: Concentração de proteína no miocárdio (mg/100mg), nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

Proteína Hepática

A Tabela 12 e a Figura 21 mostram que, dentre o conjunto dos sedentários, os fígados do grupo alimentado com hidrolisado apresentaram concentração média de proteína significativamente maior que a dos grupos caseína e isolado ($p = 0,010$; $p = 0,046$, respectivamente). Já no conjunto treinado ocorreu diferença significativa somente entre o grupo hidrolisado e o grupo isolado ($p = 0,014$). Avaliando as variações de outro ângulo, observa-se que a dieta caseína produziu os níveis mais baixos de proteína no fígado, mas, que o exercício propiciou um aumento para níveis compatíveis com os das outras proteínas. Além disso, cabe destacar a tendência a se obter uma concentração protéica hepática mais alta com o consumo da proteína hidrolisada do soro do leite do que com as outras proteínas da dieta. Tal tendência foi marcante após o animal ter sido submetido ao treinamento. Tendo em conta o fato de que os animais se encontravam em estado sadio até o final do experimento, o aumento da concentração protéica, acima do encontrado para a dieta padrão, não deverá ser entendido como fator negativo, senão como algo que deveria ser investigado mais a fundo.

O treinamento, por si só, mostrou uma influência no conteúdo de proteína no fígado, como foi observado para as dietas com a caseína e o isolado ($p = 0,001$; $p = 0,022$, respectivamente), ou seja, para as dietas elaboradas com as proteínas inteiras.

Na mesma Tabela 12, também pode ser visto o peso total do fígado, para cada um dos grupos. Observando que a massa média do fígado dos animais do grupo caseína-sedentário foi maior neste, do que em todos os demais grupos, poderia se pensar que a diferença seja devida aos demais componentes do fígado. Parte da explicação para este achado está no maior conteúdo de glicogênio encontrado no fígado dos animais do grupo caseína-sedentário, que foi 72% acima de aquele do animal treinado.

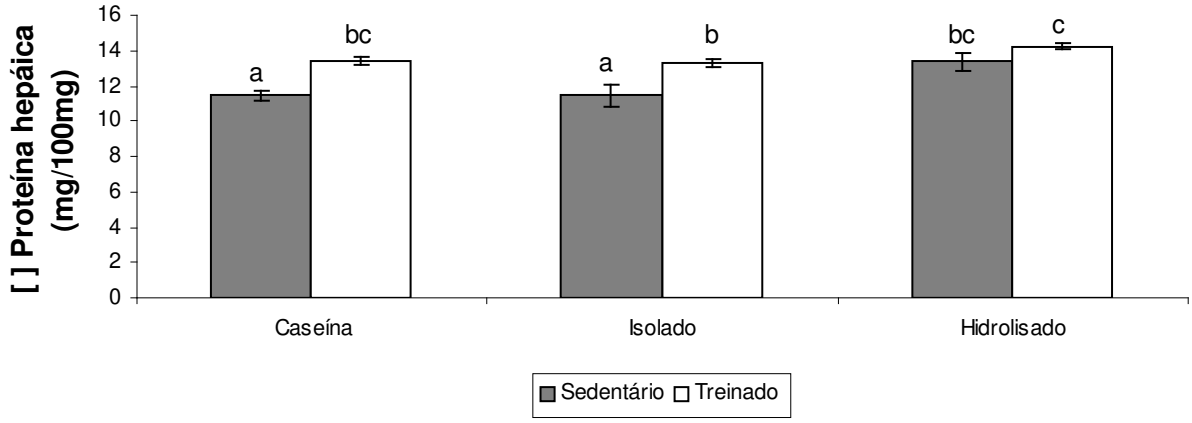


Figura 21: Concentração de proteína hepática (mg/100mg), nos diferentes grupos de atividade física e dietas. Valores correspondem à média (± erro padrão) dos dados obtidos de análise de 12 animais por grupo.

Kasperek *et al*. (1982) observaram haver perda de proteína total hepática em ratos adultos jovens (250g), quando submetidos ao treinamento físico exaustivo (esteira rolante 28m/min, sem inclinação, durante 180 minutos), em comparação a animais controle (sedentários). Os autores sugeriram que o exercício causava aumento da fragilidade mecânica e osmótica dos lisossomos, significativa perda de água hepática, glicogênio, proteína, fosfolipídeos e RNA hepáticos, perda de proteína solúvel e frações mitocondrial e microssomal, perda de atividade de enzimas mitocondrial e microssomal e cistólica, aumento no número vacúolos autofágicos e aumento no tamanho dos lisossomos do fígado. Juntos,

esses resultados sugeriam que o exercício causa degradação da proteína hepática, como resultado da autofagia e proteólise de material celular, de forma semelhante ao ocorrido em ratos jovens em jejum ou na ausência de insulina (PARREIRA, 1993).

A interpretação dos resultados apresentados no parágrafo anterior (KASPEREK *et al*., 1982; PARREIRA, 1993) não poderia ser por comparação direta com os nossos resultados, pois as condições experimentais dos referidos autores foram muito diferentes. Por um lado, as dietas utilizadas antes, ou logo depois, de 1993 não continham fibras e a composição em aminoácidos e algumas vitaminas faziam muita diferença no desempenho ponderal e metabólico do animal. Ainda, os animais utilizados nos dois experimentos anteriores eram mais jovens do que os da atual pesquisa.

Nossos resultados não apontam para a ocorrência de degradação ou autofagia protéica hepática, como resultado do treinamento e, sim, mais para um aumento, no caso da caseína ser a proteína da dieta, ou uma estabilidade do teor de proteína hepática, quando a proteína, como resultado do treinamento e esses dados foram consistentes com os demais parâmetros determinados.

2.5 CONCLUSÕES

O resultado do teste de desempenho mostrou que os animais que consumiram dieta com hidrolisado se destacaram por produzir um efeito máximo no primeiro teste de desempenho (8 semana) e manter o bom desempenho até o último teste, enquanto que os grupos alimentados com caseína e isolado apresentaram efeitos semelhantes entre si e só alcançaram o seu melhor desempenho no segundo teste.

Quanto à concentração de proteína sérica total, notou-se que o hidrolisado manteve o nível deste parâmetro mesmo após a exaustão, enquanto que a caseína e o isolado produziram diminuição no nível deste. Este resultado sugere que uma dieta a base de caseína, ou mesmo proteína do lactossoro, não previne a degradação das proteínas sanguíneas durante a forte demanda de energia no teste de exaustão.

Quanto aos níveis de albumina sérica, observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos alimentados com dietas diferentes, independentemente do nível de atividade física, o que mostra que a variável dieta não influência este parâmetro. Já, a variável atividade física exerce uma grande influência nos níveis de albumina sérica, uma vez que os grupos treinados mostraram aumento significativo nos níveis desta. Portanto neste experimento, o treinamento e a exaustão favoreceram o aumento dos níveis de albumina sérica.

Os grupos treinados apresentam níveis de triacilgliceróis significativamente inferiores aos dos grupos sedentários, independentemente do tipo de proteína. Além disso, observou-se, dentre os grupos treinados, a influência do tipo de proteína, sendo os níveis de triacilgliceróis mais baixos encontrados nos animais que consumiram as proteínas do lactossoro. Dentre essas duas dietas, o menor valor correspondeu à dieta com hidrolisado do soro do leite. No entanto, deve-se ressaltar que esta influência não foi observada para os grupos sedentários. Logo, sugere-se que há uma associação entre a atividade física e o tipo de dieta nos níveis de triacilgliceróis.

No que se refere ao colesterol total**,** a atividade física não exerceu influência sobre os níveis deste tanto para o grupo alimentado com isolado quanto para o alimentado com

caseína. No entanto, para o grupo alimentado com hidrolisado, os níveis de colesterol total foram significativamente mais elevados para o grupo treinado quando comparados aos do grupo sendentário. Com relação às dietas, somente houve diferença significativa entre os grupos caseína-treinado e hidrolisado-treinado, sendo que o grupo hidrolisado apresentou o maior nível de colesterol total.

Com relação à fração LDL-colesterol, dentre o grupo sedentário observa-se que a dieta não teve influência, por outro lado, dentre o grupo treinado houve diferença entre os grupos caseína e hidrolisado, sendo que o hidrolisado apresentou maior valor. Com relação a atividade física nota-se que está teve influencia nos grupos hidrolisados, sendo que o grupo treinado apresentou maior valor. É importante salientar que os aumentos nas frações LDL, causados pelo consumo das proteínas do soro do leite, não devem comprometer os atributos positivos para a saúde associados a esta classe de proteínas, visto que tais aumentos foram compensados por aumentos das frações HDL, de tal forma que a relação LDL-colesterol/HDL-colesterol permaneceram praticamente da mesma ordem que foi observada no grupo controle (caseína-sedentário).

No caso do grupo treinado, observa-se que o tipo de dieta não exerceu influência no nível de HDL-colesterol. Na categoria dos sedentários, observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos isolado e hidrolisado, embora tenha tido diferença entre o grupo caseína e os demais, cabendo à caseína a maior concentração. Com relação à atividade física, nota-se que esta sim exerceu grande influência no nível de HDL-colesterol, visto que houve diferença significativa entre o grupo sedentário e o treinado, independentemente do tipo de dieta, tendo os grupos treinados apresentado maiores concentrações.

Em geral, a proteína hidrolisada da dieta teve influência nos níveis de ácidos graxos livres (AGL) no sangue, especialmente para os ratos sedentários. Ainda, observou-se que o consumo das proteínas inteiras promoveu um maior acúmulo de AGL do que no caso da proteína hidrolisada.

A análise da evolução do nível de glicose entre a semana 12 e a 13, indica que houve um aumento significativo deste parâmetro de uma semana para outra, apenas para o grupo hidrolisado, independente do nível de atividade física.

Analisando a evolução do nível de insulina, da semana 12 para a 13, observa-se que em geral não houve diferenças significativas, independentemente do nível de atividade física, exceto para o grupo caseína-sedentário, que mostrou um acréscimo considerável. Este resultado sugere que, enquanto a caseína é susceptível a aumentos insulinêmicos estimulados pela atividade física, as proteínas do soro do leite (isolado e hidrolisado) proporcionam maior estabilidade aos aumentos de nível provocados pelo exercício.

Após o jejum de 12 horas, a concentração de glicogênio no músculo gastrocnêmio dos animais sedentários, não foi influenciada pelo fato de a proteína do soro do leite estar hidrolisada ou inteira na dieta (isolado e hidrolisado). Contudo, o grupo isolado apresentou uma concentração duas vezes maior de glicogênio do que o grupo caseína. Dentre o conjunto dos treinados, o grupo alimentado com o hidrolisado apresentou uma concentração de glicogênio quase três vezes maior do que os grupos alimentados com isolado e caseína. Observa-se que o treino diminuiu a concentração de glicogênio para o grupo isolado, enquanto que o animal que consumiu o hidrolisado registrou aumento dos estoques. Enquanto isso, a atividade física não exerceu efeito sobre a concentração de glicogênio nos animais alimentados com caseína.

De modo geral foi observado que o tipo de proteína na dieta teve pouca influência nos estoques de glicogênio miocárdico. Dentre o conjunto dos sedentários, o grupo de animais que consumiu a dieta contendo o hidrolisado registrou aumento significativo da concentração de glicogênio. Por sua vez, para o grupo treinado houve uma diminuição expressiva e significativa da concentração de glicogênio nos animais alimentados com o hidrolisado, até alcançar concentrações da mesma ordem que as produzidas pela caseína e o isolado.

Com relação ao tipo de dieta, tanto os animais sedentários quanto os treinados acabaram com estoques semelhantes de glicogênio no fígado. Já, com relação à atividade

física, os animais caseína-treinado mostraram média final significativamente inferior aos animais caseína-sedentário.

Com exceção da caseína, a atividade física não exerceu nenhuma influência tanto sobre a concentração de proteína no órgão quanto sobre a quantidade de proteína por gastrocnêmio. Considera-se pertinente ressaltar que o exercício teve o efeito de aumentar a concentração de proteína muscular, exceto para os grupos alimentados com dietas contendo a proteína do soro do leite.

Tanto o tipo de dieta quanto o nível de atividade física não influenciaram a concentração de proteína no miocárdio. Por outro lado, tendo em conta que a massa cardíaca dos animais alimentados com a caseína diminuiu com o exercício, pode se afirmar que o teor total de proteína do órgão teve uma diminuição nesse grupo. Todavia, nota-se um comportamento oposto entre os teores de proteína de cada órgão, como resultado do exercício no grupo alimentado com a caseína. Enquanto houve um aumento na proteína total do gastrocnêmio, houve diminuição no teor cardíaco, mesmo considerando que, no primeiro caso, o aumento se deveu à elevação da concentração, enquanto, no segundo, a queda se deveu à diminuição da massa do órgão.

Dentre o conjunto dos sedentários, os fígados do grupo alimentado com hidrolisado apresentaram concentração média de proteína significativamente maior que a dos grupos caseína e isolado. Já, no conjunto treinado ocorreu diferença significativa somente entre o grupo hidrolisado e o grupo isolado. Avaliando as variações de outro ângulo, observa-se que a dieta caseína produziu os níveis mais baixos de proteína no fígado, mas, que o exercício propiciou um aumento para níveis compatíveis com os das outras proteínas. Além disso, cabe destacar a tendência a se obter uma concentração protéica hepática mais alta com o consumo da proteína hidrolisada do soro do leite do que com as outras proteínas da dieta. Tal tendência foi marcante após o animal ter sido submetido ao treinamento. O treinamento, por si só, mostrou uma influência no conteúdo de proteína no fígado, como foi observado para as dietas com a caseína e o isolado, ou seja, para as dietas elaboradas com as proteínas inteiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABECIA-SORIA, M.I. **Efeitos da Alimentação sub-crônica do hidrolisado das proteínas do lactossoro em ratos sedentários e exercitados.** Campinas, 2003. p.23. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2003.

2. AGIN, D.; GALLAGHER, D.; WANG, J. *et al.* Effects of Whey protein and resistance exercise on body cell mass, muscle strength, and quality of life in women with HIV. **AIDS**, Philadelphia, v.15, p.2431-2440, 2001.

3. ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry,** Washington, v.20, n.4, p. 470-475, april, 1974.

4. ANTHONY, T.; McDANIEL, B.J.; KNOLL, P. *et al*. Feeding meals containing soy or whey protein after exercise stimulates protein synthesis and translation initiation in the skeletal muscle of male rats. **The journal of Nutrition,** v.137, n.2, p.357-362, 2007.

5. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis,** 15th ed. AOAC International, Arlington, Virginia, USA, 1995.

6. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis,** 16th ed. AOAC International, Arlington, Virginia, USA, 1997.

7. AZEVEDO, J.R.M. **Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados durante e após o exercício agudo de natação**. Campinas, 1994. Dissertação (Doutor em Fisiologia) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

8. BAHR, R. REJERSTED, O.M. Effect of feeding and fasting on excess postexercise oxygen consumption. **J. Appl. Physiol.,** v.71, p.2088-2093, 1991.

9. BIANCHI, G.P.; GROSSI, G.; BARGOSSI, A.M. May peripheral and central fatigue be correlated? Can we monitor them by means of clinical laboratory tools? **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness,** v.37, p.194-199, 1997.

10. BIOLO, G.; TIPTON, K.D.; KLEIN, S.; WOLFE, R.R. Na abundance supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism,** v.36, n.1, p.E122-129, 1997.

11. BIOLO,G.; WILLIAMS, B.D, FLEMING, R.Y.D et al. Insulin action on muscle protein kinetics and amino acid transport during recovery after resistance exercise. **Diabetes,** v.48, n.5, p.949-957.

12. BROOKS, G.A. The lactate shuttle during exercise and recovery. **Medicine Science in Sports and Exercise,** Indianapolis, v.18, p.360-368, 1986.

13. BROOKS, G.A. Current concepts in lactate exchange. **Medicine Science in Sports and Exercise,** Indianapolis, v.23, p.895-906, 1991.

14. BURKE, L. Sports foods: A new market for the food industry. **Food Austr.**, v.52, p.405, 2000.

15. CARL, A.B.; EDWARD, R.M.D.A. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry,** 2nd Ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p.1002-1081, 1994.

16. COGGAN, A.R.; SPINA, R.J.; KOHRT, W.M.; HOLLOSZY, J.O. Effect of prolonged exercise on muscle citrate concentration bedore and after endurance training in men. **Am. J. Physiol.,** v.264, p.215-220, 1993.

17. COSTILL, D.L.; COYLE, E.; DALSKY, G.; EVANS, W.; FINK, W.; HOOPES, D. Effects of elevated plasma FFA and insulin on muscle glycogen usage during exercise. **Journal of Applied Physiology**, Bestheda, v.43, p. 695-699, 1977.

18. DIETARY REFERENCE INTAKES. Dietary reference intakes for energy, carbohydrates, fiber, fat, protein and amino acids (macronutrients), p.10-71, 2002.

19. DOLE, V.P.; MEINERTZ, H. Microdetermination of Long-chain Fatty Acids in Plasma and Tissues. **The Journal of Biological Chemistry,** v.235, n. 9, 1960.

20. DOHM, G.L.; TAPSCOTT, E.B.; KASPEREK, G.J. Protein degradation during endurance exercise and recovery. **Medicine and Science in Sports and Exercise,** Madison, v.19, n.5, p.S166-S171, 1987.

21. DOUMAS, B.T.; WATSON, W. A.; BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol Green. **Clinica Chimica Acta**, Netherlands, v.31, n.1, p. 87-96, jan. 1971.

22. DUNCOMBE, W.G. **Clinica Chimica Acta**, v. 9, p.122, 1964.

23. ERIKSSON, B.; GOLLNICK, P.; SALTIN, B. Muscle metabolism and enzyme activities after training in boys 11-13 years old. **Acta Physiologica Scandinavica,** v.87, n.4, apr., p.485-497, 1973.

24. FARRELL, P.A.; CASTON, A.L.; RODD, D.; ENGDAHL, J. Effect of training on insulin secretion from single pancreatic beta cels. **Medicine and Science in Sports and Exercise,** v.24, p.426-433, 1992.

25. FILIPUTTI, E. **Regulação da secreção de insulina em ilhotas de Langherhans de ratos submetidos à restrição protéica e suplementados com leucina.** 2006. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

26. FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry,** Washington, v.28, n.10, p.2077-2080, oct.1982.

27. FOX, E.L.; BOWERS, R.W.; FOSS, M.L. **Bases fisiológicas da educação física e dos desportos.** 4.ed, Rio de Janeiro, Guanabara, p.518, 1991.

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

29. GOBATTO, C.A. **Alterações metabólicas decorrentes do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados**. Campinas, 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia - Fisiologia.

30. HANGEN, S.R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino-acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists,** Gaithersburg, v.72, n.6, p.912-916, nov/dec. 1989.

31. HASHIMOTO, I. Exercise-induced glycogenolysis in sympathectomized rats. The **Japanese Journal of Physiology,** v.32, n.2, p.153-160, 1982.

32. HENRY, R.J.; SOBEL, C.; BERKMAN, S. Interferences with biuret methods for serum proteins: use of benedict's qualitative glucose reagent as a biuret reagent. **Analytical Chemistry,** Washington, v.29, n.10, p. 1491-1495, oct. 1957.

33. HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J. **Clinical chemistry principies and techniques,** 2nd Ed. New York: Harper and Row Publishers Inc., p.1288, 1974.

34. HENRY, J.B. **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**. 19th Ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p.1556, 1996.

35. HOHL, R. **Padronização de um modelo de indução de overreaching em ratos: desenvolvimento e perspectivas de investigação em natação e esteira.** 2007. Dissertação (Doutorado em Biologia funcional e molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Biologia, Campinas, 2007.

36. HOLLOSZY, J.O.; BOOTH, F.W. Biochemical adaptation to exercise training in muscle. **Ann. Rev. Physiol.,** v.38, p.273-291, 1976.

37. HOLLOSZY, J. O.; KOHRT, W. M. Regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. **Anna Rev. Nurr.,** v.16, p.121-38.

38. INSTITUTO ADOLF LUTZ. Normas **analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo; 1985.

39. ITAYA, K.; UI, M. **J. Lipid Res.,** v.6, n.16, 1965.

40. JACOBS, I. Blood Lactate. Implications for training and sports performance. **Sports Medicine,** v.3, n.1, p.10-25, 1986.

41. JACOBUCCI, H.B.; DIAS, N.G.P.; SGARBIERI, V.C. et al. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and protein, and liver cholesterol. **Nutr. Res.,** v.21, p.905-915, 2001.

42. JEUKENDRUP, A.E.; WAGENMAKERS, A.J.M.; STEGEN, J.H.C.H. et al. Carbohydrate ingestion can completely suppress endodogenous glucose production during exercise. **Am. J. Physiol.,** v.276, p.E672-683, 1999.

43. KASPEREK, G.J.; DOHM, G.L.; BARAKAT, H.A.; *et al.* The role of lisosomes in exercise-induced hepatic protein loss. **Biochem. J.,** London, v.202, p.281-288, 1982.

44. KATZ, J.; McGARRY, J.D. The glucose paradox: Is glucose a substrate for liver metabolism? **J. Clin. Invesr.,** v.74, p. 1901-1909, 1984.

45. KESKINEN, K.L.; KOMI, P.V.; RUSKO, H. A comparative study of blood lactate test in swimming. **International Journal of Sports Medicine,** v.10, n.3, p.197-201, 1989.

46. KOKUBUN, E. **Interações entre o metabolismo de glucose e ácidos graxos livres em músculo esqueléticos**. USP, 1990. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1990.

47. LEMON, P.W.R. Effect of exercise on protein requirements. **Journal of Sports Sciences,** v.9, n.1, p,53-70, January, 1991.

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

49. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.,** v.193, p.265-75, 1951.

50. LUCIANO, E.; LIMA, F.B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Revista de Ciências Biomédicas,** v.18, p.47-60, 1997.

51. LUCIANO, E.; ROSTOM DE MELLO, M.A. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculos de ratos diabéticos experimentais. **Ver. Paul. Educ. Fís.,** v.12, n.2, p.202-209, jul/dez, 1998.

52. MALHOTRA, N. K. **Pesquisa de Marketing: Uma orientação aplicada.** Porto Alegre: Editora Bookman, 2006.

53. McGOWAN, M.W.; ARTISS, J.D.; STRANDBERGH, D.R.; ZAK, B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. **Clinical Chemistry,** Washington, v.29, n.3, p.538-542, mar. 1983.

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

55. MORIFUJI, M.; AOYAMA, Y. Dietary orotic acid effects antioxidant enzyme mRNA levels and oxidative damage to lipids and proteins in rat liver. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p. 403-410, 2002.

56. MORIFUJI, M.; SAKAI, K.; SANBONGI, C.; SUGIURA, K. Dietary whey protein downregulates fatty acid synthesis in the liver, but upregulates it in skeletal muscle of exercise-trained rats. **Nutrition**, v.21, p.1052-1058, 2005a.

57. MORIFUJI, M.; SAKAI, K.; SANBONGI, C. *et al.* Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. **British Journal of Nutrition,** v.93, p. 439-445, 2005b.

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

59. NAGAOKA, S.; KANAMURU, Y.; KUZUYA, Y. et al. Comparative studies on the serum cholesterol lowering action of whey protein and soybean protein in rats. **Biosci. Biotech Bioch.,** v.56, p.1484-1485, 1992.

60. NEWSHOLME, E.A.; LEECH, A.R. **Biochemistry for the Medical Sciences,** London, John Wiley, p. 952, 1989.

61. NOVAK, M. **J. Lipid Res.,** v.6, p.431, 1965.

62. OYONO-ENGUELLE, S.; MARBACH, J.; HEITZ, A.; OTT, C.; GARTNER, M.; PAPE, A.; VOLLMER, J.C.; FREUND, H. Lactate removal ability and graded exercise in humans. **J. Appl. Physiol.,** v.68, p.905-922, 1990.

63. PARREIRA, M.R. **Exercício físico associado a diferentes teores de proteína na dieta: Estudo das alterações bioquímicas e corporais em ratos adultos**. Campinas, 1993. p.84. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

64. PELLET, P.L.; YOUNG, V.R. **Nutritional evaluation of protein foods**. Tokyo: The United Nations University, p.154, 1980.

65. PIMENTA, F.M.V.; ABECIA-SORIA, M.I.; AULER, F.; AMAYA-FARFAN, J. Physical performance of exercising young rats fed hydrolyzed whey protein at a sub-optimal level. **International Dairy Journal,** Barking, v.16, n.9, p.984-991, 2006.

66. RAMOS, A.G. **Utilização das proteínas do soro lácteo por ratos jovens.** Campinas, 2001. p.83. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de engenharia de Alimentos.

67. REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY JR., G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.11, p.1939-1951, nov. 1993.

68. RENNIE, M.J.; WINDER, W.W.; HOLLOSZY, J.O. A spring effect of increased plasma fatty acids on muscle and liver glycogen content in the exercising rat. **Biochem. J.,** v.156, p.647-655, 1976.

69. ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição. **Rev. Paul. Educ. Fís.,** São Paulo, v.13, n.1, p.67-82, jan/jun, 1999.

70. ROTH, D.A. The sarcolemmal lactate transporter: transmembrane determinants of lactate flux. **Medicine and Science in Sports and Exercise,** v.23, p.925-934, 1991.

71. SAUTIR, K.; DIENG, K.; FLAMENT, C. et al. Effects of whey protein, casein, soyabean and sunflower protein on the serum, tissue and faecal steroids in rats. **Br. J. Nutr.,** v.49, p.313-139, 1983.

72. SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição,** v.17, n.4, p.397-409, dezembro, 2004.

73. SPSS - **Statistical Package for the Social Sciences**. Base 10.0 User's Guide. Chicago: SPSS, 1999.

74. STEVENSON, J.A.F. Exercise, food intake and health in experimental animals. **Canadian Medicine Association Journal,** "S.L", v.96, p.862-866, 1967.

75. SUMIDA, K.D.; Urdiales, J.H.; Donovan, C.M. Enhanced gluconeogenesis from lactate in perfused livers after endurance training. **Journal of Applied Physiology,** Bethesda, v.74, p.782-787, 1983.

76. TASSI, E.M.M. *et al.* Hydrolyzed α-lactalbumina as a source of protein to the exercising rat. **Nutrition Research,** vol.18, n.5, p.875-881, 1998.

77. TAYLOR, A.; THAYER, R.; RAO, S. Human skeletal glycogen synthetase activities water exercise and training. **Can. J. Physiol. Pharmacol,** v.50, n.5, p.411-412, 1972.

78. TRIPTON, K.D.; FERRENDO, A.A.; PHILLIPS, S.M.Jr. et al. Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. **Am. J. Physiol.,** v.276, p.E628-634, 1999.

79. TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry,** London, v.6, p.24-27, 1969.

80. TROUT, D.L.; ESTES, E, H.; FRIEDBEKG, S.J. **J. Lipid Res.,** v.1, p.1999, 1960.

81. ZHANG, X.; BEYNEN, A.C. Lowering effect of dietary milk-whey protein versus casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. **British Journal of Nutrition,** v.70, p. 139-146, 1993.

82. WASSERMAM, K.; BEAVER, W.L.; WHIPP, B.J. Mechanisms and patterns of blood lactate increase during exercise in man. **Med. Sci. Sports. Med.,** v.18, p.344-352, 1986.

83. WHITE, J.A.; HART, R,J.; FRY, J.C. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry,** New York, v.8, n.4, p.170-177, oct/dec. 1986.

ANEXOS

Anexo 1 - Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal

UNICAMP

CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1339-1**, sobre **"Composição dos tecidos do intestino, músculo cardíaco, fígado e sangue dos ratos alimentados com hidrolisado proteico em função da atividade física"**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán / Carolina Cauduro Bensabath**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **26 de setembro de 2007**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1339-1**, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 26, 2007**.

Campinas, 26 de setembro de 2007.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

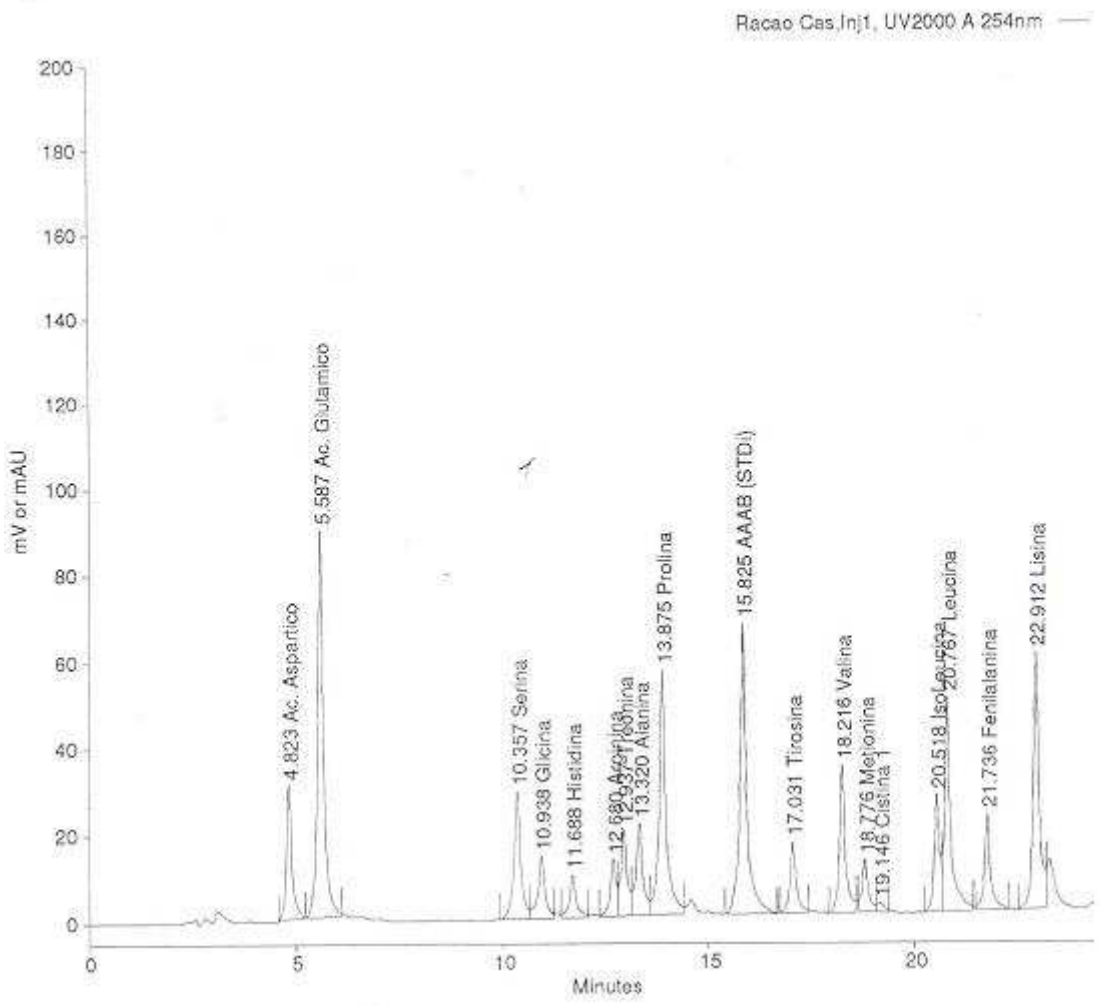
Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

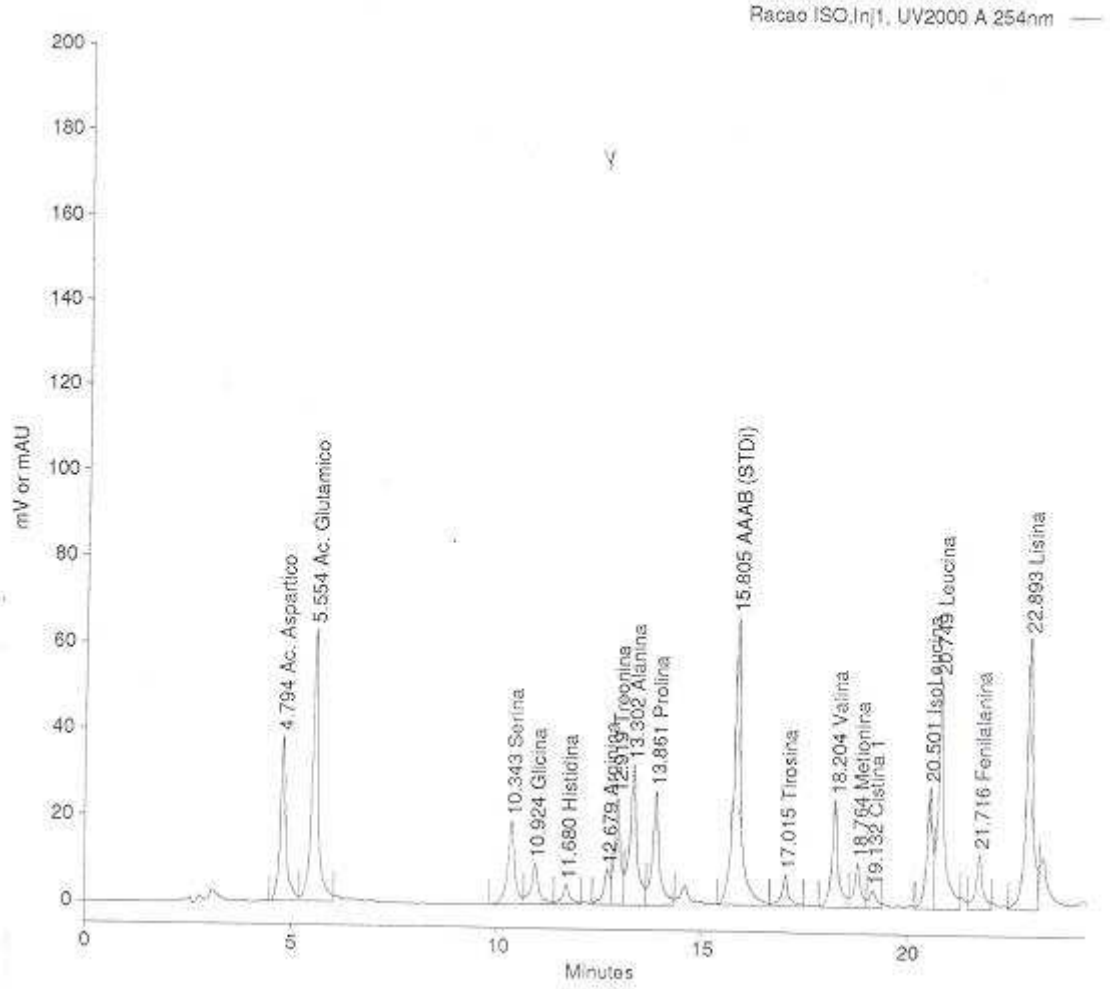
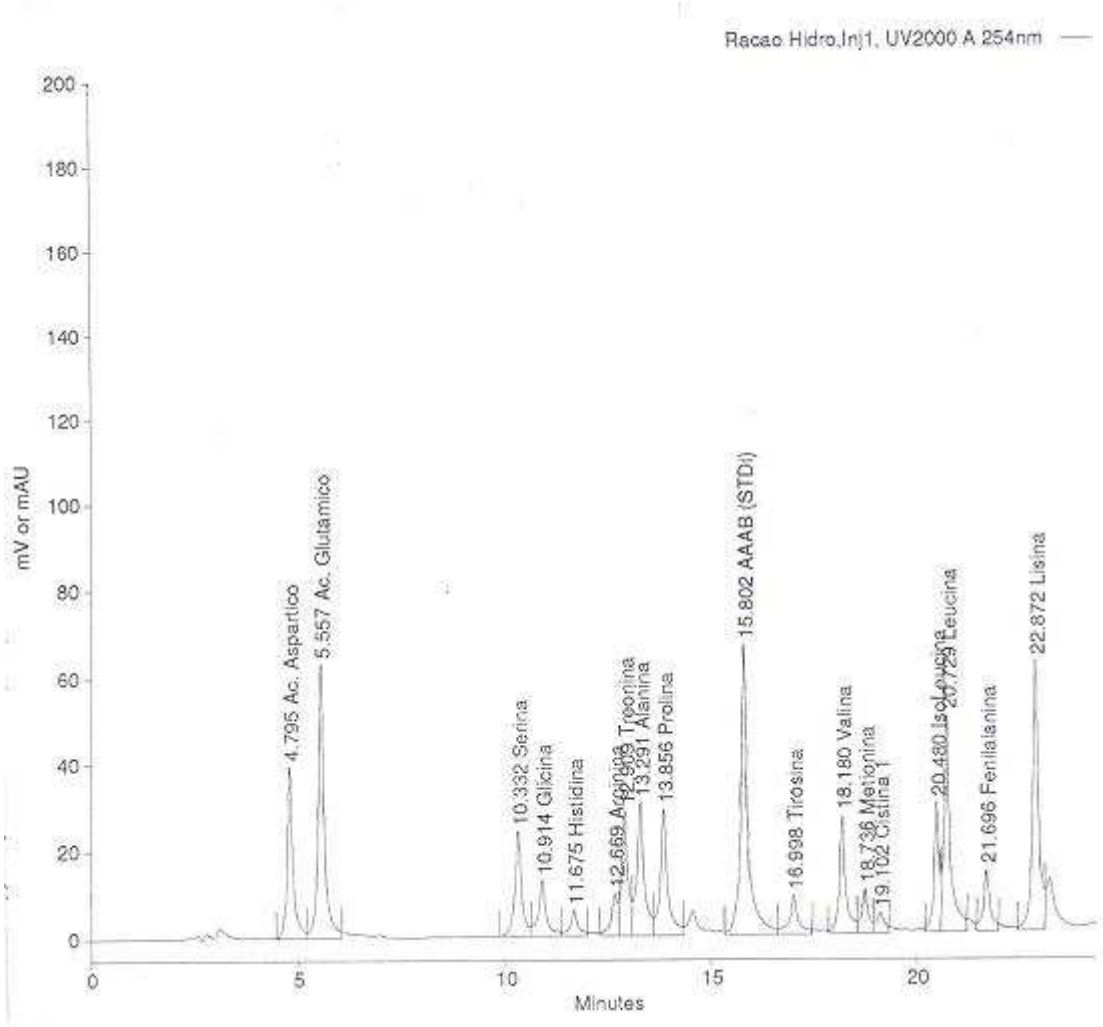
Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm

Anexo 2 – Aminograma das dietas experimentais

2.1 – Aminograma da dieta contendo caseína



2.2 – Aminograma da dieta contendo isolado do soro de leite



2.3 – Aminograma da dieta contendo hidrolisado do soro de leite