



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

**EFEITO DA ALIMENTAÇÃO SUB-CRÔNICA DO HIDROLISADO
DAS PROTEÍNAS DO LACTOSORO EM RATOS SEDENTÁRIOS E
EXERCITADOS**

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
Maria Inês Abecia-Soria,
aprovada pela Comissão Julgadora
em 25 de agosto de 2003.

Maria Inês Abecia-Soria

Bióloga

Campinas, 25 de agosto de 2003.

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán

Orientador


Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán
Presidente da Banca

Campinas-SP

2003

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**



Maria Inês Abecia-Soria

Bióloga

EFEITO DA ALIMENTAÇÃO SUB-CRÔNICA DO HIDROLISADO DAS PROTEÍNAS DO LACTOSORO EM RATOS SEDENTÁRIOS E EXERCITADOS

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán

Orientador

Dissertação apresentada ao Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre.

Campinas-SP

2003



UNIDADE	<i>FB</i>
Nº CHAMADA	<i>T/UNICAMP</i>
<i>Ab 33 e</i>	
V	EX
TOMBO BC/	<i>56168</i>
PROC.	<i>16-1224/103</i>
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	<i>R\$ 11,00</i>
DATA	<i>11/10/103</i>
Nº CPD	

CM00190915-9

Bib id 303238

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

Abecia-Soria, Maria Inés
 Ab33e Efeito da alimentação sub-crônica do hidrolisado das proteínas do lactosoro em ratos sedentários e exercitados / Maria Inês Abecia-Soria. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

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

1.Soro de leite. 2.Insulina. 3.Proteínas. I.Amaya-Farfán, Jaime. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
Orientador

Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Membro

Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka
Membro

Profa. Dra. Érika Maria Marcondes Tassi Granja
Membro Suplente

DEDICATÓRIA

À MEMÓRIA DA MINHA MÃE.

**A MEU QUERIDO PAI POR ACREDITAR EM MIM, FICAR DO
MEU LADO E POR SEMPRE ME DAR TODO SEU APOIO.**

A MINHA QUERIDA FAMÍLIA POR FAZER PARTE DESTA

AVVENTURA.



AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Jaime Amaya-Farfán pela orientação, apoio, confiança, amizade, paciência, pelos ensinos científicos e sobre tudo por acreditar em mim.

Aos professores da banca por todos os conselhos e sugestões durante a revisão da tese.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN) por me acolher em suas instalações e a todo o pessoal muito obrigada.

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

Ao meu querido pai por tudo o amor, apoio, compreensão e confiança que ele sempre deposita em mim. Muito obrigada meu querido pai.

A minha querida família, Amparito, Monny, Javier y Tutito por todo seu amor, compreensão e apoio em todo momento.

A meu querido amigo, companheiro e namorado Alexis por tudo seu amor, carinho, apoio, compreensão, por estar sempre a meu lado, formando parte da minha vida, por fazer cada momento muito mais feliz e agradável.

A minha querida amiga Nora Emma Rojas pela sua grande amizade desde o primeiro momento que a gente se conheceu, pelo companheirismo, ajuda e desinteresse em todos os momentos.

A minha querida Flávia Auler pela amizade incondicional, companheira e amiga em todo momento, com quem aprendi muito, pela imensa e valiosa ajuda durante e depois do desenvolvimento da minha tese.

A minha querida amiga Vera Sonia Nunes da Silva pela sua amizade, paciência, confidencialidade e apoio incondicional, prestados em todo momento, pela sua valiosa colaboração durante e depois da realização da tese.

A Aparecida Souza pela sua amizade e ajuda prestada em todo momento.

A Eugenio Rodríguez González pela imensa ajuda prestada na impressão final deste trabalho.

A minha querida amiga Patrícia Girardi (Patricinha) pela sua amizade, companheirismo sempre presente desde que a gente se conheceu.

A Elizabete pela sua amizade e colaboração na realização de alguns dos parâmetros bioquímicos da parte experimental da tese.

A Andrei Godoy Ramos, colega de laboratório pela sua valiosa informação e ajuda no trabalho com os animais utilizados neste experimento.

A minha querida amiga Karina Rios por sua amizade, carinho e compartilhar os bons e maus momentos.

À Lucia de la Hoz pela sua sincera amizade, companheirismo e apoio prestado em todo momento.

Um sincero agradecimento ao pessoal do laboratório de Fontes Protéicas por proporcionar-me um ambiente onde além do trabalho eu tive muitos momentos de alegria e amizade. Muito obrigada Carla Creghi, D. Iná, Verinha, Flávia, Fernanda, Florencia, Bia, Ivonette, Lucia e Maria Cládia.

À Eliete Carvalho, pela amizade incondicional, pelo auxílio no sacrifício dos animais laboratoriais

Aos técnicos dos laboratórios do DEPAN que me ajudaram sempre que precisei. Em especial ao Francisco Carrero (chico) pela grande ajuda na determinação de alguns dos parâmetros bioquímicos. Suzana (minha mãe brasileira) pela ajuda e amizade prestada em tudo momento. Muito obrigada. À Isabel de Fátima Valentino por ser sempre tão solícita e paciente. Nica minha querida tia brasileira pela sincera amizade.

Aos meus queridos amigos Dania e Humberto por todo seu apoio e carinho, e sobre tudo pela sua sincera amizade que eles me brindaram desde que os conheci.

Aos amigos do Labex/IB-Unicamp, pela grande ajuda prestada na fase experimental do trabalho. Um sincero agradecimento ao Joaquim Netto e o Daniel pela colaboração desinteressada e a amizade.

A todas aquelas pessoas que mesmo sem saber contribuiram à realização deste trabalho e fizeram minha estadia muito mais agradável.

A todos meu mais sincero Agradecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxiii
LISTA DE FLUXOGRAMAS	xxvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxix
RESUMO GERAL	xxxiii
GENERAL SUMMARY	xxxvii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL:	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1. PROTEÍNAS.....	6
3.1.1. Tipos de proteínas.....	7
3.1.2. Estrutura das proteínas	7
3.1.3. Metabolismo das proteínas.....	8
3.2. PROTEÍNAS DO LEITE.	10
3.2.1. Proteínas do soro do leite (whey protein).	11
3.2.2. Propriedades funcionais fisiológicas das proteínas do soro do leite	17
3.2.3. Produtos protéicos do soro.....	19
3.3. ATIVIDADE FÍSICA.....	19
3.4. METABOLISMO PROTÉICO E ATIVIDADE FÍSICA	24
3.5. GLICOSE SÉRICA.....	28
3.6. INSULINA	30
3.7. GLICOGÊNIO MUSCULAR	30
3.7.1. Metabolismo do glicogênio	31
3.7.2. Quantidades de glicogênio hepático e muscular	31
3.8. LACTATO SANGUÍNEO.....	32
3.8.1. Consumo de lactato	33
3.9. ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL).....	35
3.10. COLESTEROL E TRIGLICÉRIDES NO SANGUE.....	38
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*.....	41
EFEITO DA ALIMENTAÇÃO SUB-CRÔNICA DO HIDROLISADO DAS PROTEÍNAS DO LACTOSSORO EM RATOS SEDENTÁRIOS E EXERCITADOS.....	47
RESUMO	47
EFFECT OF SUB-CHRONIC FEEDING OF MILK WHEY PROTEIN HYDROLYZATE ON SEDENTARY AND EXERCISED RATS	49
SUMMARY	49

1. INTRODUÇÃO.....	51
2. OBJETIVOS	53
2.1. OBJETIVO GERAL:	53
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	53
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.1. DIETAS EXPERIMENTAIS	54
3.2. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS	56
3.3. BALANÇO NITROGENADO	58
3.4. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS.....	59
3.4.1. O perfil de aminoácidos das duas fontes protéicas utilizadas nas dietas de experimentação	59
3.4.2. Análise do grau de hidrólise da proteína parcialmente hidrolisada utilizada na dieta experimental	59
3.5. ENSAIO BIOLÓGICO.....	60
3.6. CONTROLE DA EVOLUÇÃO PONDERAL E INGESTÃO ALIMENTAR	60
3.6.1. Divisão dos animais.....	61
3.7. PROTOCOLO DE TREINAMENTO	62
3.7.1. Características do treinamento físico	63
3.7.2. Teste de exaustão.....	64
3.8. MÉTODOS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	64
3.8.1. Dosagem da concentração de lactato sanguíneo	64
3.8.2. Coleta do Sangue.....	65
3.8.3. Coleta dos órgãos	65
3.8.4. Determinação de glicogênio	65
3.8.5. Determinação da glicose sérica.....	66
3.8.6. Determinação de insulina.....	66
3.8.7. Determinação de ácidos graxos	67
3.8.8. Determinação dos triacilgliceróis.....	67
3.8.9. Determinação do colesterol	67
3.9. TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
BALANÇO NITROGENADO	69
ANÁLISE DAS PROTEÍNAS	70
ENSAIO BIOLÓGICO	72
EVOLUÇÃO PONDERAL	72
PROTOCOLO DE TREINAMENTO	74
TEMPO DE EXAUSTÃO	74
DETERMINAÇÕES TECIDUAIS	76
GLICOGÊNIO HEPÁTICO (GH).....	77
GLICOGÊNIO MUSCULAR (GM)	78
GLICOGÊNIO DO MIOCÁRDIO	79
DETERMINAÇÕES PLASMÁTICAS	80
LACTATO SANGUÍNEO	81
GLICOSE SANGUÍNEA	83
INSULINA SANGUÍNEA	84
ÁCIDOS GRAXOS	85

TRIACILGLICERÓIS	85
COLESTEROL	86
5. CONCLUSÕES	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	89
EFICIÊNCIA METABÓLICA DO HIDROLISADO SORO DE LEITE COM GRAU DE HIDRÓLISE MÉDIO NA RECUPERAÇÃO DE RATOS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO EXAUSTIVO	92
RESUMO	92
METABOLIC EFFICIENCY OF THE MILK WHEY PROTEIN HYDROLYSATE WITH MEDIUM DEGREE OF HYDROLYSIS ON THE RECOVERY OF RATS SUBMITTED TO EXHAUSTING PHYSICAL EXERCISE	94
SUMMARY	94
1. INTRODUÇÃO.....	96
2. OBJETIVOS	98
2.1. OBJETIVO GERAL:	98
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	98
PARÂMETROS EM TECIDOS DUROS	98
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	99
3.1. DIETAS EXPERIMENTAIS	99
3.2. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS	99
3.3. ENSAIO BIOLÓGICO.....	100
3.4. CONTROLE DA EVOLUÇÃO PONDERAL	101
3.5. DIVISÃO DOS ANIMAIS	101
3.6. PROTOCOLO DE TREINAMENTO	102
3.7. TESTE DE EXAUSTÃO	104
3.8. MÉTODOS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	105
3.8.1. Dosagem da concentração de lactato sanguíneo	105
3.8.2. Coleta do sangue	105
3.8.3. Coleta dos órgãos	106
3.8.4. Determinação de glicogênio	106
3.8.5. Determinação da glicose sérica.....	107
3.8.6. Determinação de insulina	107
3.8.7. Determinação de ácidos graxos	107
3.8.8. Determinação dos triacilgliceróis	107
3.8.9. Determinação do colesterol	108
3.9. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	108
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
EVOLUÇÃO PONDERAL	109
TEMPO DE EXAUSTÃO	109
DETERMINAÇÕES TECIDUAIS	111
GLICOGÊNIO HEPÁTICO (GH)	112
GLICOGÊNIO MUSCULAR (GM)	114
GLICOGÊNIO DO MIOCÁRDIO	115

DETERMINAÇÕES PLASMÁTICAS	117
LACTATO	118
GLICOSE SÉRICA	120
ÁCIDOS GRAXOS	121
TRIACILGLICERÓIS (TGL)	123
COLESTEROL	124
5. CONCLUSÕES	126
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	127
7. ANEXOS	130

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Composição dos nutrientes e frações protéicas do leite humano e bovino.....	11
----------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Composição das dietas (g/Kg de dieta) que foi utilizada para a realização do experimento (35 dias), segundo a AIN-93G.....	56
Tabela 2. Composição da mistura mineral (g/Kg mistura) utilizada para a realização do experimento (35 dias), segundo a AIN-93G.....	57
Tabela 3. Composição da mistura vitamínica (g/Kg mistura) utilizada para a realização do experimento (35 dias), segundo a AIN-93G.....	58
Tabela 4. Protocolo de treinamento utilizado nos grupos Isolado-Treinado (IT), Hidrolisado-Treinado (HT), Isolado-Treinado-Exausto (IE) e Hidrolisado-Treinado-Exausto, (10 ratos por grupo), durante 22 dias seguidos sem intervalos entre os tempos de corrida.....	63
Tabela 5. Concentrações médias e desvios-padrão de glicogênio hepático, muscular e do miocárdio em ratos alimentados com HSL e ISL e submetidos a exercício físico.....	76
Tabela 6. Parâmetros plasmáticos determinados no plasma sanguíneo (lactato, glicose, insulina, ác. graxos, triglicerídeos e colesterol) de ratos submetidos ao exercício físico e alimentados com ISL e HS . 78	



CAPÍTULO 3

Tabela 1. Composição centesimal da dieta experimental, utilizando como fonte de proteína o hidrolisado de soro de leite (GH 7,8%).....	99
Tabela 2. Protocolo de treinamento, aplicado durante 9 semanas nos diferentes grupos de ratos submetidos a exercício físico (SEM,TEM,TER/24 e TER/48).....	103
Tabela 3. Concentrações médias e desvios-padrão de glicogênio hepático, muscular e do miocárdio em ratos alimentados com HSL e submetidos a exercício físico.....	112
Tabela 4. Parâmetros plasmáticos determinados no plasma sangüíneo (lactato, glicose, insulina, ác. graxos, triglicerídeos e colesterol) dos diferentes grupos de ratos (10 por grupo) submetidos ao exercício físico e alimentados com e HSL.....	118

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Vias de fornecimento de energia durante o exercício. **20**
Figura 2. Exemplifica a hidrólise do ATP e ressíntese pela cratinina..... **21**
Figura 3. O ciclo de Cori (Champe e Harvey, 1996)..... **34**

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Perfil de aminoácidos das fontes protéicas (isolado e hidrolisado de soro de leite) utilizadas na dieta para os animais em estudo (ratos Wistar)..... **70**
Figura 2. Perfil de aminoácidos essenciais recomendado pela FAO vs. as fontes proteícas (isolado e hidrolisado de soro de leite bovino), utilizadas no experimento com ratos submetidos a exercício físico..... **71**
Figura 3. Evolução ponderal de ratos Wistar alimentados com isolado e seu hidrolisado de soro de leite bovino durante 35 dias e submetidos a exercício físico..... **73**
Figura 4. Tempos médios e desvios-padrão da exaustão de ratos (10 animais por grupo) alimentados com ISL e HSL e submetidos a exercício físico..... **75**
Figura 5. Concentrações médias e desvios-padrão de glicogênio hepático e muscular de ratos (10 animais por grupo) alimentados com ISL e HSL e submetidos a exercício físico..... **78**
Figura 6. Concentrações médias e desvios-padrão de glicogênio do miocárdio de ratos (10 animais por grupo) alimentados com ISL e HSL e submetidos a exercício físico..... **80**

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Evolução ponderal de ratos Wistar alimentados com hidrolisado de soro do leite bovino durante 10 semanas.....109
- Figura 2.** Tempo médio de exaustão de ratos (10 por cada grupo) alimentados com soro de leite bovino e submetidos a exercício físico.....110
- Figura 3.** Efeito do hidrolisado de soro láctico bovino no glicogênio hepático de ratos submetidos a exercício físico.....113
- Figura 4.** Médias e desvio-padrão da concentração de glicogênio muscular (gastrocnêmio) de ratos (10 por grupo) alimentados com hidrolisado de soro do leite e submetidos a exercício físico.....115
- Figura 5.** Concentrações médias e desvio-padrão do glicogênio do miocárdio nos diferentes grupos de ratos alimentados com hidrolisado de soro de leite e submetidos a exercício físico.....117
- Figura 6.** Concentrações médias e desvios-padrão de lactato sanguíneo dos diferentes grupos de ratos (10 por grupo) alimentados com hidrolisado de soro de leite e submetidos a exercício físico.....120
- Figura 7.** Concentrações médias e desvios-padrão de ácidos graxos medidos no plasma de ratos alimentados com hidrolisado de soro de leite e submetidos a exercício físico.....122
- Figura 8.** Concentrações médias e desvios padrão de triacilgliceróis medidos no plasma de ratos alimentados com hidrolisado de soro de leite e submetidos a exercício físico.....124

LISTA DE FLUXOGRAMAS

CAPÍTULO 1

Fluxograma 1. Glicólise aeróbia e anaeróbia.....**22**

CAPÍTULO 2

Fluxograma 1. Divisão dos animais por tipo de dieta e atividade física.....**62**

CAPÍTULO 3

Fluxograma 1. Divisão dos ratos em treinados (4 grupos) e sedentários
(2 grupos) e alimentados com hidrolisado de soro de leite e
submetidos a exercício físico.....**102**

LISTA DE ABREVIATURAS

α-La: α-Lactalbumina

β-Lg: β-Lactoglobulina

AACR: Aminoácidos de cadeia ramificada

AGL: Ácidos graxos livres

ALA: Alanina

ARG: Arginina

ASN: Asparagina

ASP: Aspártico

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: Albumina Sérica Bovina

CP: Creatinina fosfato

CYS: Cistina

GC: Glicogênio do miocárdio

GH: Glicogênio hepático

GLN: Glutamina

GLU: glutamico

GLY: Glicina

GM: Glicogênio muscular

H: Hidrolisados

HE: Hidrolisado exausto

HIS: Histidina

HS: Hidrolisado sedentário

HSL: Hidrolisado de soro de leite

HT: Hidrolisado treinado

I: Isolado

IE: Isolado exausto

IG: Imunoglobulinas

ILE: Isoleucina

IS: Isolado sedentário

ISL: Isolado de soro de leite

IT: Isolado treinado
LEU: Leucina
LYS: Lisina
MET: Metionina
PHE: Fenilalanina
PRO: Prolina
RIE: Raiomunoensaio
SEM: Sedentario exausto e morto
SER: Serina
SL: Soro de leite
SM: Sedentário e morto
TER/24: Treinado exausto e morto após 24 horas
TER/48: Treinado exausto e morto após 48 horas
TER: Treinado exausto e morto
TGL: Triglicerideos
THR: Treonina
TM: Treinado e morto
TNBS: Ácido trinitrobenzenosulfônico
TRP: Triptofano
TYR: Tirosina
VAL: Valina

RESUMO GERAL

As proteínas de soro de leite, além de possuírem um alto valor biológico e escore químico superior à de outras proteínas de origem animal, são consideradas proteínas de rápida absorção facilitando o metabolismo, esta característica especial resulta em maior influência na recuperação de organismos debilitados, estimulando a síntese de proteína, o que parece justificar a sua utilização como suplemento na alimentação de esportistas. Recentemente as proteínas do soro vêm sendo muito utilizadas por atletas, devido a suas características fisiológicas e funcionais. Contudo não se sabe ainda qual é o melhor grau de hidrólise dessas proteínas capaz de proporcionar resultados benéficos ao exercício físico. Tendo em vista o papel energético da proteína no exercício prolongado, várias pesquisas sobre exercício e metabolismo protéico têm sido realizadas na tentativa de elucidar a dosagem correta de proteínas em dietas para esportistas em função do exercício. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as possíveis consequências metabólicas do consumo sub-crônico do isolado de soro de leite (ISL) e seu proteolisado (HSL) de grau de hidrólise 7,8%, como única fonte protéica, em ratos sumetidos ao exercício físico. Ratos machos Wistar (~100g), foram divididos em três pares de grupos: Treinados (**HT/IT**), treinados e exercitados até a exaustão (**HE/IE**) e sedentários (**HS/IS**). Observou-se que o ponto de exaustão do grupo tratado com isolado de soro de leite (ISL) foi alcançado muito antes que os alimentados com o hidrolisado de soro de leite (HSL), (60 ± 13 min e 156 ± 18 min, respectivamente). Nos níveis de lactato sanguíneo foi encontrada diferença significativa nas diferentes categorias. Para os níveis de GH foi encontrada diferença significativa para quase todas as categorias, mostrando que nos grupos alimentados com HSL as reservas foram maiores, enquanto que os níveis de GM e de AGL não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Os níveis de GC nos grupos **HE/IE** apresentaram diferenças significativas quando comparadas aos sedentários. A concentração sérica de glicose e de colesterol não apresentaram diferenças significativas, enquanto que os de TGL apresentaram diferenças significativas quase em todos os grupos. De acordo com os resultados obtidos conclui-se que

a dieta com hidrolisado de soro de leite de grau de hidrólise médio promoveu um melhor desempenho físico em animais treinados, como foi evidenciado pelo teste de exaustão. No segundo ensaio trabalhou-se apenas com um tipo de dieta (hidrolisado) para todos os ratos. O experimento teve a duração de 10 semanas, objetivando verificar a capacidade de recuperação de ratos submetidos a exercício físico exaustivo. O estudo mostrou que o desempenho dos sedentários no momento do treinamento exaustivo era sempre inferior (42 ± 14 e 79 ± 16 min). Em relação aos níveis de glicose não houve diferenças significativas entre os grupos. Os níveis de lactato sanguíneos apresentaram diferenças significativas nos grupos submetidos à atividade física exaustiva ($p<0,05$), mostrando que o hidrolisado foi vantajoso. O GH não apresentou diferenças significativas entre os grupos **SM** e **TM**, mas mostraram diferenças significativas quando comparados aos demais grupos, havendo uma recuperação gradual do glicogênio, todavia incompleta. Os resultados do GM foram semelhantes aos do GH, porém a recuperação foi completa. Quanto ao GC, estes não apresentaram diferenças significativas entre os grupos **SEM** e **TEM**, mas apresentaram diferenças significativas quando comparados aos demais grupos. Os parâmetros de glicose sérica, insulina e colesterol não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos grupos. A concentração de AGL foi maior para o grupo **SEM** e menor para o grupo **TER/24** significativamente. Finalmente em relação aos níveis de TGL, os grupos **SM**, **SEM** e **TM** não apresentaram diferenças significativas entre si, mas apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos **TEM**, **TER/24** e **TER/48**, sendo notada uma recuperação gradual deste parâmetro.

Palavras chaves: : Atividade física, hidrolisado, isolado protéico, soro de leite, proteína, recuperação, ratos, exercício.

GENERAL SUMMARY

Milk whey proteins, besides their high biological value and superior chemical score in comparison to other proteins of animal origin, are considered proteins of fast absorption and metabolism. Fast proteins are thought to be more efficient in the recovery of debilitated organisms in a pronounced catabolic state because of great stimulation to protein synthesis, which justifies its possible use as food supplement for sports men. Today, the whey proteins have become widely used by athletes due to their various properties. Regarding the effect of the degree of hydrolysis, it is not yet known what influence this factor can have on the beneficial effects to the exercising rat. In view of the energy value of proteins in exhaustive exercise, several studies on exercise and protein metabolism have been carried out in the attempt to elucidate the proper amount of protein that must be consumed by sportsmen. The present work had the objective of evaluating the possible metabolic consequences of the sub-chronic consumption of milk-whey protein isolate and its enzymatic hydrolyzate, with medium degree of hydrolysis, as the only protein source, for rats submitted to physical exercise in the treadmill. Male Wistar (~100g), were divided into three groups: Trained (**HT/IT**), trained and taken to exhaustion (**HE/IE**) and sedentary (**HS/IS**). It was observed that the point of exhaustion in the group consuming the whey protein isolate (ISL) was reached long before the group fed the whey protein hydrolyzate (HSL) (60 ± 13 min vs. 156 ± 18 min). For the lactate levels in blood, significant difference ($p < 0,05$) was found between the different categories indicating that, at 24h after exhaustion, the hydrolyzed protein of the diet was responsible for the faster recovery of the basal blood lactate. For the GH levels significant differences for almost all the categories were found, showing that the groups fed the HSL exhibited greater GH concentrations than did their cohorts, GM did not present significant differences between the pairs of groups and the same was observed with regard to the concentration of fatty acids. The GC showed that the **HE/IE** groups had significant differences when compared to the sedentary groups. The cholesterol and glucose parameters did not present significant differences between any two groups, whereas the TGL levels

presented significant differences for almost all of the groups. The results suggest that the hydrolyzed protein was considerably more efficient than the whole protein in promoting better physical performance and conservation of the biochemical parameters. In the second experiment only one diet type (hydrolyzed)was used to feed all rats. This experiment took 10 weeks to complete. The study showed that the performance of the sedentary rats during exercise was always inferior compared to the group of rats submitted to continuous exercise (79 ± 16 min vs. 42 ± 14). In relation to the glucose levels, there were no significant differences among the different groups. The lactate levels in blood presented significant differences in the groups submitted to the exhausting physical activity ($p<0,05$), as compared to the groups not submitted to exhaustion (**SM** and **TM**). In the case of the GH, it was observed that the **SM** and **TM** groups presented significant differences with the other groups and the recovery of the glycogen was not complete. A similar behavior was observed for the GM except that the recovery was complete. The **SEM** and **TEM** groups presented significant differences in comparison with the other groups in the case of the GC. The serum glucose, insulin and cholesterol parameters presented no significant differences in any of the groups. For the fatty acids, it was observed that the **SEM** and the **TER/24** groups had the highest and lowest concentrations, respectively. These groups were statically different from the rest of the groups. Finally, for the TGL levels, it was observed that the recovery of this parameter was gradual and not complete.

***HSL** = milk-whey protein hydrolysate, **ISL**= milk-whey protein isolate

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

1. INTRODUÇÃO GERAL

O soro do leite foi por muito tempo um resíduo da indústria de laticínios de pouca utilidade, além de ser considerado um agente poluente. Atualmente, este subproduto é considerado como um produto de alto valor econômico, não só por ser fonte de proteínas de alto valor nutricional, com excelente balanço de aminoácidos (Jayaprakasha *et al.*, 1999), mas pelas características de alimento funcional que lhe são atribuídas (SGARBIERI; PACHECO, 1999).

Atualmente é encontrado comercialmente na forma de: concentrados e isolados protéicos, ou como ingredientes de muitos produtos formulados, sendo que os produtos comercializados como suplementos de aminoácidos, são produzidos a partir de proteínas de soro de leite previamente hidrolisadas (RAMOS, 2001)

Todas as proteínas em especial as do soro de leite são quebradas por hidrolases com especificidade pela ligação peptídica e por peptidases como as endopeptidases (proteases) as quais atacam ligações peptídicas internas. Estas enzimas são importantes para a quebra inicial de longos peptídeos em menores, os quais pode ser atacado por exopeptidases, que tiram um aminoácido de cada vez da extremidade COOH terminal (carbopeptidases) ou da NH₂ terminal (aminopeptidases) dando como produtos finais aminoácidos livres e di e tripeptídeos que são absorvidos mais rapidamente pelas células epiteliais do intestino delgado (SCHULTZ, 1996).

Produtos importantes da ação enzimática são os hidrolisados protéicos (como o hidrolisado de soro de leite), os quais são considerados pela sua importância nutricional e tecnológica, devido às propriedades funcionais superiores que os mesmos conferem (MEREDITH *et al.*, 1990).

Tais proteínas servem como fontes de peptídeos bioativos com atividades fisiológicas, os quais em produtos industrializados oferecem uma variada gama de oportunidades de aplicação (McIntosh *et al.*, 1998). Vale ressaltar que a proteína hidrolisada é mais rapidamente absorvida do que sua forma intacta (MEREDITH *et al.*, 1990).

O hidrolisado protéico de soro de leite vem sendo utilizado em grande escala na produção de alimentos para esportistas, principalmente devido a sua rápida absorção. O efeito do exercício físico nos requerimentos protéicos tem sido um tópico controverso durante muitos anos. Uma quantidade considerável de evidencia experimental indica que o exercício regular incrementa as necessidades de proteína (LEMON, 1991).

A atividade física tem tido sua importância aumentada nos últimos anos como uma das diversas formas de prevenção contra doenças ou estados patológicos. Sabe-se também que ela produz benefícios psicológicos, tais como a diminuição de tensão provocada pelo estresse da vida moderna. Além disso , o exercício físico induz uma série de adaptações metabólicas, as quais variam de acordo com a duração e intensidade do exercício (PIMENTA, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar a eficácia metabólica do isolado de soro de leite e seu hidrolisado enzimáticamente de grau de hidrólise médio como únicas fontes protéicas na dieta padrão de ratos submetidos ao exercício físico.

2.2. Objetivos Específicos:

- Determinar a influência fisiológica de ambas dietas nos ratos treinados e sedentários.
- Comparar as respostas bioquímicas das duas dietas ministradas sub-crônicamente a ratos sedentários e ratos exercitados em esteira. Dieta “**ISL**”, preparada com isolado do soro do leite, e dieta “**HSL**”, preparada com o ISL-Hidrolisado enzimaticamente.
- Utilizar alguns dos parâmetros bioquímicos para avaliação do desempenho, tais como: Glicogênio hepático, glicogênio muscular (gastrocnêmio, coração, lactato, glicose, insulina, ácidos. Graxos, triacilgliceróis, colesterol).
- Tendo em vista os resultados do primeiro experimento, estudou-se posteriormente, o efeito da proteína que melhores resultados proporcionou aos animais, através da capacidade de recuperação do animal exaurido nos tempos 0, 24 e 48 horas após o treinamento exaustivo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A nutrição é um dos fatores que pode afetar o desempenho do indivíduo submetido ao exercício físico. A nutrição bem equilibrada pode reduzir a fadiga, permitindo melhor desempenho por um maior período de tempo, e/ou uma recuperação mais rápida entre duas seções de exercício.

A ingestão protéica tem sido uma preocupação nos atletas competitivos desde os mais remotos tempos dos jogos olímpicos da Grécia. As pessoas engajadas em trabalho braçal ou atlético usualmente preferem uma dieta com alto teor de proteínas, ao invés daquelas que levam uma vida sedentária (WOLINSKY; HICKDON, 1996).

Nas duas últimas décadas, os pesquisadores têm conduzido experimentos projetados para produzir evidências que sustentem ou neguem essa prática. Emergindo assim duas linhas predominantes de investigação.

- Uma baseada em que o exercício traumatiza ou “acaba” com as proteínas do músculo esquelético e, para reparar essa perda e a hipertrofia compensatória deveria ser consumida uma dieta com alto teor de proteína (WOLINSKY; HICKDON, 1996).
- Pela outra, acredita-se que o exercício aumenta a oxidação de aminoácidos no músculo esquelético para fornecer energia para o trabalho, tornando-se necessária uma dieta com alto teor protéico para renovar a quantidade de proteína do músculo esquelético que foi convertida em energia. (WOLINSKY; HICKDON, 1996).

Existem muitos estudos sobre os requerimentos de proteína na dieta, para um ótimo desempenho atlético, a maioria desses estudos concluíram que dietas com alto teor de proteína são necessárias para atletas que fazem exercícios de resistência, sendo este um tema controverso na atualidade entre os profissionais de saúde (LEMON, 1991).

Para que o exercício possa ser executado, é necessário que o organismo disponha de substratos energéticos, onde o tecido muscular transformará a energia química em mecânica (YOUNG *et al.*, 1985).

A intensidade e a duração do exercício são fatores determinantes na seleção dos substratos carreadores de energia pelo corpo. Para exercícios de alta intensidade e de pouca duração, o corpo utiliza a adenosina-trifosfato (**ATP**) e creatinina-fosfato (**CP**) de reserva, as quais são reservas imediatas, embora limitadas. Por outro lado, exercícios prolongados utilizarão quantidades variáveis de carboidratos, lipídeos e proteínas (TASSI *et al.*, 1998).

O exercício influencia significativamente todo o metabolismo do corpo, tendo efeito profundo no metabolismo das proteínas (Tipton *et al.*, 1999), consumo de O_2 (VO_2) acima dos níveis de repouso (Laforgia *et al.*, 1997; Bahr e Sejersted, 1991), transporte de aminoácidos, glicose plasmática e níveis de insulina (Roy *et al.* 1997; Wojtaszewski *et al.*, 2000), assim como maiores concentrações de lactato muscular (PILEGAARD *et al.*, 1999; GLADDEN, 2000).

Dentre as mudanças causadas pela atividade física, sabe-se que o transporte de glicose para o músculo e a atividade da enzima glicogênio-sintetase são aumentados após uma sessão de exercício. Sabe-se também que a glicose sanguínea é um substrato importante para a realização do exercício (Jeukendrup *et al.*, 1999). No músculo esquelético do rato há um aumento na sensibilidade à glicose por dois motivos, transporte de glicose e ativação da glicogênio-sintetase após o exercício. Essas mudanças facilitam a ação da enzima glicogênio-sintetase, e possivelmente constitui-se no meio pelo qual o estoque de glicogênio muscular é aumentado no pré-exercício do animal treinado (WOJTASZEWSKI *et al.*, 2000).

JEUKENDRUP *et al.* (1999) diz que há um aumento rápido nos níveis de glicose durante o exercício, provavelmente causada pela ativação do mecanismo responsável pelo uso da glicose que, por sua vez, resulta em aumento do fluxo de capilares sanguíneos, bem como do transporte de glicose para o músculo em atividade.

3.1. PROTEÍNAS

As proteínas são substâncias reconhecidas como parte vital dos tecidos vivos. Esses componentes ocupam o segundo lugar, em termos quantitativos, correspondendo a 20% do peso corporal. Elas são formadas por resíduos de aminoácidos, os quais estão unidos em longas cadeias, em várias formas e combinações químicas para formar estruturas protéicas muito diversas (COLGAN, 1993).

As proteínas tissulares podem ser gastas (catabolismo), repostas (anabolismo). Elas são a base da construção de novos tecidos, participam em quase todos os processos vitais, como por exemplo, as enzimas, hormônios e alguns polipeptídios dirigem e regulam o metabolismo corporal, enquanto as proteínas musculares dão sustentação e permitem o movimento. Nos ossos, o colágeno forma uma rede para a deposição de cristais de fosfato de cálcio, agindo como cabos de aço no concreto reforçado. Na corrente sanguínea, proteínas como a hemoglobina e albumina plasmática transportam moléculas essenciais à vida, enquanto as imunoglobulinas destroem as bactérias e vírus que invadem o organismo. Em soma, as proteínas apresentam uma incrível diversidade de funções, embora todas compartilhem a característica estrutural comum de serem polímeros lineares de aminoácidos (CHAMPE; HARVEY, 1996).

Na natureza, mais de 300 aminoácidos diferentes estão descritos, mas somente 20 são comumente encontrados como constituintes das proteínas dos mamíferos, aclarando que estes são os únicos aminoácidos codificados pelo DNA, ou material genético na célula, os quais foram classificados em nutricionalmente essenciais (8) e não essenciais (12). São considerados aminoácidos essenciais: VAL, LEU, ILE, LYS, MET, THR, PHE, TRP e HIS (a HIS é considerado essencial para os recém-nascidos), os quais encontram-se em proporções adequadas no soro de leite, ovo, caseína, carne e proteína de soja. Dentre os aminoácidos não indispensáveis temos: TYR, GLY, ALA, CYS, SER,

ASP, ASN, GLU, GLN, PRO, ARG. (LEHNINGER, 1989; SGARBIERI, 1996; FARFAN; PACHECO, 2003).

Todos eles têm em comum um átomo de carbono (C_α) no qual está ligado um átomo de hidrogênio, um grupo amino (NH_2), um grupo carboxílico ($COOH$) e a uma cadeia lateral distinta ("grupo R"). O que difere um aminoácido do outro é a cadeia lateral que está ligada na quarta valência do C_α . O único aminoácido que não segue esse padrão é a prolina porque a cadeia lateral deste aminoácido e o grupo alfa-amino formam uma estrutura em anel, e assim a prolina difere de outros aminoácidos, pois contém um grupo imino em vez de um grupo amino. Em pH fisiológico (aproximadamente 7.4), o grupo carboxila é dissociado, formando o íon carboxilato (COO^-), carregado negativamente e o grupo amino é protonado (NH_3^+) (Lehninger, 1989; Farfan; Pacheco, 2003).

➤ 3.1.1 Tipos de proteínas

Existem proteínas de:

1. *Alto valor biológico*, que são as proteínas que fornecem todos os aminoácidos essenciais nas proporções adequadas (ovo, carnes, leite e derivados).
2. *Baixo valor biológico*, que são as chamadas proteínas incompletas por não apresentarem todos os aminoácidos essenciais. Inclui-se neste grupo as proteínas vegetais, recomenda-se que este tipo de proteínas deve ser consumido sempre junto com outras proteínas para que exista uma complementação dos aminoácidos entre elas (COLGAN, 1993).

➤ 3.1.2. Estrutura das proteínas

As proteínas apresentam diferentes estruturas tridimensionais, sendo classificadas em: primária, secundária, terciária e quaternária.

A estrutura primária se caracteriza por apresentar apenas ligações peptídicas entre os aminoácidos, as secundárias são estruturas regulares e estáveis, mantidas por pontes de hidrogênio ou por ligações que podem ser intramoleculares ou intermoleculares, levando a cadeia polipeptídica a conformações helicoidais, chapas pregueadas ou cadeias ao acaso. As estruturas secundárias podem apresentar uma nova ordem de estrutura envolvendo os dois ou três tipos de estrutura, caracterizando a denominada estrutura terciária. Sendo estabilizada por várias forças: ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio, ligações salinas ou interações eletrostáticas, interações dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas ou de Van der Waals (LEHNINGER, 1989; SGARBIERI, 1996; FARFAN; PACHECO, 2003).

A formação de estruturas quaternárias é devida à interação de polipeptídicas com estruturação terciária. As unidades estruturais formadas por essas cadeias polipeptídicas, ligam-se umas às outras por ligações do mesmo tipo das encontradas nas estruturas terciárias (LEHNINGER, 1989; SGARBIERI, 1996; FARFAN; PACHECO, 2003)

➤ 3.1.3. Metabolismo das proteínas

Para melhor compreensão, podemos considerar o metabolismo protéico englobando a biossíntese dos aminoácidos e das proteínas, seguida de degradação protéica, oxidação dos aminoácidos no músculo e fígado, a utilização do esqueleto carbônico dos aminoácidos na gliconeogênese e a produção e reciclagem de uréia (DOHN *et al.*, 1985).

No período de absorção, há mais aminoácidos do que o fígado pode usar na síntese de proteínas e outras moléculas nitrogenadas. Os aminoácidos em excesso são liberados no sangue para ser utilizados por todos os tecidos na síntese de proteínas, ou são desaminados, e os esqueletos de carbono resultantes são degradados pelo fígado até piruvato, acetil-CoA, ou outros intermediários do ciclo de Krebs, sendo que estes metabólitos podem ser oxidados para obter energia, usados na síntese de ácidos graxos (BENYON, 1998).

O fígado possui capacidade limitada para degradar os aminoácidos de cadeia ramificada como LEU, ILE e VAL; eles atravessam o fígado essencialmente inalterados e são preferencialmente metabolizados no músculo (principal sitio para degradação de aminoácidos de cadeia ramificada), onde são usados para síntese de proteína e como fonte de energia (HOOD; TERJUNG, 1991).

Na absorção aumentada de proteínas o organismo não pode armazenar proteínas do mesmo modo que mantém as reservas de glicogênio ou triacilglicerol. Entretanto, um aumento transitório na síntese de proteínas hepáticas ocorre no estado de absorção, resultando na reposição de qualquer proteína que tenha sido degradada no período pos-absortivo prévio (RAMOS, 2001).

No homem com peso corporal de 70kg possui aproximadamente, 12kg de proteína e 200-220g de aminoácidos livres, nos quais são, continuamente, cedidos para a síntese protéica e repostos pela degradação das proteínas do organismo, denominado "turnover" protéico (BENYON, 1998).

Este turnover protéico, para um homem de 70kg gira em torno de 300g/dia. O organismo dispõe de um estoque (pool) de aminoácidos mantido pela degradação de tecidos protéicos e pelas proteínas provenientes da dieta. Alguns aminoácidos que não são utilizados imediatamente, não podem ser estocados e devem ser desaminados ou degradados (BENYON, 1998).

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

A quantidade de proteína dietética recomendada pela maioria dos comitês especializados em nutrição tem variado entre 0,8 (Canadian Department of National Health and welfare, 1983; US Food and Nutrition Board, 1989; Food and Agricultural 1985), 1.0 (Asutralian NationalHealth and Medial Reseach Council, 1987, Dutch Nutrition Board, 1988 para mulheres) e

1,2g/kg⁻¹ de peso corporal por dia (Dutch Nutrition Board, 1988 para homens) para indivíduos adultos sadios.

O individuo em situações específicas (crescimento, gestação, atividade física e convalescença), necessita de uma quantidade maior de proteínas dietéticas para manter um balanço nitrogenado positivo (LEMON, 1997; BENYON, 1998).

3.2.PROTEÍNAS DO LEITE.

O leite bovino contém aproximadamente de 3,9% de gordura, 3,3% de proteína, 5% de lactose, 0,7 de minerais. Pode ser considerado o alimento mais completo da natureza e o único que satisfaz às necessidades dos recém-nascidos, nos primeiros meses de vida. Onde as principais proteínas do leite são: caseína (~80%) e proteínas do soro do leite (~20%), tais como a β -Lactoglobulina e α -Lactalbumina, entre outras (WONG et al., 1996; PUNIDADAS; RIZVI 1999).

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

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

COMPONENTES	LEITE HUMANO	LEITE BOVINO
	%	%
Lactose	6,89	4,8
Gordura	4,38	3,9
Minerais	0,118	0,68
Proteína	1,3	3,4
	g/L	g/L
Caseínas	3-5	26
α_{s1} -caseína		10
α_{s2} -caseína		2,6
β -caseína	3-5	9,3
γ -caseína		0,8
κ -caseína	1-3	3,3
Proteínas do soro	4-6	5-7
α -lactoalbumina	2-3	0,8-1,2
β -lactoglobulina		5-7
Albumina sérica	0,3	0,4
Imunoglobulinas		
IgA	0,1	7-11
IgG	0,01	2-3
IgM	0,02	0,05
Lactoferrina	1-3	traço

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

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

O soro de leite (~20%) contém de 4-7g de proteína/L, sendo que a concentração real depende do tipo de soro (ácido ou doce, tipo de queijo e caseína), estágio de lactação e condições de processamento usados na manufatura do queijo ou caseína (MARSHALL; HARPER, 1988).

As proteínas nativas do soro são separadas das caseínas do leite bovino pela sua solubilidade em pH 4,6. Estas apresentam diferentes sensibilidades para temperaturas maiores que 50°C. O grau de desnaturação depende dos componentes da proteína, da concentração total dos sólidos e temperatura, tempo de exposição, pH e força iônica. As Ig são mais sensíveis à temperatura enquanto que a fração proteose-peptona é termoestável em larga faixa de pH (MARSHALL; HARPER, 1988; PUNIDADAS; RIZVI 1999; GINGER; GRIGOR, 1999).

O soro é um subproduto do leite, obtido durante a produção de queijo ou de caseína. Com o surgimento de novas tecnologias, o soro tornou-se um ingrediente muito valorizado pelas suas qualidades nutricionais. Para o processamento do soro existem inúmeras técnicas, sendo esta de fundamental importância para qualidade final do soro do leite, dependendo do processo utilizado, o soro pode ter maior ou menor teor de lactose, gordura e proteína (que pode chegar a 92% no caso do isolado de proteína de soro) (COLGAN, 1993).

Dentre as proteínas do soro de leite temos: a β -Lactoglobulina (β -Lg), α -Lactalbumina (α -La), imunoglobulinas (Ig), albumina sérica (BSA) e polipeptídeos de pesos moleculares menores derivados da proteólise de algumas caseínas. Os dois grupos principais são o da β -Lg e α -La, representando mais de 80% das proteínas do soro, sendo que a β -Lg representa aproximadamente 55% e a α -La 25% das proteínas totais (HORNE, 1990).

A mais abundante e principal proteína do soro de leite é a β -Lactoglobulina, apresentando estrutura molecular secundária com aproximadamente 15% de α hélice e 50% de β folha e de 15 a 20% "reverse turn". Esta proteína está presente no leite na forma de um dímero quando se encontra a temperatura ambiente e entre um pH de 5 a 7, quando a temperatura está acima dos 40°C os dímeros começam a se dissociar em monômeros (MARSHALL; HARPER, 1988).

O interior da molécula da β -Lg é hidrofóbico e a parte externa é hidrofílica, apresenta ponto isoelétrico de 5,2, sendo que é mais estável em pH 6,0, a desnaturação ocorre a temperaturas de 75°C e pH 2,5,. Dentre a propriedades fisiológicas da β -Lg pode-se citar: capacidade de ligar-se ao retinol, ácidos graxos, substâncias hidrofóbicas e a um receptor do intestino, possível envolvimento com o transporte de vitamina A, o qual confere proteção (MARSHALL ; HARPER, 1988; HORNE, 1990).

A α -Lactalbumina é a segunda proteína mais importante do soro, sendo a mais termoestável e de menor peso molecular. A α -La é uma proteína que se liga ao cálcio e estas ligações são fortemente dependentes do pH. Apresenta também afinidade por outros metais tais como: Zn, Mn, onde as ligações são de tipo dissulfeto, sendo uma proteína com função biológica específica (atua na síntese de lactose em situações de diminuição de glicose). Sabe-se que a α -lactalbumina é produzida pela precipitação térmica ou precipitação ácida na presença de íons cálcio (MARSHALL; HARPER, 1988).

A albumina sérica bovina (BSA) é sintetizada no fígado e secretada no leite, representando 1-2% do total das proteínas do leite (Horne, 1990) A BSA contém a maior cadeia peptídica de todas as proteínas de soro e esta envolvida nas ligações com ácidos graxos (MARSHALL; HARPER, 1988).

Dentre as imunoglobulinas (Ig) do soro de leite temos IgG, IgA e IgM, onde a IgG corresponde à 80% do total das imunoglobulinas. Essas proteínas junto com lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima e xantina oxidase são importantes em relação às propriedades antimicrobianas do colostro, além destas propriedades apresentam também aumento na produção endógena de glutationa, que é um excelente agente antioxidante que também exercem importante papel no sistema imunológico (CHAMPE; HARVEY, 1996).

A lactotransferrina é uma glicoproteína que se liga ao Fe, encontrada no leite, apresenta estrutura secundária e terciária, que tem como função biológica seqüestrar e solubilizar o Fe mantendo o nível de Fe no metabolismo. Essa proteína pode ser um importante componente do sistema bacteriostático,

privando à bactéria de ferro para seu crescimento mostrando efeito inibitório em bactérias gram negativas (HORNE, 1990).

Atualmente o soro do leite é muito valorizado por atletas e esportistas, principalmente por conter todos os aminoácidos essenciais, apresentar excelente digestibilidade e altíssimo valor biológico. Durante o processamento do leite, as vitaminas hidrossolúveis, principalmente a Vitamina C, Vitamina B1 (Tiamina), Vitamina B2 (Riboflavina), Vitamina B5 (Ácido Pantotênico), Vitamina B6 (Piridoxina), Vitamina B12 (Cianocobalamina), e os minerais essenciais são conservados (COLGAN, 1993).

O soro de leite apresenta concentração elevada de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), esta concentração é maior que qualquer outra fonte protéica possa ter, o que lhe confere maior importância para atletas que necessitam desta significativa fonte de energia.

Os aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, a isoleucina e a valina) são considerados essenciais porque o organismo não pode sintetizá-los e devem ser adquiridos através da dieta, encontrados principalmente em proteínas de origem animal. Estes aminoácidos estão na proporção de 15-20% nas proteínas do músculo, são responsáveis por até 16% do fornecimento de energia para o músculo, são oxidados nos músculos periféricos, a diferença do resto dos aminoácidos os quais são metabolizados no fígado. São de grande importância para atletas que necessitam desta fonte de energia, Estes aminoácidos podem ser um dos suplementos mais benéficos para atletas de resistência (VAN HALL *et al.*, 1995).

Os AACR são utilizados em maiores proporções durante a atividade física, agem como fonte de combustível quando os estoques de glicogênio estão baixos, mantém o balanço de nitrogênio prevenindo o estado de catabolismo ocasionado pelo excesso de treino. Esses aminoácidos são liberados na circulação sanguínea pelo fígado durante a atividade física. São metabolizados diretamente nos músculos, participam do processo de geração de energia nas atividades físicas, principalmente as de longa duração evitando a fadiga central.

Recentemente descobriu-se que os processos de fadiga podem ter origem periférica e/ou central. Os mecanismos de fadiga periférica estão relacionados com os grupos musculares envolvidos no exercício físico, sendo que esta fadiga pode acontecer pela depleção de fosfágenos (ATP/CP) e glicogênio muscular (COLGAN, 1993).

A fadiga central está ligada ao sistema nervoso central (SNC) e pode ocorrer tanto pela queda da concentração da glicose plasmática (hipoglicemia) como pelo aumento da serotonina, um neurotransmissor responsável pelas sensações de sonolência, devido ao aumento de captação do aminoácido triptofano, considerado precursor da serotonina. Este aumento pode estar relacionado a diminuição de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), pois eles competem com o triptofano pelo mesmo sistema transportador e pela elevação plasmática de ácidos graxos livres que podem estar complexados à albumina competindo, então pelos mesmos sistemas de ligação dessas moléculas (COLGAN, 1993).

Estudos verificaram que a concentração plasmática de triptofano aumentou e a de AACR manteve-se inalterada em situação de exercício prolongado com uma dieta baixa de carboidratos, aumentando a relação triptofano/AACR. Pesquisas sugerem que completando a dieta do atleta com AACR ajuda a prevenir a queda do desempenho durante o exercício prolongado, por isso, devido a competição na absorção não se deve suplementar AACR junto ao triptofano. Também foi demonstrada a relação entre a suplementação dos AACR com o aumento do glicogênio muscular, o qual aumentaria a concentração de glicogênio no músculo. Com a diminuição do transporte de glicose para o interior da célula, retarda o consumo de glicogênio muscular e a acidose metabólica, causadores da fadiga e com isso há oxidação dos ácidos graxos livres durante o exercício físico retardando o acúmulo de lactato sanguíneo e muscular (causadores da fadiga muscular). Esses dados enfatizam a importância dos carboidratos associados a uma suplementação de AACR na dieta para manter nível ótimo desses aminoácidos (COLGAN, 1993; VAN HALL *et al.*, 1995).

Os AACR podem reduzir ou limitar o catabolismo protéico, sua suplementação parece estimular a secreção de insulina, para isso sugere-se que a síntese de proteína atribuída ao uso do AACR resulta do efeito da leucina de promover a secreção de insulina que é o ativador do anabolismo direto no processo de síntese de proteínas musculares.

Foi mostrado que os AACR podem suprimir o uso de outros aminoácidos para geração de energia durante o exercício prolongado evitando assim o catabolismo protéico durante as atividades extenuantes, com isso, preservando a massa muscular e evitando suas consequências indesejáveis. Melhorando a conversão de glutamina em alanina, aminoácido importante na manutenção da glicose sanguínea (COLGAN, 1993; VAN HALL *et al.*, 1995).

Outra função importante dos AACR é a diminuição do tempo de recuperação das micro-lesões resultantes do esforço físico, como também as evitando. Com isso, fazendo com que o músculo esteja recuperado mais rapidamente, resultando na melhora da "performance" e dos resultados. Estes aminoácidos são encontrados em todas fontes de proteínas animal (15%). Os produtos derivados do leite contêm grandes quantidades deles, sendo a proteína isolada do soro do leite (WHEY PROTEIN 30%) é uma das fontes mais ricas de AACR (COLGAN, 1993; VAN HALL *et al.*, 1995).

Os AACR também estão presentes nos suplementos alimentares na forma isolada ou associada. Os suplementos de aminoácidos apresentam como vantagem uma absorção mais rápida em relação às proteínas, pois não precisam passar pelo processo de digestão, pois já se encontram na sua forma livre. Hoje se encontra no mercado uma gama variada de suplementos à base de aminoácidos (COLGAN, 1993; VAN HALL *et al.*, 1995).

Pelo fato do AACR estimular a produção de insulina pode ocorrer como consequência da retirada rápida da glicose circulante a hipoglicemia causando queda na performance. Portanto aconselha-se evitar o consumo de produtos com elevados teores de AACR imediatamente antes do treino. Usualmente recomenda-se a ingestão de AACR até uma hora antes e duas depois do treino (GOMES; TIRAPEGUI, 1998).

> **3.2.2. Propriedades funcionais fisiológicas das proteínas do soro do leite**

As proteínas do soro do leite possuem componentes funcionais e em muitos casos com propriedades únicas, essencialmente usadas para proporcionar qualidades tecnológicas, estruturais e de textura. Adicionalmente apresentam um grande potencial dentro da nutrição (propriedades fisiológicas), sendo que estas propriedades podem incentivar seu uso como ingrediente alimentar, já que as proteínas do soro são de fácil digestão e de excelente eficiência metabólica. As proteínas do leite possuem alto valor biológico e também excelente balanço de aminoácidos essenciais como os sulfurados, atingindo assim os requerimentos do organismo, a concentração destes aminoácidos é maior que qualquer outra fonte protéica (REGESTER *et al.*, 1996).

As proteínas do soro do leite são ricas em aminoácidos sulfurados, fornecem mais de 100% dos requerimentos nutricionais (FAO recomenda 2,5 mg/g) destes aminoácidos para humanos em crescimento. Os aminoácidos sulfurados desempenham papel muito importante na manutenção dos níveis de antioxidantes naturais no organismo, como a glutationa, que atua estabilizando o DNA durante a divisão celular (REGESTER *et al.*, 1996; MCINTOSH *et al.*, 1998).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias para isolar as proteínas do soro do leite tem-se facilitado sua utilização, em formulas infantis, por apresentar uma composição muita parecida ao leite humano (REGESTER *et al.*, 1996).

Proteínas ricas em aminoácidos sulfurados têm ação protetora contra tumores e agentes precursores dos mesmos, através do fornecimento de metionina e cisteina na forma biologicamente disponível. Estes aminoácidos atuam na metilação celular causando impacto na estabilidade do DNA (MCINTOSH *et al.*, 1998).

De acordo com BRINK (1996), as proteínas do soro parecem ser as únicas proteínas com habilidade de aumentar a resposta imune, elevar os níveis de glutationa celular e prolongar a vida dos animais de experimentação.

A glutationa é um tripeptídio multifuncional composto por cisteína, ácido glutâmico e glicina, agindo como antioxidante, anticancerígeno e restaurador do DNA, sendo encontrada em quase todas as células do organismo animal e humano. A glutationa é um potente agente antioxidante e desintoxicante que neutraliza os radicais livres. Protege contra a clivagem do DNA causada por raios X e radiações ultravioleta do sol ajudando a manter a capacidade carreadora de oxigênio das células vermelhas do sangue (BRINK, 1996).

As proteínas do soro do leite na forma biologicamente ativa, fornecem aminoácidos e peptídeos precursores de glutationa. Tal hipótese sugere que as frações do soro do leite rico em aminoácidos sulfurados podem manifestar grande atividade imunomoduladora atuando contra o desenvolvimento do câncer de cólon (MCINTOSH *et al.*, 1998).

Ensaios com animais experimentais demonstraram retardamento e resistência no desenvolvimento de câncer de cólon quando alimentados com proteínas de soro de leite (Regester *et al.*, 1996; McIntosh; Le Leu, 2001).

Além das propriedades fisiológicas importantes (bactericidas, imunológicas), associadas à proteção para o neonato contra doenças também possuem efeitos moduladores biológicos, por promoverem aumento nos níveis de glutationa celular. O fator de crescimento ligado à insulina (IGF-1) é um hormônio liberado durante o metabolismo do hormônio de crescimento. Estudos indicam que a quantidade de IGF-1 é diretamente proporcional à quantidade de proteína na dieta. A hidrólise das proteínas do soro de leite, para obter di, tri, e oligopeptídios, promove a elevação do valor biológico (VB) do produto e consequentemente ocorre um aumento na liberação de IGF-1. Isto confere às proteínas do soro de leite a capacidade formadora de massa corporal (BRINK, 1996; MCINTOSH *et al.*, 1998).

Tais achados são de grande valia para estudos futuros sobre a terapêutica desses produtos, para o desenvolvimento de produtos à base de

soro de leite, para o marketing do mercado em ascensão dos alimentos funcionais (MCINTOSH *et al.*, 1998).

➤ 3.2.3. Produtos protéicos do soro

O soro líquido pode passar por varias etapas de processamento antes de se tornar concentrado ou isolado protéico. Essas etapas incluem hidrólise parcial das caseínas com quimiosina, coagulação e separação das caseínas, ultrafiltração e diafiltração para remoção de lactose (açúcar do leite, com peso molecular de 342 Da), sais minerais e gordura. Pode passar por processo de osmose reversa para separar diferentes partículas moleculares; processos de troca iônica e secagem de alta velocidade com baixa temperatura para evitar desnaturação dos componentes protéicos do soro (BRINK, 1996; JACOBUCCI, 1999).

Os produtos obtidos do soro integral (soro em pó, e soro desmineralizado) contêm, relativamente, baixas concentrações de proteína (10-15%) e são usadas em alguns tipos de queijos (incluindo o queijo feito da ultrafiltração do leite) e combinadas com as caseínas ou proteínas microbianas, como um meio de aumentar o rendimento. As proteínas do soro são mais concentradas no soro deslactosado e desmineralizado (15-25% em peso seco), mas tem poucas características funcionais (MARSHALL; HARPER, 1998; JACOBUCCI, 2001).

3.3. ATIVIDADE FÍSICA

A alimentação de um atleta é diferenciada dos demais indivíduos em função do elevado gasto energético elevado e da necessidade de nutrientes que varia de acordo com o tipo de atividade, fase de treinamento e momento de ingestão. Em geral estes indivíduos necessitam de um aporte glicídico maior que outros, pois os carboidratos repõem o glicogênio muscular que é, por sua

vez, o principal substrato energético utilizado durante o exercício (MCARDLE *et al.*, 1998).

O ATP contém a energia correntemente utilizada para todo trabalho biológico dentro da célula. A energia liberada após a quebra do ATP [em adenosina difosfato (ADP) + fosfato inorgânico (Pi)], por exemplo, é utilizada para a contração do músculo esquelético durante o exercício. Além do ATP, o músculo possui um outro composto fosfatado altamente energético, a creatinina-fosfato (CP) considerada como o “reservatório” do fosfato altamente energético, utilizado para a Re-síntese de ATP (MCARDLE *et al.*, 1991, 1998).

A atividade física ou exercício requer grande quantidade de energia imediata. Existem quatro vias que fornecem energia durante o exercício, de acordo com a intensidade e a duração do mesmo (**Figura 1**).

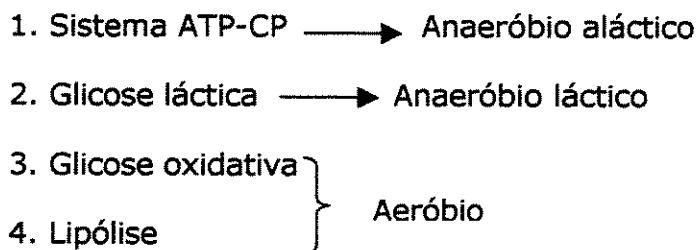


Figura 1. Vias de fornecimento de energia durante o exercício.

O sistema adenosina-trifosfato-creatina-fosfato (ATP-CP) é um mecanismo estimulado pela hidrólise do ATP no início do exercício, principalmente de maior intensidade. A reserva de ATP (molécula energética) muscular é extremamente pequena e se esgotaria nos primeiros três segundos de exercício. Neste caso o composto CP que é um reservatório de fosfatos de alta energia, transfere um fosfato para reconstituir o ATP, que foi hidrolisado em ADP + Pi, em ATP novamente. Essa via é a única que possui a capacidade de fornecer energia de forma imediata; porém, esgota-se rapidamente, havendo a necessidade do aumento gradual da participação das demais vias (TIRAPEGUI, 2002). O sistema ATP-CP é mostrado na **figura 2**.

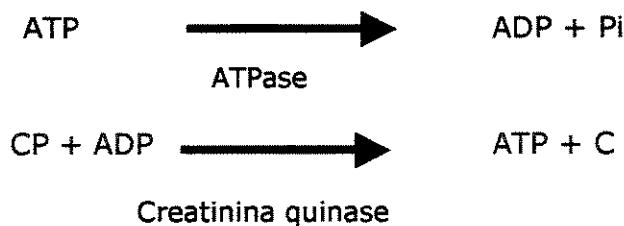
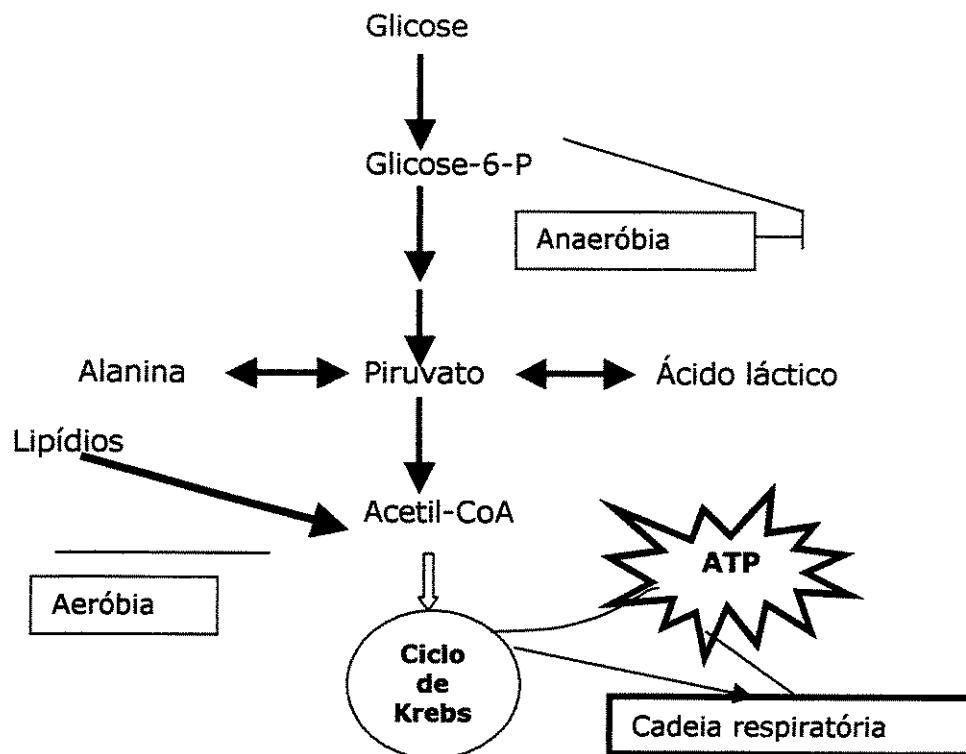


Figura 2 Exemplifica a hidrólise do ATP e ressíntese pela cratinina.

A via glicolítica se divide anaeróbia e aeróbia, sendo a primeira estimulada pela diminuição da atividade do sistema ATP-CP e a segunda no momento em que o exercício necessita de aporte maior de energia, por aumento da duração da atividade física.

O sistema ATP-CP, assim como a fase anaeróbia da via glicolítica, é considerada fonte de energia de curta duração, havendo, portanto, a necessidade da ativação de mecanismos de maior geração de energia com a prorrogação de exercício. Esses mecanismos constituem a fase aeróbia da via glicolítica e a oxidação de ácidos graxos provenientes da lipólise, que por sua vez compreendem o metabolismo oxidativo. A geração de ATP é significativamente maior no metabolismo oxidativo em relação ao sistema ATP-CP e à fase anaeróbia da via glicolítica, sendo a oxidação de ácidos graxos a via capaz de fornecer mais ATP em relação às outras vias (LEMON, 1995; TIRAPEGUI, 2002). Este sistema é mostrado no **fluxograma 1**.



Fluxograma 1. Glicólise aeróbica e anaeróbia.

Os exercícios de curta duração e de alta intensidade utilizam praticamente só o sistema ATP-CP como fonte de energia quando a duração se entende por mais tempo, a glicose começa a ser utilizada até a formação de ácido láctico. Essas duas vias características dos exercícios de curta duração e alta intensidade fazem parte do metabolismo anaeróbico, no qual não há utilização do oxigênio consumido durante o exercício e a energia produzida é pequena, condizente com a demanda exigida por estes tipos de exercícios (LEMON, 1995; TIRAPEGUI, 2002).

Este sistema envolve o armazenamento de ATP e CP em fibras do músculo esquelético. Dependendo do tipo da fibra e do treino, a concentração de CP é de três a cinco vezes superior à do ATP. Este sistema é anaeróbico, ou seja, que a quebra deles ocorre independente da presença do oxigênio (WOLINSKY; HICKDON, 1996).

O sistema do ácido láctico é um sistema anaeróbico, no qual o ATP é produzido no músculo esquelético via glicólise, que envolve a quebra incompleta da glicose até ácido láctico. A quebra da glicose (glicólise) ou do

glicogênio armazenado no músculo (glicogenólise) fornecem energia na forma de ATP. Necessária para exercício anaeróbico de alta intensidade (MCARDLE *et al.*, 1991).

Para a subsequente degradação da glicose e do piruvato até CO₂ e H₂O, através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e o transporte pelo sistema de elétrons, o sistema anaeróbico requer da presença de oxigênio (MCARDLE *et al.*, 1991).

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

As vias anaeróbias recrutam fibras musculares brancas (tipo II), predominantemente glicolíticas e com uma reserva de glicogênio e creatinina fosfato maior.

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

O tipo de treinamento determina as propriedades contráteis dos músculos, podendo conferir grande capacidade adaptativa à fibra muscular. No entanto, músculos de contração rápida, como o gastrocnêmico são capazes de produzir movimentos rápidos de grande potência, mas pouco repetitivos, possuindo defesa antioxidante baixa, utilizam carboidratos como principal fonte de energia. Por outro lado, músculos de contração lenta como o sóleo, são capazes de produzir movimentos lentos e repetitivos, conferem resistência alta

defesa antioxidante e utilizam carboidratos e lipídeos como fonte de energia (GUYTON, 1988; SMOLKA, 1999).

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

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

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

3.4. METABOLISMO PROTÉICO E ATIVIDADE FÍSICA.

A ingestão de proteína pode variar de acordo com o tipo de atividade física realizada, mas deve manter a proporção máxima de 15% em relação ao valor calórico total da dieta para garantir a sua propriedade plástica (McArdle et al., 1998; Tirapegui, 2002). Ainda é bastante discutida a recomendação protéica para os atletas, mas já é estabelecido que representa quantidades maiores que as recomendadas para indivíduos sedentários, que atualmente é

de 0,8 g/Kg. Dependendo do tipo de atividade e da fase de treinamento essa recomendação pode variar entre 1-2,4 g/Kg. O teto máximo de 2,4 g/Kg foi observado em um estudo como sendo o máximo que o organismo conseguiria absorver para síntese protéica; acima disso essa proteína poderia estar sendo desviada para produção de energia (síntese de compostos intermediários do ciclo de Krebs), gliconeogênese ou sendo excretada, já que não temos tecidos de reserva protéica (MCARDLE *et al.*, 1998).

Para atividades de resistência, preconiza-se uma recomendação de cerca de 1 g/Kg para intensidade moderada, 1,1-1,7 g/kg para intensidade pesada e 1,8 g/kg para extremamente pesada. Já nos exercícios de força um indivíduo treinado deve consumir de 1-1,5 g/Kg, enquanto um iniciante, até 1,8 g/Kg. Essas quantidades devem representar no cômputo final 10 a 15% do valor energético total, o que implica aumento proporcional de energia quando se aumenta a ingestão protéica absoluta. Se a quantidade de proteína ingerida na dieta não é acompanhada de um aumento no valor calórico total da mesma, as porcentagens protéicas podem superar 15%, e com isso diminuir o seu aproveitamento pelo organismo. Isto quer dizer que sua propriedade construtora estará limitada, pois o excedente se transformará em energia (MCARDLE *et al.*, 1998).

Há pouco tempo atrás o papel das proteínas como fonte de energia era tido como desprezível, por se tratar de um elemento estrutural. Hoje, porém sabe-se que 60% das proteínas consumidas geram calor e, portanto estão envolvidas no processo de fornecimento de energia, tal como os carboidratos e os lipídios. É claro que sua participação não pode superar os carboidratos e lipídios, nem tão pouco é viável consumir mais proteína em detrimento dos outros macronutrientes para estes fins. Um excesso da degradação protéica pode diminuir substancialmente a massa muscular do organismo, uma vez que é o primeiro local propício à oxidação de aminoácidos, ao passo que um excesso da ingestão acentua a via de geração de energia pelos aminoácidos. Sendo assim necessário um equilíbrio para que a falta ou excesso de proteínas proporcione os benefícios desejados (LEMON, 1995; MCARDLE *et al.*, 1998).

É conhecido que os aminoácidos são os precursores das proteínas, são entidades fundamentais nas estruturas e funções do organismo. Os aminoácidos, além de servirem de combustível para a produção de energia durante o exercício, influem também no desenvolvimento da fadiga em condições de exercício intenso. Entre tanto pouco se sabe ao respeito dos mecanismos envolvidos neste processo (DAVIS *et al.*, 1997).

O exercício físico induz a diminuição de alguns aminoácidos como a leucina (LEU), assim como o aumento de outros como a alanina (ALA) durante a contração muscular. O exercício físico reduz a síntese protéica e leva a uma diminuição do conteúdo de proteínas no músculo, fígado e plasma (LINDER, 1991; TASSI, 1996).

A síntese de proteínas pode ser estimulada pela suplementação de aminoácidos após o exercício (TIPTON *et al.*, 1999).

ROY *et al.* (1997) realizaram um estudo mostrando que a suplementação de glicose uma hora após o exercício, em função do aumento da concentração de insulina, diminui significativamente a quebra da proteína e excreção urinária de nitrogênio, resultando num melhor balanço de proteínas. A insulina e a atividade física são responsáveis pela regulação do metabolismo de proteínas e carboidratos.

O excesso de proteína não vai ser estocado pelo organismo; se o músculo não tiver condição de utilizar os aminoácidos para síntese de tecido muscular, as cadeias carbônicas foram utilizadas na gliconeogênese e o nitrogênio excedente será excretado pela urina. A excreção aumentada de nitrogênio se dá as custas de maior necessidade de água, uma vez que ele é incorporado à uréia e esta à urina. Isto, em longo prazo, pode sobrecarregar os rins e, de forma aguda, causar desidratação. Grandes ingestões de proteínas devem ser acompanhadas de maior consumo de água (TIRAPEGUI, 2002).

Pelo descrito pode-se verificar que o aumento da massa muscular não se dá pela ingestão isolada de proteína; são necessários estímulos que consistem em treinamento para hipertrofia muscular e grande aporte energético,

principalmente proveniente de carboidratos. Além de o músculo necessitar de energia para hipertrofiar, um conteúdo adequado de glicogênio é fundamental para preservar a propriedade plástica da proteína; em outras palavras, garantir o seu direcionamento para a síntese protéica, recuperação das lesões musculares e a não geração de energia e gliconeogênese.(LEMON, 1995; TIRAPEGUI, 2002).

Efeitos paralelos importantes devem ser considerados, o consumo de alimentos protéicos em grandes quantidades podem provocar uma perda acentuada de cálcio, proporcionando a desmineralização óssea (osteoporose), resistência periférica à insulina e gota (Gomes e Tirapegui, 1998). Atletas acreditam que maior a ingestão de proteína ocasiona ganho de massa muscular e maior desempenho físico. Atletas e alguns freqüentadores de academias de musculação consomem mais proteína do que precisam e facilmente ultrapassam os 2.4g/kg sem nenhuma orientação profissional.

Muitos estudos vêm sendo realizados, principalmente no âmbito dos benefícios da suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), e poucos resultados são observados no que diz respeito à prorrogação da fadiga e ganho de massa muscular. Esta questão é muito discutida, pois se trataria de uma fadiga central, onde os AACR competiriam com o aminoácido triptofano na forma livre pelos transportadores localizados na barreira hematoencefálica. Maior influxo de AACR em detrimento do triptofano impediria a síntese de serotonina originada por esse aminoácido no interior do sistema nervoso central. A serotonina ou 5-hidroxitriptamina é um neurotransmissor responsável pelo estado de letargia condizente com a fadiga e, portanto, determina a fadiga central. Contudo, a questão da competição pelos mesmos transportadores ainda é controversa (LEMON, 1995; TIRAPEGUI, 2002).

Um ponto comum de desvantagem na suplementação de AACR é o aumento da produção de amônia plasmática, que poderia também permear a barreira hematoencefálica e provocar o adiantamento da fadiga, ao invés do esperado. Há ainda a suplementação de AACR para que estes sejam oxidados nos músculos e aumentem a liberação de glutamina pelo mesmo; sabendo-se

que a glutamina é o principal nutriente das células do sistema imune, este poderia ser um recurso para aumentar a resistência imunológica, normalmente reduzida em atletas (LEMON, 1995).

A suplementação com outros aminoácidos ainda está em estudo, como os aminoácidos do ciclo da uréia (arginina, ornitina e citrulina) para detoxificar o excesso de amônia gerada durante o exercício, ou de aspartato e asparagina, os quais são precursores de oxaloacetato. Assim estes últimos poderiam estar poupando glicogênio e reduzindo a degradação protéica no momento em que a grande quantidade de acetil-CoA, proveniente da β -oxidação lipídica, não encontrasse oxaloacetato suficiente para se condensar e estimular ciclo de Krebs (TIRAPEGUI, 2002).

3.5. GLICOSE SÉRICA

O organismo animal necessita de fornecimento permanente de energia a fim de manter as suas funções biológicas. A maioria das substâncias produtoras de energia através da oxidação está presente nos alimento, principalmente sob a forma de carboidratos, lipídios e proteínas.

O músculo esquelético é o principal consumidor de glicose do corpo imediatamente após a absorção, assim como durante o exercício. A glicose é levada para o tecido através da difusão facilitada pelos dois transportadores de glicose, GLUT1 e GLUT4 os quais transportam a glicose para dentro da célula do músculo esquelético, existindo outro tipo de transportador GLUT3 presente no estado fetal é um transportador denominado GLUT3 fetal músculo/neural. O transportador 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 (KLIP et al., 1996).

O estado hiperglicêmico é caracterizado pela elevação exacerbada da concentração da glicose sérica, o qual interfere quimicamente nas funções das

proteínas do plasma e fígado. É por isso que a glicose sérica, quando em excesso de 100-120 mg/dL, deve ser retirada da circulação e convertida a glicogênio. Entretanto, quando os níveis de glicose sanguínea se encontram diminuídos, deve ocorrer reposição dos níveis mediante a produção de glicose originada pela glicogenólise ou pela via da gliconeogênese. Nesta via há formação de glicose a partir das proteínas, para suprir as necessidades do cérebro (WOJTASZEWSKY *et al.*, 2000).

O pâncreas é um meio de controle da concentração de glicose sanguínea através da produção de insulina. Em situações de alta concentração de glicose, a insulina promove o transporte rápido de glicose para dentro da célula, além do mecanismo tampão hepático. O pâncreas é estimulado a secretar glucagon, quando a concentração de glicose é baixa, quebrando o glicogênio hepático em glicose, sendo liberado para o sangue (GUYTON, 1988).

A insulina e a atividade contrátil são os reguladores bioquímicos mais importantes do metabolismo do glicogênio no músculo esquelético. No estado pós-prandial, a insulina promove a assimilação de glicose no músculo e o acúmulo de glicose como glicogênio. A gliconeogênese é ativada durante a contração do músculo esquelético, além de se produzir um incremento na síntese de glicogênio no período posterior à contração (JEFFREY *et al.*, 1999).

A conversão de UDP-glicose (Uridindifosfato glicose) em glicogênio pela glicogênio sintase é o passo limitante do ritmo da síntese de glicogênio e esta enzima é regulada tanto por mecanismos alostéricos como mecanismos de fosforilação e defosforilação (VILARR-PALASI; LARNER, 1960; JEFFREY *et al.*, 1999)

O glicogênio sintetase é serina fosforilada em múltiplos lugares e o tratamento de insulina resulta na desfosforilação hierárquica de vários destes lugares, levando à ativação da enzima e uma síntese de glicogênio (JEFFREY *et al.*, 1999).

3.6 INSULINA

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido pelas células do pâncreas, representando 1% da massa do pâncreas. Este hormônio é considerado muito importante por coordenar a utilização de combustíveis pelos tecidos, sendo considerado um hormônio anabólico porque estimula a síntese de nutrientes energéticos como glicogênio e triacilglicerol e a síntese de proteínas.

Este hormônio é composto de 51 aminoácidos arranjados em duas cadeias polipeptídicas A e B ligadas por pontes dissulfeto, esta molécula também contém uma ligação dissulfeto intramolecular entre os resíduos de aminoácidos 6 e 11 da cadeia A (CHAMPE; HARVEY, 1996).

Basicamente, a insulina, no fígado, inibe a glicogenólise, no músculo aumenta a síntese de glicogênio e no tecido adiposo, estimula a síntese de triacilgliceróis. A insulina aumenta a captação de glicose no músculo e no tecido adiposo, resultando em maior concentração de glicose, estimulando a síntese e o armazenamento de glicogênio e triacilgliceróis neste tecidos, respectivamente. Também estimula a síntese protéica e inibe a degradação de proteínas intracelulares (LEHNINGER, 1989; MURRAY *et al.*, 1996; RAMOS, 2001).

3.7. GLICOGÊNIO MUSCULAR

O glicogênio muscular consiste num importante estoque de combustível para o exercício prolongado aeróbico de alta intensidade (Andersen e Saltin, 1985; Hansen *et al.*, 1998). A capacidade aeróbica está diretamente relacionada com a concentração de glicogênio muscular. Dessa forma, a redução do estoque de glicogênio é progressiva, em função do tempo de atividade física (GOREHAM *et al.*, 1999).

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 (CARTREE *et al.*, 1989; HANSEN *et al.*, 1998; IVY; KUO, 1998).

Vários estudos têm sido conduzidos para determinar as maneiras de aumentar a taxa da ressíntese de glicogênio muscular, já que esta pode demorar relativamente até 24 horas, para a recuperação completa do mesmo (VAN-HALL *et al.*, 2000).

➤ 3.7.1. Metabolismo do glicogênio

Uma fonte constante de glicose sanguínea é necessidade absoluta para a vida humana. A glicose é a fonte de energia do cérebro e para células com poucas ou nenhuma mitocôndria como os eritrócitos maduros. Também é essencial como fonte de energia para o músculo em exercício, como substrato da glicose anaeróbica, a qual pode ser obtida de três fontes primárias: dieta, degradação do glicogênio e gliconeogênese.

Os principais depósitos de glicogênio no corpo são encontrados no músculo esquelético e fígado, outras células podem armazenar quantidades pequenas. A função do glicogênio muscular é servir como uma reserva de combustível para a síntese de ATP durante a contração muscular enquanto que a função do glicogênio hepático é manter a concentração de glicose no sangue (glicemia) especialmente nos estágios iniciais de um jejum (CHAMPE; HARVEY, 1996).

➤ 3.7.2. Quantidades de glicogênio hepático e muscular

A síntese e degradação do glicogênio são processos que ocorrem continuamente, as diferenças entre as velocidades destes dois processos

determinam os níveis de glicogênio depósitos durante estados fisiológicos específicos.

O adulto bem alimentado apresenta aproximadamente 100-400g de glicogênio entre 1%-2% e 6%-8% do peso do músculo em repouso e do fígado respectivamente. Não se sabe o que limita a produção de glicogênio a estes níveis.

Os depósitos de glicogênio hepático aumentam durante o estado pós-prandial e são exauridos durante um jejum. O glicogênio muscular não é afetado por períodos curtos de jejum e é apenas moderadamente diminuído em jejum prolongado. O glicogênio muscular é sintetizado para repor os depósitos do músculo após terem sido exauridos, por exemplo, pelo exercício. Nota "A síntese e degradação do glicogênio são processos que ocorrem continuamente, as diferenças entre as velocidades destes dois processos determinam os níveis de depósitos glicogênio durante estados fisiológicos específicos" (CHAMPE; HARVEY, 1996).

3.8. LACTATO SANGUÍNEO

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

O lactato foi por muito tempo considerado como um detrito metabólico ou perda inevitável que pode movimentar-se rapidamente através das membranas musculares por simples difusão. Existem várias teorias ao respeito, como a proposta por Lehninger (1970), citado por (Galdden, 2000) que diz que "O lactato é o produto final na via glicolítica em condições anaeróbicas sendo difundido através das membranas das células plasmáticas

para seus arredores, quando o músculo encontra-se em atividade vigorosa, sendo convertido em glicose no fígado durante a recuperação”.

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

Assim, durante o exercício intenso o lactato se acumula no músculo causando uma quebra no pH intracelular, potencialmente resultando em cãibras. Grande parte deste lactato posteriormente se difunde para a corrente sanguínea (CHAMPE; HARVEY, 1996).

➤ 3.8.1. Consumo de lactato

A direção da reação da lactato desidrogenase depende das concentrações intracelulares relativas do piruvato, lactato e da razão NADH/NAD⁺ na célula, p.e. no fígado e coração, a relação NADH/NAD⁺ é menor que no músculo em exercício. O fígado e o coração oxidam lactato (obtido do sangue) em piruvato. No fígado, o piruvato é convertido em glicose pela gliconeogênese ou oxidado no ciclo de Krebs. O músculo cardíaco oxida exclusivamente o lactato até CO₂ e H₂O via ciclo de Krebs (CHAMPe; HARVEY, 1996).

A quantidade a mais de oxigênio necessário para se recuperar de um período em que a disponibilidade de oxigênio foi inadequada, é denominado débito de oxigênio. O qual freqüentemente está relacionado à morbidade ou mortalidade do paciente.

O lactato é liberado no sangue pelas células que não possuem mitocôndrias, como as hemácias e pelo músculo esquelético em exercício. No ciclo de Cori (**figura 3**), a glicose originária do sangue é convertida pelo músculo em exercício em lactato, o qual se difunde no sangue. Este lactato é captado pelo fígado, e convertido em glicose, a qual é liberada novamente na circulação (CHAMPE; HARVEY, 1996).

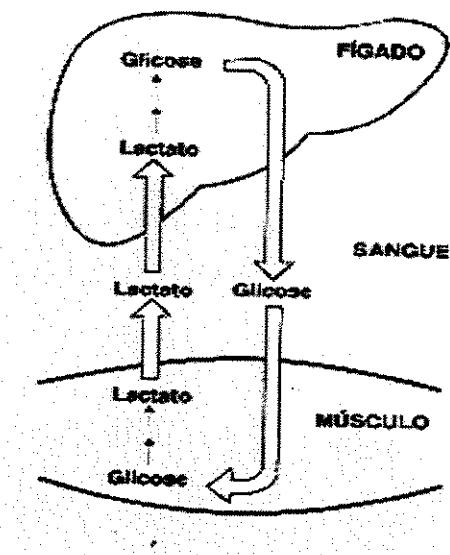


Figura 3 O ciclo de Cori (Champe e Harvey, 1996)

"O oxigênio adicional consumido durante o período de recuperação é chamado *débito de O₂* e corresponde à oxidação posterior, no fígado e coração, do excesso de ácido láctico formado durante a atividade muscular intensa. Aquela parte do excesso, inicialmente acumulado no sangue durante a atividade, e que não for processado pelo coração, será convertido a glicogênio no fígado. O ATP requerido é derivado dessa porção de ácido láctico oxidado através do ciclo do ácido tricarboxílico no fígado" (Hill et al., 1924) citado por GLADDEN (2000).

Anos depois Matheus Van holde em seu livro de bioquímica apresenta um esquema muito diferente. Eles postularam que a acumulação do lactato no músculo esquelético é uma consequência do metabolismo anaeróbico o qual

ocorre quando a necessidade dos tecidos em gerar energia excede sua capacidade para oxidar o piruvato produzido na glicólise.

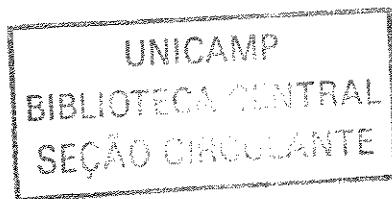
Estudos metabólicos recentes utilizaram ^{31}P -NMR (ressonância magnética nuclear de fósforo 31) sugerem que o lactato é realmente um intermediário e não um metabólito final, com o único destino de ser reconvertido a piruvato. Estes estudos mostram ainda que, em tecidos musculares completamente oxigenados,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

A produção de lactato pelo músculo é menor durante a atividade de contração, fato que foi observado em ratos treinados e sedentários (Tassi *et al.*, 1998), os autores observaram que em ratos submetidos ao exercício exaustivo, os níveis de lactato foram menores nos animais treinados do que nos sedentários. Sendo importante ressaltar que o tempo de exaustão foi previsivelmente menor nos sedentários.

Em 1999, PILEGAARD *et al.*, observaram que a atividade física de alta intensidade induziu um aumento na capacidade de transporte de lactato muscular em humanos. Sugerindo que o transporte de lactato muscular pode ser alterado pela atividade intensa, o que sendo um importante meio de regulação do lactato no músculo.

3.9. ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGL)

As gorduras podem ser classificadas em três tipos: aquelas consideradas 1) ruins que são as gorduras saturadas, encontradas nas carnes e outras proteínas de origem animal. Este tipo de gordura é sólidas a temperatura ambiente e tem sido associadas a doenças do coração e arterosclerose YAMANOTO, 1996).



2) Péssimas: (Trans-fatty acids). Não são encontradas na natureza e são produzidas quimicamente devido a altas temperaturas e ao processo industrial de hidrogenação que transformam óleos refinados em margarinas, são conhecidas por diminuir testosterona, aumentar o nível de insulina, inibir o sistema imunológico e aumentar a fração LDL do colesterol (YAMANOTO, 1996).

3) Boas: são as gorduras monoinsaturadas e insaturadas, normalmente líquidas à temperatura ambiente e consideradas muito saudáveis. Estas gorduras possuem ácidos graxos essenciais ao desenvolvimento humano, assim como os demais nutrientes (vitaminas, proteínas, minerais, etc) (Yamanoto, 1996).

Os ácidos graxos essenciais (EFA'S), não podem ser produzidos pelo organismo e são necessários para milhares de reações bioquímicas corporais. Estes ácidos graxos essenciais são chamados de ácido linoléico (ômega 6) e alfa ou gama ácido linolênico (ômega 3). O organismo pode elongar o ácido linoléico para fazer outros dois ácidos graxos essenciais: ácidos docosahexanóico (DHA) e ácido eicosapentanóico (EPA) estes ácidos são comumente encontrados em óleos de peixes de água gelada (salmão, trutas, etc.). No rúno vegetal a melhor fonte do ácido linolênico é o óleo de linhaça.

Um dos principais papéis dos ácidos graxos essenciais é ser um componente de todas as membranas celulares. Os EFA'S são necessários para a formação de componentes vitais orgânicos chamados de "Prostaglandinas ou Eicosanóides". Estas substâncias têm atuação similar aos hormônios e são responsáveis por uma enorme variedade de funções incluindo: regulação de pressão sanguínea, função cardíaca, resposta a alergias, inflamação, transmissões nervosas e produção dos hormônios esteróides. Estas substâncias são produzidas e utilizadas nas mesmas células, este descobrimento foi motivo de que os autores receberam o premio Nobel em 1946 (FORYTHE, 1991; YAMAMOTO, et al., 1996).

O ácido graxo consiste em uma cadeia de hidrocarboneto com um grupo carboxila terminal (COOH), que em pH fisiológico torna-se carregado

negativamente ($-COO^-$). Este grupo aniônico possui uma afinidade pela água, contribuindo ao ácido graxo natureza anfipática (uma região hidrofílica e uma hidrofóbica). Nos ácidos graxos de cadeia longa a porção hidrofóbica é predominante, são moléculas altamente insolúveis em água e transportadas pela circulação sanguínea em associação à albumina proteína plasmática. Mais de 90% dos ácidos graxos encontrados no plasma estão na forma de ésteres de ácidos graxos (principalmente triacilglicerol, éster de colesterol e fosfolipídios) contidos nas lipoproteínas circulantes.

Os ácidos graxos podem ser encontrados no organismo na forma livre (não esterificada) ou como acil ésteres graxos, em moléculas mais complexas, como os triacilgliceróis. Baixos níveis de ácidos graxos livres ocorrem em todos os tecidos, mas quantidades substanciais algumas vezes podem ser encontradas no plasma, particularmente durante o jejum. Os AGL plasmáticos (transportados pela albumina sérica) seguem uma rota partindo de seu ponto de origem (triacilglicerol do tecido adiposo ou lipoproteínas circulantes) até seu sítio de consumo (maioria dos tecidos). Estes ácidos podem ser oxidados por muitos tecidos, tais como fígado e músculo para fornecer energia, também são precursores de muitos compostos, incluindo os glicolipídios, fosfolipídios, esfingolipídios, prostaglandinas e ésteres de colesterol. Já os ácidos graxos esterificados em forma de triacilgliceróis servem como principais reservas de energia do corpo (CHAMPE; HARVEY, 1996).

A concentração de AGL séricos sofre uma diminuição passageira durante o exercício, seguida de utilização elevada. A utilização dos carboidratos é maior nos exercícios de grande intensidade, já os lípides são mais utilizados quando a atividade física se prolonga por um maior período de tempo. Em contraste, a oxidação das gorduras diminui em exercícios de grande intensidade, quando comparada à oxidação em atividade moderada (MARTIN III; KLEIN, 1998).

MAZEPA *et al.* (2000) submeteram ratos à atividade física e observaram um aumento nos níveis de β -hidroxibutirato durante o exercício, sugerindo que a utilização lipídica foi aumentada durante tal atividade. Segundo Hickson

(citado por Whitley *et al.*, 1998) a utilização de lípides é maior durante o exercício prolongado, o qual consequentemente retarda o ponto de exaustão.

3.10. COLESTEROL E TRIGLICÉRIDOS NO SANGUE

Os principais lipídios circulantes no sangue humano são classificados em: triacilgliceróis; colesterol livre; ésteres do colesterol e fosfolipídios, os quais são transportados na forma de moléculas esféricas complexas de tamanho e densidade variável, as lipoproteínas (MAHAN; ARLIN, 1995).

O colesterol realiza uma série de funções vitais no corpo tais como: componente essencial das membranas celulares, precursor dos ácidos biliares, dos hormônios esteróides e da vitamina D. É sintetizado na maioria dos tecidos, particularmente no fígado e na mucosa intestinal. O colesterol é também um determinante da fluidez da membrana para as regiões hidrofóbica e hidrofílica (Thomas e Holub, 1994). No ser humano o colesterol é derivado da dieta (200-400mg/dia) e da síntese endógena (750-1000mg/dia). A velocidade de síntese do colesterol é influenciada pela própria concentração de colesterol dentro da célula, em sistema de controle do tipo *feedback* (Mahan e Arlin, 1995). O colesterol endógeno (como ácidos biliares) e o colesterol da dieta são ambos transformados no intestino e absorvidos. A absorção do colesterol endógeno parece ser mais eficiente do que do colesterol da dieta (Thomas e Holub, 1994). Porém, o colesterol plasmático não é finamente regulado, e níveis elevados aumentam o risco de doenças cardiovasculares (CHAMPE; HARVEY, 1996).

Os lipídeos são insolúveis em soluções aquosas e não podem circular no plasma. Elas precisam combinar-se com proteínas especializadas chamadas de apolipoproteínas ou apoproteínas. O complexo apoproteína-lipídeo é denominado de lipoproteína, cuja principal função é transportar os lipídeos pelo organismo incluindo as vitaminas lipossolúveis as quais ajudam a estabilizar as membranas celulares.

São macro moléculas complexas que contém um núcleo hidrofóbico onde se concentram ésteres de colesterol e triacilgliceróis, envolvidas por uma camada de fosfolipídios, colesterol livre e proteínas denominadas apolipoproteínas. São classificadas em 5 grandes classes: quilomícrons, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (GURR, 1986).

Os quilomícrons são lipoproteínas de maior tamanho e menor densidades, são constituídas aproximadamente 85% de triacilgliceróis e somente 2% de proteína. São os principais carreadores da gordura derivada da dieta, fazendo o transporte nos eritrocitos. As VLDL são de menor tamanho e contêm 50% de triacilgliceróis 20% de colesterol e 20% de fosfolipídios, são os principais carreadores do triacilglicerol formadas no fígado a partir de carboidrato. As HDL são ainda de menor tamanho, com 50% de proteína, 20% de colesterol e 20% de fosfolipídios. Sua função é de transportar o excesso de colesterol das membranas para o fígado onde pode ser degradado ou convertido em ácidos biliares. Estas moléculas são produzidas no fígado e em outros tecidos. Sabe-se que as HDL reduzem os ésteres de colesterol celular nas células espumosas. Acredita-se que a função anti-aterogênica das HDL envolve a capacidade de reduzir ésteres de colesterol celular nas células espumosas. Kajikawa *et al.* (1994) investigaram o efeito das proteínas de soro 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, sendo estes efeitos atribuídos principalmente a lactoferrina.

Sabe-se que os macrófagos acumulam ésteres de colesterol e funcionam como precursores das células espumosas que são encontradas no início das lesões ateroscleróticas (KAJIKAWA *et al.*, 1994; JACOBUCCI *et al.*, 2001).

A LDL é originada principalmente da degradação das VLDL, ricas em triacilgliceróis, mas podem também ser produzidas no fígado. Esta molécula é

rica em colesterol (principalmente ésteres de colesterol) sendo responsável por cerca de 65% dos níveis de colesterol total do sangue (GURR, 1986).

Indivíduos com níveis elevados de colesterol sanguíneo têm uma incidência elevada de aterosclerose, doença crônica na qual depósitos de colesterol, ésteres de colesterila e restos celulares se acumulam sobre as superfícies internas das artérias de grande e médio calibre, reduzindo o fluxo de sangue e causando a doença arterial coronária. A redução do colesterol no sangue por modificação da dieta ou por administração de drogas diminui o risco desta doença.

O nível de colesterol no plasma é moderadamente reduzido quando dietas pobres em colesterol são consumidas. Assim, é importante identificar e reduzir os alimentos ricos em colesterol. O efeito do colesterol da dieta sobre o colesterol plasmático é menos importante do que a quantidade e tipos de ácidos graxos consumidos, sobretudo se a gordura saturada (ácidos graxos de C>20) for parte importante da dieta.

Os triacilgliceróis são os principais lipídeos ingeridos e armazenados dentro do corpo, no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético. Constituídos por três ácidos graxos combinados com glicerol. Os ácidos graxos podem ter entre 4-30 átomos de carbono e constituem a parte principal do triacilglicerol (Mahan ; Arlin, 1995). Os triacilgliceróis ingeridos são transportados na forma de lipoproteínas complexas. As lipoproteínas plasmáticas: quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e proteínas de alta densidade (HDL), transportam os produtos de síntese endógena e os lipídios exógenos circulantes (GURR, 1986).

Os níveis elevados de triacilgliceróis plasmáticos estão associados ao aumento no risco de doenças cardio-vasculares (DCV), sendo sua concentração considerada como um biomarcador da doença, especialmente em indivíduos com taxas altas de LDL-C/HDL-C (MANNINEN *et al.*, 1991; WOLINSKY; HICKDON, 1996).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ANDERSEN, P.; SALTIN, B. Maximal perfusion of skeletal muscle in man. **Journal Physiology (Lond)**. 366: 233-249, 1985.
- BAHR, R.; SEJERSTED, OM. Effect of feeding and fasting on post exercise oxygen consumption. **Journal of Applied Physiology**, 71(6): 2088-2093, 1991.
- BENYON S. **Metabolism and Nutrition**, 1 ed., London, Mosby 244p., 1998.
- BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan **Life Extension Report**, Life Extension Foundation, Chicago, n.1, p. 21-28, 1996. Disponível em: www.lef.org/magazine/mag9/mag97_11.html
- CARTREE, G.D.; YOUNG, D.A.; SLEEPER, M.D.; ZIERATH, J.; WALLENBER-HENRIKSSON, H. AND HOLLOSZY, JO. Prolonged increase in insulin-stimulated glucose transport in muscle after exercise. **Am Journal Physiology Endocrinology Metabolic**. 256: E494-E499, 1989.
- CHAMPE P, C.; HARVEY, R. A **Bioquímica Ilustrada** 2^a edição, editora Artmed. Porto Alegre, 1996
- COLGAN M, Optimum Sports Nutrition, Your Competitive Edge. A Complete Nutritional Guide for Optimizing Athletic Performance. Advanced Research Prees N.Y. 1993.
- DAVIS, J.M.; BAILEY, SP. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. **Medicine Science Sport exercise**, 29(1): 45-47, 1997.
- DOHN G.L.; KASPEREK G.J.; TAPSCOTT E.B.; BARAKAT G.A., protein metabolism during endurance exercise **Federal Proceedings** Bethesda, vol.44, No. 2, p 348-52, 1985.
- FARFÁN, J.A; PACHECO, M.T.B. Amino acids. Properties and occurrence. Encyclopedia of food Sciences and Nutrition pp 181-192, 2003.
- FORYTHE W, "Plasma Thyroxine and Cholesterol Changes Over Time as Affected by Source," **FAESB** J.5.5 A947. 1991.
- GINGER M.R.; GRIGOR M.R. Comparative aspects of milk caseins, **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, 124,p. 133-145, 1999.
- GLADDEN L, B. Symposium: The role skeletal muscle in lactate exchange during exercise: introduction. **Medicine; Science in Sports; Exercise**. 753-755, 2000.

- GLADDEN, L.B. Muscle as a consumer of lactate. **Medicine; Science in Sports; Exercise.** 764-771, 2000.
- GOMES MR. TIRAPEQUI J., Relação entre fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e atividade física. **Revista Brasileira Atividade Física e Saúde,** 3:66-76, 1998.
- GOREHAM, C.; GREEN, H.J.; BURNETT, M.B.; RANNEY, D. High-resistance training and muscle metabolism during prolonged exercise. **American Journal of Physiology.** 276(39): E489-E496, 1999.
- GURR, M.I. **Rol of fats in food and nutrition.** 2. ed. New York: Elsevier Applied Science, p. 80-93, 1986.
- GUYTON, A. C. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças** 4 ed. Rio de Janeiro> Guanabara, 1989.
- 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.** 85:1218-1222, 1998.
- HAWLEY J.A.;Brouns F.; Jeukendrup A. Strategies to enhance fat utilization during exercise. **Sports Medicine** 25:241-257, 1998
- HOOD, D.A.; TEYUNG, R.L. Effect of α -ketoacid dehydrogenase phosphorylation on branched-chain metabolism in muscle. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v23 p.628-634, 1991.
- HORNE, D.S. Whey proteins. **Journal of the Society of Dairy Technology**, London, v.53, n1, p 3-4, 1990.
- IVY, J.L.; KUO, C-H. Regulation of Glut 4 protein and glycogen synthase during muscle glycogen synthesis after exercise. **Acta Physiol Scand.** 162: 295-304, 1998.
- JACOBUCCI, H.B. **Características nutricionais e efeito sobre lipídios sanguíneos e hepáticos das proteínas de lactosoro e caseinato de sódio, comparados à caseína e proteína de soja, comerciais,** Campinas 1999, 82p. Dissertação (Mestrado em ciência da nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de engenharia de Alimentos.
- JACOBUCCI H.B.;SGARBIERI V.C.;DIAS N.F.G.P.;BORGES P.;TANIKWA C., Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and protein and liver cholesterol **Nutrition Research** Campinas Brasil, 21: (6) 905-915 Jun, 2001.

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

JAYAPRAKASHA, H.M.; TIRUMALESHA, A. RAMACHANDRA, RAO. H.G. Whey protein concentrate and butter milk solids in the formulation of ready-to-use dried ice cream mix. In: **Proceeding of Indian Convention of Food Scientists and Technologists.** Mumbai, 7-21, 1997.

JEFFREY, F.M.; WOJTASZEWSKI, J.F.P.; GOODYEAR, L.J. Insulin and exercise decrease glycogen synthase kinase-3 activity by different mechanisms in rat skeletal muscle. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology** 274(35): 24896-24900, August, 1999.

JEUKENDRUP, A.E.; WAGENMAKERS, A.J.M.; STEGEN, J.H.C.H.; GIJISEN, A.P.; BROUNS, F., SARIS, W.H.M. Carbohydrate ingestion can completely suppress endogenous glucose production during exercise. **American Journal of Physiology**, 276(39): E672-E683, 1999.

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

KANESIRO, M.A.B.; OLIVEIRA, A.L.; VENEAIANO, L.R.P. Consumo de suplementos nutricionais por usuários de academias em Ribeirão Preto. In: Livro de programas e resumos do III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos , Campinas-Sp FEA- UNICAMP, p. 119-120, 1999.

KLIP, A.; VOLCHUK, A.; HE, L. AND TSAKIRIDIS, T. The glucose transporters of skeletal muscle. **Seminars in Cell ; Developmental Biology.** 7: 229-237, 1996.

LAFORGIA, J.; WITHERS, RT.; SHIPP, NJ.; GORE, CJ. Comparison of energy expenditure elevations after submaximal and running. **Journal of Applied Physiology**, 82(2): 661-666, 1997.

LEHNINGER, A.L. **Biochemistry:** The molecular basis of cell structure and function New York> Worth Publishers, Inc., 326, 598, 1970.

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

LEMON, P. W. R. Effect of exercise on protein requirements. **Journal of Sports Sciences**, 9: 53-70, 1991.

LEMON, P.W.R. Do athletes need more dietary protein and amino acids?, **International Journal Sport Nutrition**, 5: S39-S61. 1995.

- LEMON, P.W.R. Dietary protein requirements in athletes. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, New York, v. 8, p. 52, 1997.
- LINDER, M.C. Energy metabolism, intake and expenditure. **Nutritional Biochemistry and Metabolism with Clinical Applications**, 2^oed. Appleton and Lange p.277-300, 1991.
- MAHAN, L.K.; ARLIN, M.T. Lipídeos. MAHAN, L.K.; ARLIN, M.T. (Ed.). **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 8. ed. São Paulo: Roca. P. 40-51, 1995.
- MANNINEN, V.; TENKANEN, L.; KOSKIENE, P.; HUNTTUNEN, J.K.; MANTTARI, M.; HEINONEN, O.P.; FRICK, M.H. Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Health Study implications for treatment, **Circulation**.85,37, 1991.
- MARSHALL, K.R.; HARPER, W.J. Whey protein concentrates. **Bulletin of the International Diary Federation**, Philadelphia, n 233, p 21-32, 1988.
- MARTIN III, W.H.; KLEIN, S. Use of endogenous carbohydrate and fat as fuels during exercise. **Proceedings of the Nutrition society**, 57: 49-54. 1998.
- MAZEPKA, R.C.; CUEVAS, M. J.; COLLADO, P.S.; GALLEGOS, J.G. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in no exercised and exercised rats **Life Science**. 66 (2): 153-160. 2000.
- McARDLE, W. D.; KATCHA, F.I.; AND KATCH, V.I. Nutrition, and human performance, Lea ; Febiger, Philadelphia. **Exercise Physiology: Energy**, 123, 1991.
- McARDLE W.D.; KATCH FI.; KATCH V.L. Medida do consumo energético humano. In: **Fisiologia do exercício 4^a ed.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 134-145, 1998.
- McINTOSH, G.H.; ROYALE, P.J.; LEU, R.K.L.; REGESTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L.; KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey proteins as functional food ingredients. **Int. Diary Journal**, 8 425-434, 1998.
- McINTOSH G.H.; LE LEU R.K., The influence of dietary on colon cancer risk, **Nutrition Research Australia**, Vol.21, Issue:7 July, 1053-1066p, 2001.
- MEREDITH, J.W.; DITESHEIM, J.Á.; ZALOGA, G.P. Viseral protein levels in trauma patients are greater with peptide diet than intact protein diet. **The Journal of Trauma**, 30(7): 825-829, 1990.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper's Biochemistry**, 2ed. Stamford. Appleton ; Lange. 1996.

PILEGAARD H.; DOMINO K.; NOLAND T.; HELLSTEN Y.; HALESTRAP AP.; BANGSBO J. Effect of high-intensity exercise training on lactato/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, Bristol, 276(39): E255-E261, 1999

PUNIDADAS P.; RIZVI S.S.H., Separation of milk proteins into fractions rich in casein or whey proteins by cross flow filtration, **Food Research International** Great Britain vol. 31, No. 4 265-272pp., 1999.

RAMOS, A.G. Utilização das proteínas do soro lácteo por ratos jovens. Campinas, 2001. 83p Dissertação (Mestrado em ciências da nutrição)- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

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

ROY, B.D.; TARNOPOLSKY, M.A.; MACDOUGALL, J.D.; FOWLES, J.; YARASHESKI KE. Effect of glucose supplement timing on protein metabolism after resistance training. **Journal of Applied Physiology**, 82(6): 1882-1888, 1997.

SCHULTZ, S. G. Handbook of Physiology. Section 6: Gastrointestinal System. Vol IV. Intestinal Absorption and Secretion. **American Physiology Society**, 1996.

SGARBieri V.C. **Proteínas em alimentos protéicos:** Propriedades nutricionais das proteínas. São Paulo, SP. Ed. Livraria Varela, 1996.

SGARBieri, V. C. ; PACHECO, M. T. B. Revisão Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2(1.2): 7-19, 1999.

SMOLKA, B.M. **Exercício físico e expressão da proteína de estresse HSP72 em músculos de rato submetidos à diferentes tipos de treinamento.** Campinas, 1999. 75p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

TASSI, E.M.M. **Desenvolvimento de dietas para o desempenho físico. Comparação de oligopeptideos de α-lactoalbumina com a proteína intacta como fonte protéico-energética no rato.** Campinas, 1996 79p. Dissertação (Mestrado em ciência da nutrição) - UNICAMP, FEA.

TASSI, E M. M.. AMAYA-FARFAN, J. AZEVEDO R. Hydrolyzed α-lactalbumin as a source of protein to the exercising. **Nutrition Reseach**, 18(3): 875-881, 1998.

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

- THOMAS, L.M.; HOLUB, B.J. Nutritional aspects of fats and oils. In: KAMEL, BS.; KAKUDA, Y. (Eds.). **Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids**. 1 ed., England: Blackie Academic ; Professional, p. 16-19. 1994.
- TIPTON, K.D.; FERRANDO, A.A.; PHILLIPS, SM. JR.; DOYLE, D.; WOLFE, R.R. Post exercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. **American Journal of Physiology**, 276(39): E628-E634, 1999.
- VAN HALL, G.; SHIRREFFS, SM.; AND CALBET, J.A.L.. Muscle glycogen resynthesis during recovery from cycle exercise: no effect of additional protein. **Journal of Applied Physiology**, 88: 1631-1636, 2000.
- VILLAR-PALASI, C.; LARNER J: Insulin-mediated effect on the activity of UDPG-glycogen transglusylase of muscle. **Biochemistry Biophysical ACTA**. 39:171-173, 1960.
- WHITLEY, H.A.; HUMPHREYS, S.M.; CAMPBELL, I.T.; KEEGAN, M.A.; JAYANETTI, T.D.; SPERRY, D.A.; MacLAREN, D.P.; REILLY, T; FRAY, K.N. Metabolic and performance responses during endurance exercise after high-fat and high-carbohydrate meals. **Journal of Applied Physiology**, 85(2): p.418-424, 1998.
- WOJTASZEWSKY, J.F.P.; HASEN, B.F.; GADE, J.; KIENS, B.; MARKUS, J.F.; GOODYEAR, L.J.; RICHTER, E.A. Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle. **Diabetes**. V. 49 (3). P. 325-331. March 2000.
- WOLINSKY, I.; HICKDON, JF.JR.. **Nutrição no exercício e no Esporte** 2^oed.editora Roca São Paulo, Brasil, 1996.
- WONG, D.W.S; CAMIRANT, W.M.; PAVLATH, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Orlando, v38, n.8, p.807-844, 1996.
- YAMAMOTO T., Soy Protein and Its Hydrolysate Reduce Body fat of Dietary Obese Rats: Second International Symposium on The Role of Soy in Preventing and Treating **Chronic Disease**, Brussels, Belgium, 55-56p, 1996
- YOUNG, V. R. Metabolic and nutritional aspects of physical exercise. **Federation Proceedings**, Bethesda, 44(2): 341-342, 1985.

*Referências seguindo as normas da NBR 6023/2002.

EFEITO DA ALIMENTAÇÃO SUB-CRÔNICA DO HIDROLISADO DAS PROTEÍNAS DO LACTOSSORO EM RATOS SEDENTÁRIOS E EXERCITADOS

RESUMO

Os hidrolisados protéicos são usados em formulações de produtos especiais, tais como alimentos para fins clínicos e esportistas, devido à peculiaridade de serem rapidamente absorvidos pelo intestino em comparação às proteínas intactas. Tendo em vista o papel energético da proteína no exercício prolongado, várias pesquisas sobre exercício e metabolismo protéico têm sido realizadas na tentativa de elucidar a dosagem correta de proteínas em dietas para esportistas em função do exercício. Várias dietas propostas incluem em sua formulação proteína na forma de proteolissados; como a α -lactalbumina hidrolisada. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as possíveis consequências metabólicas do consumo sub-crônico do isolado de soro de leite (ISL) e seu proteolizado (HSL) de grau de hidrólise 7,8%, como única fonte protéica, em ratos submetidos ao exercício físico. Para o ensaio biológico foram utilizados 60 ratos machos Wistar, recém-desmamados, alimentados por 35 dias com ISL (30 ratos) e HSL (30 ratos) e submetidos a atividade física. As dietas foram elaboradas conforme AIN-93. De acordo com o nível de atividade os animais foram divididos em três pares de grupos: Treinados (**HT/IT**), treinados e exercitados até a exaustão (**HE/IE**) e sedentários (**HS/IS**). Os ratos ao atingirem aproximadamente 100 g. de peso foram submetidos a um período de 8 dias para adaptação ao treinamento, logo após este período, receberam um treinamento contínuo por 14 dias, com exceção dos sedentários (grupo controle). Foram determinados: evoluções ponderais, tempo de exaustão, lactato sanguíneo, glicogênio hepático (GH), glicogênio muscular (GM), glicogênio do miocárdio (GC), glicose sérica, insulina sérica, ácidos graxos livres (AGL), colesterol e triacilgliceróis séricos (TGL). Observou-se que o ponto de exaustão do grupo tratado com isolado de soro de leite (ISL) foi alcançado muito antes que os alimentados com o hidrolisado de soro de leite (HSL), (60 ± 13 min e 156 ± 18 min, respectivamente). Nos níveis de lactato

sangüíneo foi encontrada diferença significativa nas diferentes categorias. Para os níveis de GH foi encontrada diferença significativa para quase todas as categorias, mostrando que nos grupos alimentados com HSL as reservas foram maiores, enquanto que os níveis de GM e de AGL não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Os níveis de GC nos grupos **HE/IE** apresentaram diferenças significativas quando comparadas aos sedentários. A concentração sérica de glicose e de colesterol não apresentaram diferenças significativas, enquanto que os de TGL apresentaram diferenças significativas quase em todos os grupos. De acordo com os resultados obtidos conclui-se que a dieta com hidrolisado de soro de leite de grau de hidrólise médio promoveu um melhor desempenho físico em animais treinados, como foi evidenciado pelo teste de exaustão.

Palavras chaves: Atividade física, hidrolisado, isolado protéico, soro de leite, proteína.

EFFECT OF SUB-CHRONIC FEEDING OF MILK WHEY PROTEIN HYDROLYZATE ON SEDENTARY AND EXERCISED RATS

SUMMARY

The protein hydrolysates are used in the formulation of special products such as foods for clinical and sports purposes, due to their peculiarity of being quickly absorbed by the intestine in comparison with other proteins, including the milk caseins. In view of the energy value of proteins in exhaustive exercise, several studies on exercise and protein metabolism have been carried out in the attempt to elucidate the proper amount of protein that must be consumed by sportsmen. Some diet proposals include in its formulation protein in the form of protein hydrolyzates such as α -lactalbumin and milk-whey protein hydrolyzates. The present work had the objective of evaluating the possible metabolic consequences of the sub-chronic consumption of milk-whey protein isolate and its enzymatic hydrolyzate, with medium degree of hydrolysis, as the only protein source, for rats submitted to physical exercise in the treadmill. For the biological assay 60 male Wistar weaning rats were fed during 35 days, diets containing either whey protein isolate (30 rats) or the hydrolyzate (30 rats) of milk whey protein, as the only power source. In accordance with the activity level, the animals were divided in to three groups: Trained (**HT/IT**), trained and taken to exhausts (**HE/IE**) and sedentary (**HS/IS**). Once the rats reached 100g, the non-sedentary cohorts were submitted to a period of adaptation to the treadmill for eight days. Training was daily for a period of 14 days. Body weight accretion, time of exhaustion, lactate, hepatic glycogen (GH), muscular glycogen (GM), glycogen of the myocardium (GC) and glucose, insulin free, fatty acids, cholesterol and triacylglycerols in blood serum were determined. It was observed that the point of exhaustion in the group consuming the whey protein isolate (ISL) was reached long before the group fed the whey protein hydrolyzate (HSL) (60 ± 13 min vs. 156 ± 18 min). For the lactate levels in blood, significant

difference ($p<0,05$) was found between the different categories indicating that, at 24h after exhaustion, the hydrolyzed protein of the diet was responsible for the faster recovery of the basal blood lactate. For the GH levels significant differences for almost all the categories were found, showing that the groups fed the HSL exhibited greater GH concentrations than did their cohorts, GM did not present significant differences between the pairs of groups and the same was observed with regard to the concentration of fatty acids. The GC showed that the **HE/IE** groups had significant differences when compared to the sedentary groups. The cholesterol and glucose parameters did not present significant differences between any two groups, whereas the TGL levels presented significant differences for almost all of the groups. The results suggest that the hydrolyzed protein was considerably more efficient than the whole protein in promoting better physical performance and conservation of the biochemical parameters.

* **HSL** = milk-whey protein hydrolysate, **ISL**= milk-whey protein isolate

Keywords: physical activity, protein hydrolysate, isolate, whey protein.

1. INTRODUÇÃO

Cerca do 20% das proteínas originais do leite estão presentes no soro e seu hidrolisado enzimático, sendo que seu valor econômico foi reconhecido pela indústria, principalmente pelas propriedades funcionais tecnológicas, como a solubilidade em água, viscosidade, "water-binding" (ligação de água), "whipping ability" (capacidade de formar espuma), emulsificação e geleificação. Além disso, estas proteínas conferem aos alimentos propriedades físicas importantes, como textura e estrutura, além de seus efeitos profiláticos e terapêuticos, como o favorecimento da função digestiva e possivelmente a sua ação moduladora da capacidade imunológica (McIntosh *et al.*, 1998; Jayaprakasha *et al.*, 1999). Um recente alvo de interesse para o uso das proteínas do soro (JAYAPRAKASHA *et al.*, 1997).

Os hidrolisados protéicos são amplamente usados: na administração de cuidados nutricionais para indivíduos que não podem digerir proteína intacta, na alimentação de crianças com hipersensibilidade ao alimento (Silvestre, 1997), na nutrição clínica, em pessoas que sofrem de doenças como HIV/AIDS, doença de Crohn, diarréias crônicas e estados críticos de saúde. Devido à peculiaridade de serem rapidamente absorvidas pelo intestino, em comparação com outras proteínas, inclusive a caseína do leite, os hidrolisados têm sido utilizados na fabricação de fórmulas infantis, na nutrição enteral, em produtos medicinais, nutrição de esportistas entre outros (FROKJAER, 1994; TASSI *et al.*, 1998; JAYAPRAKASHA *et al.*, 1999).

O hidrolisado protéico de soro de leite vem sendo utilizado em grande escala na produção de alimentos para esportistas, principalmente devido a sua rápida absorção. O efeito do exercício físico nos requerimentos protéicos tem sido um tópico controverso durante muitos anos. Uma quantidade considerável de evidencia experimental indica que o exercício regular incrementa as necessidades de proteína (LEMON, 1991).

Dependendo da duração e intensidade do exercício, existem diferentes mudanças metabólicas. Assim, exercícios prolongados utilizam reservas de carboidratos, lipídios e uma pequena parte das proteínas, enquanto que

exercícios de curta duração consomem as reservas limitadas de creatinina fosfato e adenosina fosfato. Tem sido relatado que as proteínas contribuem entre 10 e 15% do total de gasto energético em exercícios de longa duração (TASSI *et al.*, 1998).

O músculo esquelético tem a habilidade de se adaptar às mudanças induzidas pelo treinamento físico. É sabido também, que a síntese de proteínas é aumentada durante a fase de recuperação de exercícios prolongados (Phillips *et al.*, 1999; Pilegaard *et al.*, 1999; Pimenta, 2003). De acordo com Phillips *et al.* (1999) o retorno aos níveis de repouso, após atividade física ocorre em 36h.

A ingestão relativamente de proteína muitas vezes é considerada benéfica pelos atletas, para exercício vigoroso. Além disso, a ingestão de proteínas aumenta a velocidade de gliconeogênese durante a fase prandial do metabolismo, e estimula a secreção de insulina resultando num aumento acelerado da concentração de aminoácidos plasmáticos (FORSLUND *et al.*, 1999; VAN LOON *et al.*, 2000a).

Tendo em vista o papel energético da proteína em exercício prolongado, várias pesquisas sobre exercício físico e metabolismo protéico têm sido realizadas na tentativa de elucidar qual é a quantidade de proteína que deve ser consumida pelo esportista (Bruke, 1993; Kreider *et al.*, 1993). Várias dietas incluem em sua formulação proteolisados; como a α -lactalbumina hidrolisada do soro do leite (TASSI, 1996).

Este estudo pretende avaliar se existe alguma diferença no metabolismo de ratos submetidos a exercício físico, comparado com os sedentários, tendo todos uma alimentação onde a única fonte protéica é o hidrolisado e concentrado do soro do leite.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar as possíveis consequências metabólicas do consumo sub-crônico (período de 30 dias de alimentação) do Isolado de soro do leite e seu proteolisado, de grau de hidrólise médio, como única fonte protéica, por ratos submetidos ao exercício físico.

2.2. Objetivos Específicos:

- Determinar a influência fisiológica de ambas dietas nos ratos treinados e não treinados.
- Comparar as respostas bioquímicas das duas dietas ministradas sub-crônicamente a ratos sedentários e ratos exercitados em esteira. Dieta "**ISL**", preparada com isolado do soro do leite, e dieta "**HSL**", preparada com o ISL-Hidrolisado enzimaticamente.
- Utilizar alguns dos parâmetros bioquímicos para avaliação do desempenho, tais como:
 - ❖ Glicogênio hepático
 - ❖ Glicogênio muscular - Gastrocnêmio
 - Coração

Parâmetros séricos

- ❖ Lactato
- ❖ Glicose
- ❖ Insulina
- ❖ Ác. Graxos
- ❖ Triacilgliceróis
- ❖ Colesterol

3. MATERIAL E MÉTODOS

1. Dietas experimentais
2. Composição das dietas
3. Balanço nitrogenado
4. Analise das proteínas
5. Ensaio biológico
6. Controle da evolução ponderal e ingestão alimentar
7. Protocolo de treinamento
 - i. Características do treinamento físico
 - ii. Teste de exaustão
8. Métodos e parâmetros bioquímicos

3.1. DIETAS EXPERIMENTAIS

Os ratos foram alimentados primeiramente com dieta comercial (Nutival) até atingir peso em torno de 100g. Sendo oferecida posteriormente a dieta experimental elaborada de acordo com a formulação preconizada pelo **American Institute of Nutrition** (REEVES *et al.*, 1993) para dieta AIN-93G, com modificação no conteúdo de proteína bruta para 12% (Pellet, 1980). A fonte protéica utilizada para o ensaio foi isolado de soro de leite de vaca (ALACEN™ 895) e seu hidrolisado enzimático (ALATAL 817), ambos da NZMP™ (Wellington, N.Z.).

ALACEN™895. Proteína Isolada de soro de leite produzida por troca iônica e ultrafiltração, e em consequência disso, possui baixos teores de lactose e gordura, é uma proteína solúvel e não desnatada que fornece benefícios nutricionais, bem como melhorar as propriedades funcionais e de sabor.

ALATAL™817 Proteína hidrolisada de alta qualidade produzida através de um tratamento enzimático controlado do concentrado protéico de soro de leite para produzir aminoácidos, peptídeos e polipeptídeos. A proteína de soro de leite utilizada com base para este processo é de alto valor nutricional, e

uma vez que o tratamento enzimático é um processo sensível e cuidadosamente monitorado, os aminoácidos essenciais permanecem intactos e a proteína mantém o seu alto valor nutricional. Este hidrolisado tem boas propriedades emulsificantes, além de proporcionar uma ampla gama de peptídeos e oligopeptídeos.

Foram determinados, pelo método de Kjeldhal (Horwitz, 1975), os teores de proteína bruta tanto para o isolado ALACEN™ 895, como para seu hidrolisado enzimático ALATAL 817. Posteriormente As dietas foram elaboradas de forma a serem isoprotéicas (12%), isoenergéticas e isolipídicas.

Foi registrado o consumo individual da dieta durante a primeira fase do experimento. Já que durante a segunda fase no foi possível fazer um monitoramento, devido ao uso de gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola); este arranjo atendeu às condições de infra-estrutura da fase de treinamento.

3.2. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS

A composição das dietas experimentais (**Tabela 1**), mistura de minerais (**Tabela 2**) e de vitaminas (**Tabela 3**) foram mostradas a continuação.

Tabela 1.- Composição das dietas (g/Kg de dieta) que foi utilizada para a realização do experimento (35 dias), segundo a AIN-93G.

Ingredientes	Dieta com isolado (g)	Dieta com hidrolisado (g)
Amido de milho	475,24	475,24
Amido dextrinizado	151,57	151,57
Hidrolisado protéico	139,68	xxxxxx
Isolado protéico	xxxxxx	130,26
Sacarose	97,89	97,89
Fibra	48,89	48,89
Óleo vegetal	39,82	39,82
Mistura mineral	34,16	34,16
Mistura vitamínica	9,95	9,95
Bitartarato de colina	2,44	2,44
Ter-butilhidroquiona	0,0078	0,0078

Tabela 2.- Composição da mistura mineral (g/Kg mistura) utilizada para a realização do experimento (35 dias), segundo a AIN-93G.

Ingredientes	Quantidade (g)
Carbonato de cálcio, anidro 40.04%	357,00
Fosfato de potássio, monobásico, 22.76% P; 28.73% K	250,00
Sacarose em pó	209,806
Cloreto de sódio, 39.34% Na; 60.66% Cl	74,00
Sulfato de potássio, 44.87% P; 18.39% S	46,00
Citrato de potássio, tri-potássio, monoidratado, 36.16% K	28,00
Óxido de magnésio, 60.32% Mg	24,00
Citrato férrico, 16.5% Fé	6,06
Carbonato de zinco, 52.14% Zn	1,65
Metasilicato de sódio, nonaidratado, 9.88% Si	1,45
Carbonato de manganês, 47.79% Mn	0,63
Carbonato cúprico, 57.47% Cu	0,30
Sulfato de potássio e crômio dodecaídratado, 10.42% Cr	0,275
Ácido bórico, 17.5% B	0,0815
Sodium fluoride, 45.24% F	0,0635
Carbonato de níquel, 45% Ni	0,0318
Cloreto de lítio, 16.38% Li	0,0174
Selenito de sódio, anidro, 30.03% Se	0,01025
Iodeto de potássio, 59.3% I	0,01
Paramolibdato de amônia, tetraídratado, 54.34% Mo	0,00795
Vamndato de amônia, 43.55%	0,0066

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

Vitaminas (g).	Quantidade
Ácido Nicotínico	3,000
Pantotenato de Cálcio	1,600
D-biotina (2% em CaCo ₃)	1,000
Riboflavina (a 80%)	0,750
Piridoxina-HCL	0,700
Tiamina-(1 Nitrato)	0,645
Ácido Fólico	0,200
Vitamina E (α -tocoferol) (500 UI/g)	15,000
Vitamina A (all-trans-retinil palmitato) (500.000 UI/g)	0,800
Vitamina B-12 (cianocobalamina) (a 1% em maltodextrina)	0,250
Vitamina D3 (colecalciferol) (500.000 UI/g)	0,200
Vitamina K (filoquinona)	0,075
Açúcar refinado (ou dextrina)	975,780

3.3. BALANÇO NITROGENADO

Com a finalidade de determinar o balanço nitrogenado, foi monitorada a quantidade de nitrogênio ingerido, através do controle do consumo de dieta, fezes e urina. Estas foram coletados durante 4 dias, calculando-se o nitrogênio excretado, a partir do 4 dia após iniciada a dieta experimental.

A determinação do teor protéico através da obtenção do nitrogênio das dietas e fezes foi feita pelo método semi-micro Kjeldahl (Horwitz, 1975) utilizando o fator de conversão 6,38 para proteína da dieta (FAO, 1970). O controle da ingestão foi feito só durante o período em que os animais estiveram nas gaiolas individuais, através da pesagem dos comedouros em dias alterados.

3.4. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS

3.4.1. O perfil de aminoácidos das duas fontes protéicas utilizadas nas dietas de experimentação

Para esta determinação foi pesado aproximadamente 32mg das amostras (neste caso o isolado e hidrolisado de soro de leite), submetidas a uma hidrólise ácida com solução de HCl 6N, numa ampola a qual foi fechada com maçarico e colocadas na estufa a 110°C, por um período de 22horas. Após este tempo as ampolas foram retiradas da estufa, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente, e a seguir foram extraídas das ampolas por filtração. Deste material 100 μ l foram para o dessecador ligado a uma bomba de vácuo até a secagem total (3 a 6 horas). Logo após a secagem, o conteúdo foi diluído em 300 μ l do diluente citrato de sódio pH2,2. As amostras foram congeladas até serem injetadas no analisador de aminoácidos.

A composição qualitativa e quantitativa dos aminoácidos foi realizada no cromatógrafo Thermo-Separation Products (Riveira Beachh, Fla, U.S.A.) com coluna de troca iônica de resina poliestirênica sulfonada e detecção pós-coluna com ninidrina (Pickering, Mountain View, U.S.A; método de Spackman *et al.*, 1958). Coluna específica para aminoácidos, # 1193250, 3mm X 250mm, 8 μ cation-exchange. O comprimento de onda utilizado para a leitura foi de 570nm e 440nm, este último exclusivamente para a prolina.

3.4.2. Análise do grau de hidrólise da proteína parcialmente hidrolisada utilizada na dieta experimental

Para a determinação do grau de hidrólise foi utilizado o método TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico), o qual determina a concentração de grupos aminos primários (Adler-Niseen, 1979). Método que consiste em um ensaio espectrofotométrico que forma um cromóforo pela reação do TNBS com as aminas primarias (ANEXO 1).

3.5. ENSAIO BIOLÓGICO

Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem Wistar SPF, recém-desmamados (21 dias, 57g \pm 5g) procedentes do Centro de Bioterismo (CEMIB, UNICAMP). Os animais foram separados em dois grupos, cada um de 30 ratos, para sua melhor manipulação e conforto, segundo o "Guiding Principles for the Use and Care of Animals". Portanto os ratos foram mantidos na temperatura de 22 \pm 2° C e umidade de 50-60%, com o ciclo de luz invertido de 12 horas, em gaiolas individuais para seu crescimento.

Os animais foram alimentados com dieta comercial (Nuvital para roedores, Curitiba, Brasil) e água à vontade, até atingir um peso em torno de 100g. No final deste período, os ratos foram submetidos a um período de 35 dias de ensaio, sendo a primeira semana de adaptação à dieta experimental AIN 93-G modificada. Nesse período, os animais permaneceram no Laboratório de Ensaios Biológicos (LEB) do DEPAN. Findo esse período, eles foram transferidos para o Laboratório de Bioquímica do Exercício (Instituto de Biologia, UNICAMP), onde foram acondicionados cinco ratos por gaiola, para serem submetidos à atividade física numa esteira, enquanto receberam a mesma dieta e disponibilidade de água. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia de UNICAMP com o protocolo para uso de animais # 247-1.

3.6. CONTROLE DA EVOLUÇÃO PONDERAL E INGESTÃO ALIMENTAR

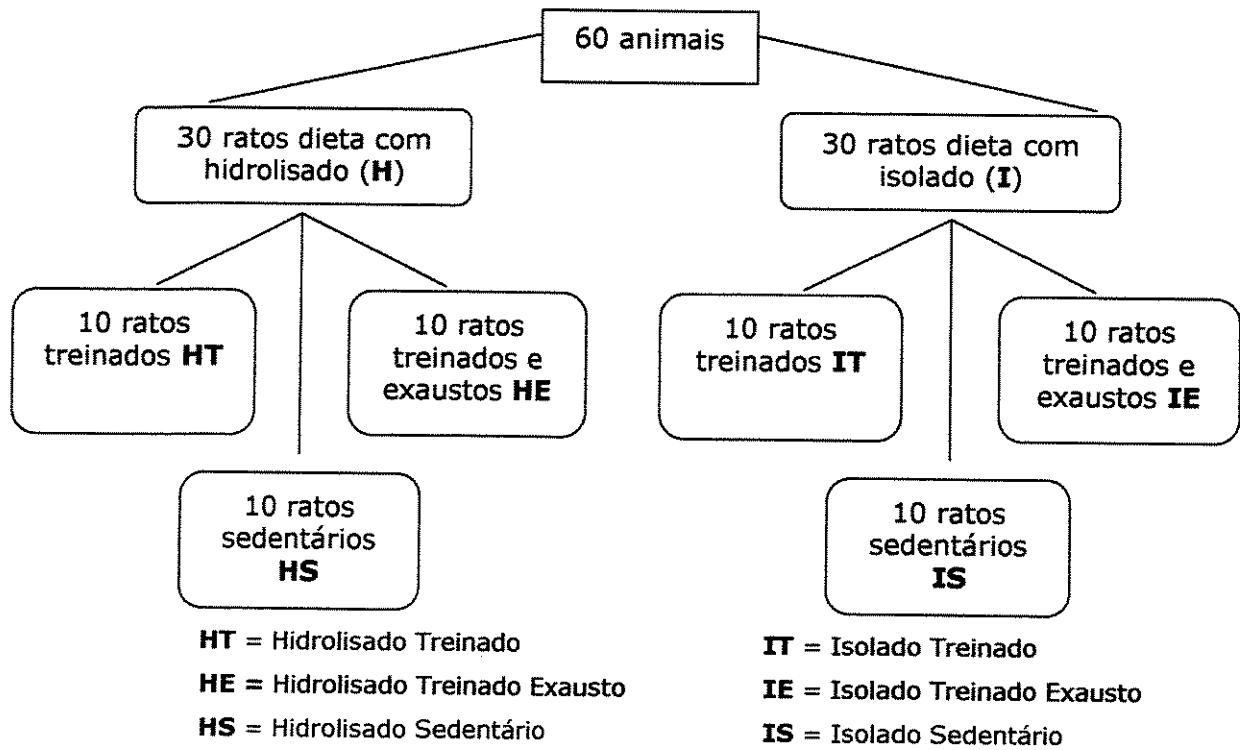
Durante a primeira etapa (período de administração da dieta comercial) os ratos foram pesados cada sete dias em uma balança eletrônica. Após o início com a dieta experimental os animais foram pesados cada dois dias, para o seguimento minucioso do ganho de peso nesta fase. Durante o período de

treinamento os animais foram pesados cada sete dias incluindo no dia do sacrifício.

Foi determinado o balanço de nitrogênio da dieta, determinando a quantidade de nitrogênio ingerido, através do controle do consumo da dieta (feito por diferença de peso dos comedouros), fezes e urina. As duas últimas foram coletadas durante 4 dias, calculando-se o nitrogênio excretado, a partir do 4º dia após iniciada a dieta experimental. O balanço de nitrogênio foi feito na segunda semana do experimento, primeira da dieta experimental, foi determinado pelo o método de Kjeldahl (Horwitz, 1975) utilizando 6,38 como fator de conversão para proteína da dieta (FAO, 1970), este controle só foi realizado na etapa que os animais estiveram nas gaiolas individuais.

3.6.1. Divisão dos animais

Após uma semana da ingestão das dietas experimentais (hidrolisado (**H**) e isolado (**I**) de soro de leite) os ratos foram submetidos a um teste de aptidão física por 5 min. a uma velocidade de 10m/min, para separar-los em treinados e sedentários. Os animais foram separados em 6 grupos, dos quais 3 grupos receberam dieta com **HSL** e 3 dieta com **ISL**, dos 6 grupos formados 4 foram submetidos a atividade física, objetivando a comparação das características biológicas oferecidas pelas duas fontes protéicas. Os 2 grupos restantes (sedentários) foram utilizados como controle. Divisão mostrada no **fluxograma 1**.



Fluxograma 1 Divisão dos animais por tipo de dieta e atividade física .

3.7. PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Definidos os grupos em treinados e sedentários (**fluxograma 1**), os animais escolhidos para treinamento e treinamento exaustivo (quatro grupos de 10 animais cada), foram submetidos a exercício físico por um período de adaptação de 8 dias. Após esta fase, os animais iniciaram um período de treinamento físico de 14 dias, totalizando um período de 22 dias. O protocolo de treinamento utilizado é mostrado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Protocolo de treinamento utilizado nos grupos Isolado-Treinado (**IT**), Hidrolisado-Treinado (**HT**), Isolado-Treinado-Exausto (**IE**) e Hidrolisado-Treinado-Exausto, (10 ratos por grupo), durante 22 dias seguidos sem intervalos entre os tempos de corrida.

Semanas	Nº de dias	Temp. inicial (min)	Veloc. inicial (m/min)	Temp. final (min)	Veloc. Final (m/min)	Temp. total (min)
1	2*	10	5	10	10	20
1 e 2	6*	10	5	30	10	40
2	2	30	10	10	15	40
2	5	10	10	30	15	40
3	2	40	15	5	20	45
3	5	40	20	10	25	50

*Período de tempo de adaptação ao exercício.

No final do treinamento, dois grupos foram submetidos à exaustão (**IE** e **HE**), eles correram no um início a uma velocidade de 25m/min até atingir 32,5m/min. A exaustão de cada rato foi devidamente registrada a seu devido tempo, considerando a exaustão como o momento em que o animal não consiga sair do choque constante.

3.7.1. Características do treinamento físico

O treinamento dos animais foi realizado em uma esteira rolante durante todas a manhãs, de segunda a segunda feira, entre as 8:30 e 13:30 horas. Divididos em 6 grupos de 10 ratos cada, 4 grupos (**HT**, **HE**, **IT** e **IE**) dos 6 foram submetidos a exercício físico nestas condições, o resto dos animais (2 grupos **HS** e **IS**) ficaram em suas gaiolas, animais que foram o controle do experimento.

Como é indicado na **Tabela 4**. Os animais foram adaptados ao exercício, para depois realizar o treinamento físico o qual foi aumentando gradualmente

até chegar a um tempo de 50 minutos sendo os 40 primeiros a uma velocidade de 20m/min e os 10 min restantes a uma velocidade de 25m/min.

Os ratos foram constantemente monitorados durante toda a fase de treinamento, já que na base da esteira o choque elétrico estava ligado constantemente, choque que estimulava aos animais a correr. Este monitoramento foi necessário para evitar que os ratos menos adaptados permanecessem em choque constante, no caso que eles ficasse na base da esteira por muito tempo, eles eram estimulados a retomar o ritmo adequado de treinamento.

3.7.2. Teste de exaustão

Para realizar este teste grupos de 5 animais foram escolhidos aleatoriamente das categorias (**IE**) e (**HE**), foram levados para a esteira e submetidos à atividade exaustiva. Quando os animais chegavam à exaustão foi medido imediatamente o lactato sanguíneo em amostras de sangue caudal. Estes animais foram sacrificados 48 horas depois de ter chegado à exaustão, foi extraído o sangue por punção cardíaca e retirados os diferentes tecidos necessários, para as demais determinações analíticas.

3.8. MÉTODOS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

3.8.1. Dosagem da concentração de lactato sanguíneo

- Lactímetro. Accusport (Böehringer Mannheim GmbH Biochemica, Alemanha) (FELL *et al.*, 1998).
- Fita para medição de lactato BM-Lactate (Roche Diagnostics, GmbH Mannheim, Germany)
- Tubos capilares.
- Sangue caudal de cada animal.

Para realizar a medição do lactato sanguíneo foi cortada a ponta da cauda do animal, imediatamente o sangue foi coletado no tubo capilar e depositado

sobre a fita, a qual se introduz no lactímetro, onde foi realizada a leitura da concentração de lactato. Esta medição no caso dos animais sedentários e treinados sem exaustão foram feitos um pouco antes de seu sacrifício e no caso dos ratos submetidos ao treinamento exaustivo foi feita logo após da última sessão de treinamento, objetivando-se a comparação entre a obtenção do lactato em repouso e logo após exaustão.

3.8.2. Coleta do Sangue

A coleta do sangue foi feita por punção cardíaca, imediatamente depois que o animal ficou anestesiado por inalação com hidrato de cloral (10%), o sangue coletado foi colocado em tubos sem anticoagulante e refrigerados em gelo. A seguir foram centrifugados a 3000rpm (765 G) por 10-20min, em uma centrifuga laborzentrifugen 2k15 refrigerada (Sigma) à temperatura de 5°C, o plasma obtido foi imediatamente congelado em N₂ líquido a -195°C. Vale aclarar que o tempo para que o sangue fosse centrifugado foi inferior a 1 hora do momento da coleta.

3.8.3. Coleta dos órgãos

Foram coletados os seguintes órgãos:

Fígado
Coração
Músculo Gastrocnêmio

Após a coleta do sangue, se procedeu à extração dos diferentes órgãos, uma vez extraídos, eles foram imediatamente colocados em nitrogênio líquido para seu congelamento e logo foram envolvidos em papel alumínio e armazenados em de nitrogênio para sua análise posterior.

3.8.4. Determinação de glicogênio

Foi determinado o glicogênio dos diferentes órgãos:

➤ FÍGADO

- MUSCULO a) Gastrocnêmio
 b) Cardíaco

A determinação de glicogênio destes órgãos foi realizada com base no método empregado por Lo *et al.* (1970), sendo, porém substituído o uso do glicogênio por glicose, na solução glicogênio padrão (ANEXO2).

Para a determinação do *glicogênio hepático* foi padronizado o corte do lóbulo (lóbulo inferior) em todas as amostras e a mesma quantidade para minimizar os erros, a quantidade da amostra foi de 25mg aproximadamente, as amostras foram pesadas numa balança de torção de precisão "Roller-Smith" e transferidas com pinça tipo fórceps para um tubo com 0,5 mL de KOH a 30%, saturado com Na₂SO₄. Os tecidos foram imersos na solução e mantidos em banho de gelo até que todos os tubos fossem preenchidos.

Na determinação do *glicogênio muscular* e *glicogênio do miocárdio* se procedeu da mesma forma que para o glicogênio hepático, a única diferença sendo a quantidade de amostra. Para o tecido muscular foram separados aproximadamente 30mg e para o miocárdio aproximadamente 35mg.

3.8.5. Determinação da glicose sérica

A determinação de glicose foi feita utilizando o kit do Laborlab S/A produtos para laboratório (Guarulhos, SP), Glicose Stable, pelo método enzimático. A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda 500nm (HENRY, 1974). O procedimento de esta determinação está no ANEXO 3

3.8.6. Determinação de insulina

A determinação da insulina foi realizada pela técnica de radioimunoensaio (RIE), feita por o pessoal do Departamento de Fisiologia da Faculdade da Biologia da UNICAMP. O procedimento e os reativos utilizados estão no ANEXO 4.

3.8.7. Determinação de ácidos graxos

Foi utilizado um kit comercial fornecido pela Wako Chemicals, Gmhb (Neuss, Alemanha). O método consiste na determinação colorimétrica de ácidos graxos não esterificados no soro. Adicionando-se Acyl-CoA sintetase, ocorre uma acilação da coenzima A (Côa) e os ácidos graxos livres formando Acil-CoA. O Acil-CoA produzido então é oxidado na presença da Acil-CoA oxidase para produzir peróxido de hidrogênio no qual na presença de peroxidase permite a condensação oxidativa de 3-metil-Netil-N-(β -hidroxietil)-alanina com 4-aminoantipirina desenvolvendo uma coloração rosa que pode ser mensurada colorimetricamente à 550nm (DUNCOMBE, 1964; ELPHICK, 1968; DOLE; MEINERTZ, 1960).

3.8.8. Determinação dos triacilgliceróis

A determinação foi feita mediante a utilização de um kit do Laborlab S/A, produtos para laboratório (Guarulhos, SP), Kit-TRIGLICERÍDEOS GPO-PAP método colorimétrico enzimático liquid stable (Jacobs *et al.*, 1960). A leitura foi feita em espectrofotômetro em 505nm de comprimento de onda. O procedimento de esta determinação esta no ANEXO 5.

3.8.9. Determinação do colesterol

A determinação foi feita utilizando um Será determinado utilizando por um kit do Laborlab S/A, produtos para laboratório (Guarulhos, SP) Kit-COLESTEROL método enzimático, colesterol oxidase, colorimétrico e ponto final (Abell *et al.*, 1952). A leitura foi feita em espectrofotômetro em 505nm de comprimento de onda. O procedimento de esta determinação esta no ANEXO 6.

3.9. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram submetidos a análise estatística usando o programa STATISTICA® para ambiente Windows®, através da análise de variância (ANOVA) e análise das diferenças entre médias segundo o teste de Tukey, considerando $p<0,05$ como critério de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A duração total do ensaio foi de 35 dias. Tal período foi adotado como tempo mínimo para induzir as adaptações esperadas, com a obtenção dos resultados necessários para a realização do um segundo ensaio. Utilizou-se então somente àquela dieta capaz de proporcionar os melhores resultados de desempenho físico nos ratos, com o objetivo de avaliar o efeito da dieta na recuperação do animal exaurido.

Ramos (2001) realizou um estudo com proteína hidrolisada de soro de leite com grau de hidrólise alto (~30%). O autor observou efeitos positivos em relação a eficiência e síntese protéica, contudo ele afirmou que os resultados encontrados poderiam ser ainda melhores se fosse utilizada uma proteína com menor grau de hidrólise.

Neste ensaio foi utilizada proteína de soro de leite com grau de hidrólise médio (7,8%).

Balanço nitrogenado

As dietas elaboradas com isolado e hidrolisado de soro de leite apresentaram um balanço positivo, sendo de $19,25g \pm 1,56$ para a dieta com hidrolisado; e $10,98g \pm 2,43$ para a dieta com isolado. Esta diferença, significativa ($p < 0,05$) foi registrada no período em que os animais consumindo o isolado mostraram um queda temporária no crescimento (3^a e 4^a semanas). Não existe garantia de que as dietas continuem a mostrar tanta diferença na capacidade de promover o crescimento do animal com o passar do tempo. De fato, parece haver um processo adaptativo do animal entre a 4^a e a 5^a semana, levando a uma equiparação das duas dietas, a partir do final da 4^a semana.

Análise das proteínas

➤ Perfil de aminoácidos das protéicas utilizadas

Foi feita a composição de aminoácidos (perfil de aa), das duas fontes protéicas utilizadas, isolado e hidrolisado de soro de leite. Esta composição não apresentou nenhuma diferença significativa quanto ao fornecimento de aminoácidos entre as proteínas usadas no experimento. As variações foram consistentes com a premissa de que as fontes protéicas oferecidas foram diferentes apenas na forma estrutural, que diferiam apenas no tamanho molécula dos peptídeos em que se encontravam os aminoácidos, este perfil pode ser observado na **Figura.1**.

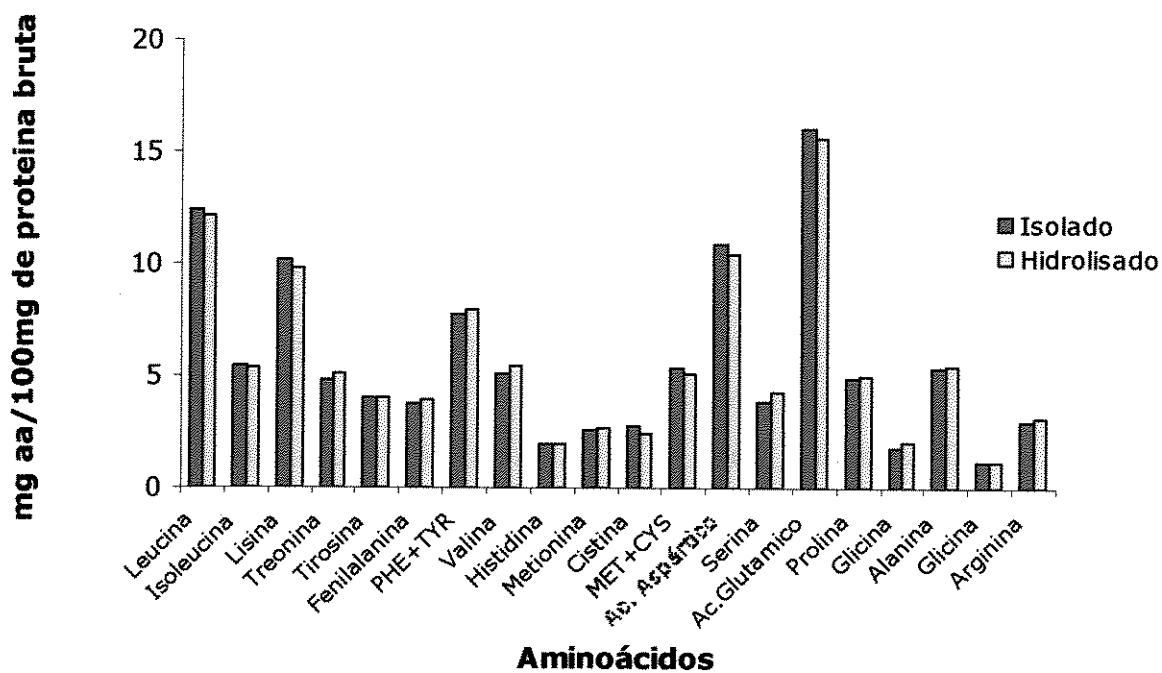


Figura 1 Perfil de aminoácidos das fontes protéicas (isolado e hidrolisado de soro de leite) utilizadas na dieta para os animais em estudo (ratos Wistar).

Na **Figura 2.** Podemos observar uma comparação dos perfis de aminoácidos essenciais das duas fontes protéicas utilizadas em relação ao perfil de aminoácidos essenciais preconizado e recomendado pela FAO (Food and Agriculture Organization). Este gráfico mostra que tanto o isolado como o hidrolisado de soro de leite são proteínas com alto valor biológico além de ter um excelente balanço de aminoácidos.

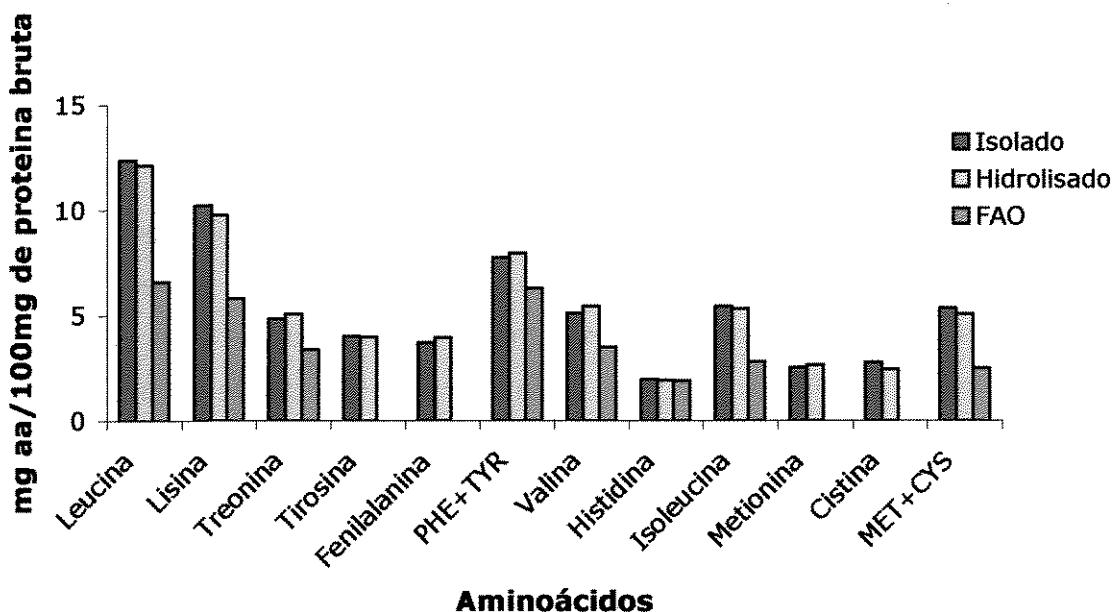


Figura 2. Perfil de aminoácidos essenciais recomendado pela FAO vs. as fontes protéicas (isolado e hidrolisado de soro de leite bovino), utilizadas no experimento com ratos submetidos a exercício físico.

➤ Analise do grau de hidrólise da proteína parcialmente hidrolisada utilizada na dieta experimental

Esta analise foi realizada pelo método de TNBS (Adler-Nisen, 1979) para verificar o grau de hidrólise da matéria-prima ALATAL™817. O valor dado pelo fabricante foi de 10,0% e o valor encontrado foi de 7,8%.

Foi observado por (Ramos, 2001) efeitos positivos em relação à eficiência e síntese protéica, nesse estudo o grau de hidrólise utilizado foi de aproximadamente 30%, apesar de ter encontrado estes efeitos, ele afirmou que os resultados encontrados poderiam ser ainda melhores se a proteína a ser utilizada tivesse um grau menor de hidrólise, já que o produto utilizado nesse estudo tinha elevadas concentrações de aminoácidos livres, o que pode retardar a velocidade de absorção dessa proteína. No presente estudo se observou que os grupos que foram alimentados com o hidrolisado de soro de leite (**HSL**) tiveram sempre melhor desempenho na esteira do que aqueles alimentados com isolado de soro de leite (**ISL**).

Ensaio biológico

O experimento teve no total uma duração de 35 dias. Tempo que foi considerado como o mínimo tempo para induzir as modificações esperadas, os resultados deste experimento nos levaram à realização de um segundo experimento, no qual foi utilizada só a dieta com hidrolisado de soro de leite, dieta que proporcionou melhores resultados no desempenho físico dos animais. No segundo ensaio foi avaliado o efeito da dieta na recuperação dos ratos exauridos.

Durante o início da fase de treinamento físico (fase de adaptação) os animais foram estimulados a correr com a ajuda de um choque elétrico localizado na base da esteira, os animais adaptaram-se de tal forma que foram poucos os animais que se encostavam ao choque, o qual permaneceu ligado tempo todo forçando aos ratos corressem durante todo o período de treinamento.

Evolução Ponderal

O ganho de peso não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$) entre os animais que foram alimentados com a dieta com isolado (**I**) e os

alimentados com hidrolisado (**H**) (grau de hidrólise médio) de soro de leite (**SL**), mas cabe aclarar que o desempenho dos ratos na esteira foi sempre melhor nos alimentados com hidrolisado. Mesmo não apresentando diferenças significativas, podemos dizer que os grupos **HS** e **HT** apresentaram uma pequena diferença em relação aos outros grupos. O grupo **HS** mostrou um incremento do peso a mais que os outros grupos, durante o período da primeira para segunda semana, para logo ter uma pequena queda da segunda para terceira semana, juntando-se assim às médias dos outros grupos, da mesma maneira observou-se que o grupo **HT** apresentou valores menores que o resto dos grupos, durante o período da terceira semana até o final do experimento, cabe aclarar que todos os grupos tiveram um crescimento normal, gradual e continuo como é observado na **Figura 3**.

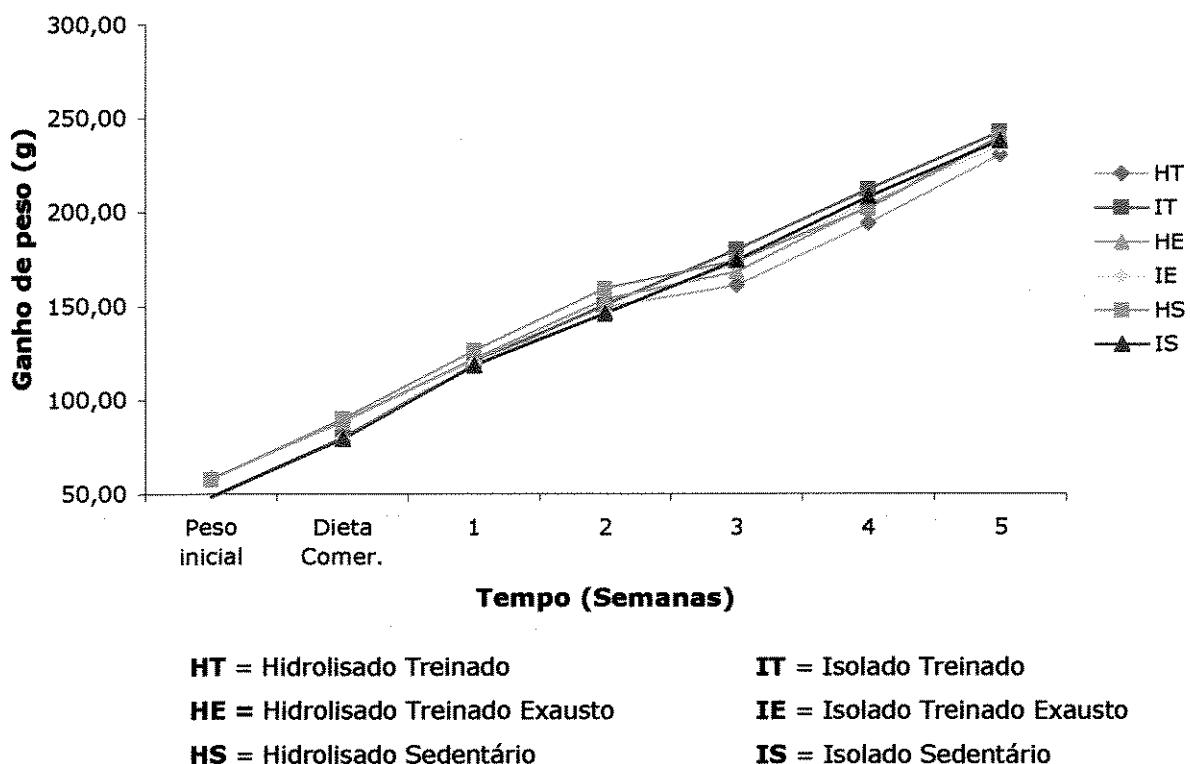


Figura 3.- Evolução ponderal de ratos Wistar alimentados com isolado e seu hidrolisado de soro de leite bovino durante 35 dias e submetidos a exercício físico.

O ANEXO 7 apresenta os gráficos da evolução ponderal dos ratos alimentados com isolado e hidrolisado de soro de leite, comparando o mesmo tipo de atividade física e as duas dietas utilizadas neste estudo. As médias e desvios-padrão dos pesos (g) dos animais são apresentados no ANEXO 8.

Protocolo de treinamento

Em primeiro lugar os animais foram divididos em sedentários e treinados, (2 grupos sedentários e 4 treinados), estes grupos foram separados pelas dietas utilizadas no experimento, obtendo assim três grupos com isolado e três com hidrolisado de soro de leite, após esta divisão os animais foram divididos de novo em **treinados (HT e IT)**, **treinados exaustos (HE e IE)** e **sedentários (HS e IS)** com 10 ratos por grupo. Os animais escolhidos para o treinamento tiveram 8 dias de adaptação ao exercício antes de começar com o treinamento físico (duas semanas), como foi descrito na **Tabela 4**.

Tempo de exaustão

Os grupos **HE** e **IE** foram levados a um treinamento exaustivo com o objetivo de comparar as dietas estudadas (isolado e hidrolisado de soro de leite) no desempenho físico dos animais. Os grupos **HT** e **IT** foram liberados do exercício exaustivo para permanecerem como controle.

Foi considerado como exaustão o momento no qual o animal não conseguia sair do choque constante, nesse instante registrou-se o tempo que o animal demorou em atingir sua exaustão. Este tempo foi significativamente maior para o grupo alimentado como hidrolisado de soro de leite (156 ± 18 min) do que para o grupo alimentado com isolado de soro de leite (60 ± 13 min), como se pode observar na **Figura 4**. Embora não tenha sido observado grande problema entre os grupos para se adaptar a atividade física, cabe aclarar que tanto durante a fase de adaptação e mesmo durante o treinamento físico, existiu alguns animais que mostraram certa dificuldade em se adaptar ao exercício, principalmente os animais que receberam a dieta com isolado de

soro de leite. Os animais que apresentaram alguma dificuldade foram acompanhados para evitar que eles ficassem no choque constante e assim ficam com estresse não desejado.

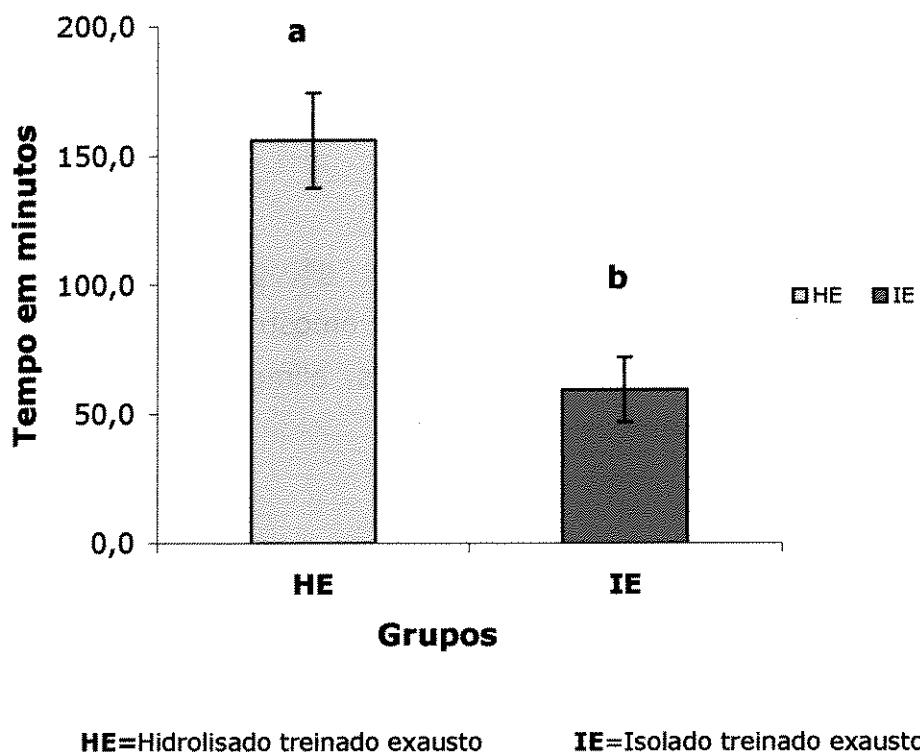


Figura 4. Tempos médios e desvios-padrão da exaustão de ratos (10 animais por grupo) alimentados com **ISL** e **HSL** e submetidos a exercício físico.

Na **Figura 4** podemos observar que os animais que receberam a dieta com hidrolisado teve o ponto de exaustão 2,6 vezes superior aos alimentados com isolado, resultado da ação conjunta da dieta e do exercício físico. Este achado não foi encontrado até a data presente na literatura.

Tassi (1996) realizou um estudo com ratos submetidos à natação e alimentados com dietas contendo α -lactalbumina e um hidrolisado enzimático e encontrou que os proteolizados enzimáticos forneceram uma vantagem física ao animal exercitado, em relação às proteínas intactas. Entretanto estudos

semelhantes realizados posteriormente com o hidrolisado das proteínas conjuntas do lactosoro bovino não confirmaram tais observações (Ramos, 2001). A explicação para tal divergência de resultados aparentemente está no tamanho dos peptídeos que compõem os hidrolisados. Ramos (2001) utilizou a proteína hidrolisada com alto grau de hidrólise (~30%), enquanto a proteína utilizada por Tassi (1996) tinha um grau de hidrólise aproximadamente de 15%. No presente trabalho foi utilizado um proteolizado com grau de hidrólise aproximadamente apenas de 7,8%, bem menor que o grau da proteína adotada por Ramos (2001).

Determinações teciduais

Foi determinada a concentração de glicogênio hepático, muscular (gastrocnêmio) e do miocárdio, a partir de amostras de tecidos de animais submetidos a exercício físicos e sedentários, alimentados com **HSL** e **ISL**, estes valores são apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5.- Concentrações médias e desvios-padrão de glicogênio hepático, muscular e do miocárdio em ratos alimentados com **HSL** e **ISL** e submetidos a exercício físico.

Tratamento Físico

Determinações mg/100mg	Treinados		Treinados Exaustos		Sedentários	
	HT	IT	HE	IE	HS	IS
Glicogênio hepático	1,086 ^a ±0,043	0,447 ^d ±0,021	0,832 ^b ±0,079	0,417 ^d ±0,013	0,630 ^c ±0,109	0,225 ^e ±0,035
Glicogênio muscular	0,103 ^a ±0,019	0,100 ^{ab} ±0,044	0,104 ^a ±0,020	0,084 ^{ab} ±0,029	0,070 ^{ab} ±0,019	0,065 ^b ±0,022
Glicogênio miocárdio	0,023 ^a ±0,007	0,024 ^a ±0,006	0,029 ^a ±0,006	0,023 ^a ±0,040	0,014 ^b ±0,003	0,014 ^b ±0,005

HT = Hidrolisado Treinado

IT = Isolado Treinado

HE = Hidrolisado Treinado Exausto

IE = Isolado Treinado Exausto.

HS = Hidrolisado Sedentário

IS = Isolado Sedentário

*Os grupos com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas entre si; avaliadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$). As médias apresentadas são de 10 ratos por grupo.

Glicogênio Hepático (GH)

Na **Tabela 5** e na **Figura 5** podemos observar que existem diferenças significativas entre os pares de grupos **HT e IT**, **HE e IE** e **HS e IS**, mostrando que a concentração de glicogênio foi consideravelmente maior nos grupos que consumiram a dieta com o hidrolisado do soro de leite do que os alimentados com isolado. Outra observação é que os animais dos dois grupos sedentários (**HS x IS**) foram os que apresentaram menor acúmulo de glicogênio hepático (GH), sendo que o grupo **IS** apresentou a mínima concentração. Por sua vez, o grupo treinado que consumiu a dieta com hidrolisado mostrou o maior acúmulo de GH.

Também podemos observar que a exaustão não resultou em depleção do glicogênio hepático (**IT quase = IE**) para animais que consumiram a dieta com isolado. Já para animais com a dieta com hidrolisado a exaustão levou a uma diminuição do GH (**HT x HE**). Deve ser levado em consideração o fato do que o grupo IE executou um trabalho a penas normal (hrs: 60min).

Finalmente observamos que os desvios-padrão (Dp) foram relativamente pequenos, isso quer dizer que a dispersão dos dados foi pequena. Considerando que os Dp são baixos, a diferença entre todas as médias (M) foram significativamente diferentes, foi possível verificar que houve interação entre as dietas e entre o nível de atividade, com exceção de **IT e IE**.

Ramos (2001) realizou um estudo com ratos submetidos a atividade física e alimentados com hidrolisado de soro de leite de alto grau de hidrólise comparada com seu concentrado e a caseína por um período curto, ele não encontrou diferenças significativas na concentração de glicogênio hepático nas três dietas estudadas, contudo a dieta com hidrolisado apresentou uma concentração menor.

No presente estudo pode-se observar que os ratos alimentados com **HSL** apresentaram diferenças significativas consideráveis com os alimentados com **ISL**, além de apresentar concentrações maiores de GH nas distintas categorias de atividade física. Como é observado na **Figura.5**.

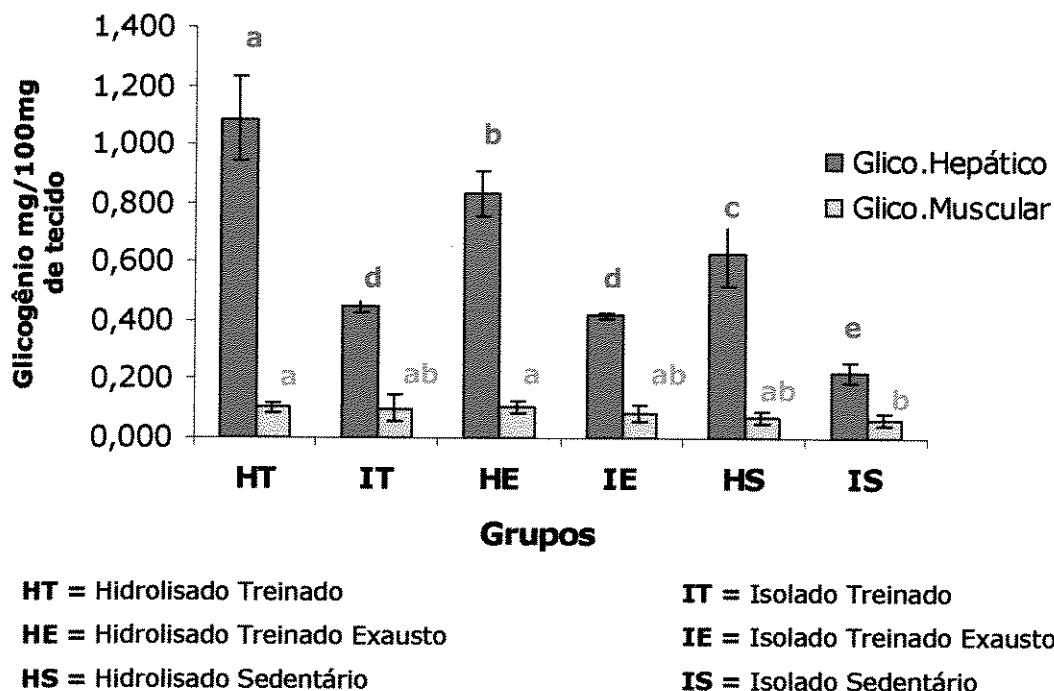


Figura 5. Concentrações médias e desvios-padrão de glicogênio hepático e muscular de ratos (10 animais por grupo) alimentados com ISL e HSL e submetidos a exercício físico.

Glicogênio Muscular (GM)

Na **Tabela 5** e na **Figura 5** podemos observar que os grupos do conjunto **HT, IT, HE e IE** não apresentam diferenças significativas em relação ao glicogênio muscular. Por sua vez as médias dos grupos do conjunto **IE, HS e IS** também não foram significativamente diferentes.

Entretanto houve diferenças entre os conjuntos **HT**, **IT** e **HE** e o conjunto **HS** e **IS**. Dito em outras palavras os dois grupos sedentários mostravam concentrações de GM significativamente inferiores aos níveis de todos os grupos que foram submetidos à atividade física. Este resultado era de se esperar, visto que a atividade física influência positivamente ao acúmulo de glicogênio muscular, a depleção de glicogênio depende da intensidade e duração do exercício imposto. O treinamento por longos períodos tende a promover alterações metabólicas, dando como resultado maiores concentrações de glicogênio muscular em grupos treinados em relação a animais sedentários (Azevedo, 1994).

O estudo atual também mostrou que a dieta com hidrolisado foi mais eficaz em preservar os níveis de glicogênio muscular, após 48 horas de recuperação, do que aqueles que foram alimentados com isolado de soro de leite.

Relacionando os resultados de glicogênio muscular (GM) com os do glicogênio hepático pode-se concluir que o hidrolisado não teve influência nos níveis de GM. Esta comparação pode-se observar melhor no **Figura 5**.

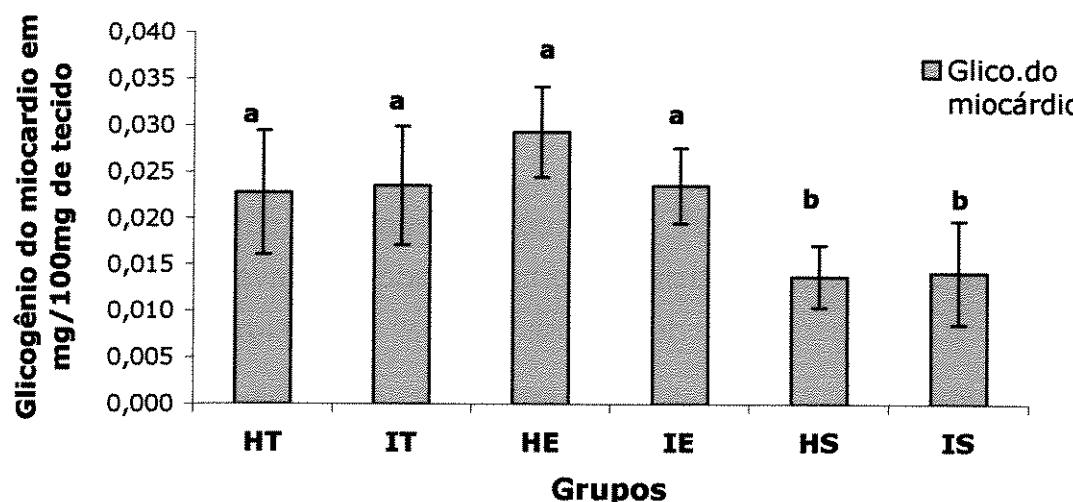
A capacidade de o músculo concentrar glicogênio parece ser muito limitada, não dependendo da forma em que a proteína é apresentada. Esta afirmação é coerente com o conceito de que o GM é exclusivamente para consumo do músculo, enquanto que o GH é para consumo do metabolismo geral especialmente o do cérebro.

Glicogênio do miocárdio

Os uso de hidrolisado resultou em aumento significativo do acúmulo de glicogênio do miocárdio detectável apenas nos animais que foram submetidos à exaustão. De forma geral como foi constatado para o glicogênio muscular, o treinamento teve efeito significativo na concentração de glicogênio do músculo cardíaco. 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 de que os animais alimentados com hidrolisado e submetidos à exaustão (**HE**) realizaram quase três vezes mais trabalho do que aqueles que consumiram a proteína intacta (**IE**).

Podemos observar que não houve interação do estado da proteína da dieta para os grupos treinados e sedentários (**HT x IT, HS x IS**). Como é observado na **Tabela 5** e na **Figura 6**.



HT = Hidrolisado Treinado

HE = Hidrolisado Treinado Exausto

HS = Hidrolisado Sedentário

IT = Isolado Treinado

IE = Isolado Treinado Exausto.

IS = Isolado Sedentário

Figura 6.- Concentrações médias e desvios-padrão de glicogênio do miocárdio de ratos (10 animais por grupo) alimentados com ISL e HSL e submetidos a exercício físico.

Determinações plasmáticas

A **Tabela 6** mostra as médias e desvios-padrão das concentrações finais de lactato, glicose, insulina, ácidos graxos, triglicerídeos e colesterol,

determinados no plasma sanguíneo de ratos alimentados com **isolado de soro de leite ou hidrolisado de soro de leite** e submetidos a exercício físico (treinados, treinados-exaustos e sedentários).

Tabela 6. Parâmetros plasmáticos determinados no plasma sanguíneo (lactato, glicose, insulina, ác. graxos, triglicerídeos e colesterol) de ratos submetidos ao exercício físico e alimentados com **ISL** e **HSL**.

Determinações	Tratamento Físico					
	HT	IT	HE	IE	HS	IS
Lactato (nmol/L)	1,5 ^d ±0,20	2,1 ^c ±0,30	4,4 ^b ±0,40	5,1 ^a ±0,20	1,2 ^d ±0,20	2,2 ^c ±0,60
Glicose mg/100mL	117,89 ^{ab} ±17,56	113,30 ^{ab} ±16,46	112,90 ^{ab} ±16,78	126,94 ^a ±14,77	101,15 ^b ±13,10	118,14 ^{ab} ±28,57
Insulina ng/mL	2,41 ^b ±1,39	3,68 ^b ±1,31	6,27 ^a ±2,30	3,66 ^b ±0,83	7,03 ^a ±1,43	3,61 ^b ±0,78
Ac. Graxos (mmol/L)	0,748 ^{ab} ±0,16	0,892 ^a ±0,19	0,642 ^{ab} ±0,24	0,49 ^b ±0,08	0,83 ^{ab} ±0,16	0,93 ^a ±0,18
TGL (mg/dL)	46,89 ^c ±9,07	31,77 ^d ±7,11	78,62 ^a ±7,72	65,18 ^b ±7,94	48,7 ^f ±9,02	43,88 ^f ±8,50
Colesterol (mg/dL)	62,57 ^a ±6,12	58,96 ^a ±5,72	62,64 ^a ±9,20	66,19 ^a ±9,26	67,70 ^a ±8,50	60,93 ^a ±7,07
HT = Hidrolisado Treinado			IT = Isolado Treinado			
HE = Hidrolisado Treinado Exausto			IE = Isolado Treinado Exausto.			
HS = Hidrolisado Sedentário			IS = Isolado Sedentário			

*Os grupos com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas entre si; avaliadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$). As médias apresentadas são de 10 ratos por grupo.

Lactato sanguíneo

Na **Tabela 6** estão representados os valores de lactato sérico nos diferentes grupos, onde podemos verificar que não houve diferença estatística entre os grupos **HT** e **HS** e **IT** e **IS**, parecendo ser que houve uma adaptação

dos animais submetidos a treinamento físico e que a atividade realizada foi o suficientemente moderada para não influenciar este parâmetro com uma leve alteração do nível de atividade.

Também podemos dizer que a dieta com o hidrolisado de soro de leite proporcionou um menor acúmulo de lactato sanguíneo, quando comparada aos resultados obtidos pela dieta com a proteína intacta. Outra observação que podemos fazer é que os grupos (**HE** e **IE**) apresentaram os níveis de lactato sanguíneo consideravelmente mais elevados, mostrando diferença significativa notável com relação aos outros grupos (**HT**, **IT**, **HS** e **IS**).

Observa-se que comparando **HE** com **IE**, a diferença foi significativa, mostrando que o grupo alimentado com a dieta com isolado de soro de leite (**ISL**) acumulou mais lactato do que o alimentado com o hidrolisado de soro de leite (**HSL**).

Com relação ao mesmo nível de atividade física e o tipo de dieta (**HT** e **IT**) e (**HS** e **IS**) verifica-se que houve uma diferença significativa, mostrando que os grupos que foram alimentados com o isolado alcançaram maior concentração de lactato que os alimentados com o hidrolisado. O hidrolisado mostrou um efeito amenizador do processo metabólico que leva ao acúmulo de lactato. Sabe-se que o treinamento físico submáximo reduz as concentrações de ácido láctico para uma determinada carga de trabalho. Os resultados aqui apresentados, todavia, mostram que a forma de apresentação da proteína da dieta pode ter um efeito igual ao do treinamento.

Gallani (1995) também verificou elevação significantemente menor nos níveis de lactato sanguíneo nos ratos treinados, em comparação com sedentários. Comprovando o fato de que o exercício físico constante contribui para a adaptação, resultando em menor acúmulo de lactato pelo músculo durante a atividade de contração.

Também registra-se que além dos animais alimentados com **ISL** apresentarem valores de lactato superiores aos alimentados com **HSL**, quando os animais com a dieta de isolado atingiram a exaustão muito antes que os animais que consumiram a dieta com hidrolisado. O nível baixo de lactato no

grupo **HE** pode ter sido responsável ao menos em parte, pelo maior rendimento dos animais consumindo a proteína hidrolisada. Finalmente, podemos observar que os desvios-padrão foram relativamente pequenos e semelhantes, o que significa que os animais responderam de forma bastante homogênea.

Glicose sanguínea

Primeiramente, podemos observar na **Tabela 6** que a concentração da glicose entre os diferentes pares de grupos (**HT-IT**), (**HE-IE**) e (**HS-I**) não apresentaram diferenças significativas, mostrando que a composição das dietas experimentais não teve influência no nível de glicose.

A única diferença significativa encontrada foi aquela entre **HS** e **IE**, sendo conveniente lembrar que os desempenhos físicos também foram muito diferentes.

Tassi (1996), verificou diferenças entre os resultados dos ratos que consumiram dieta com o hidrolisado e os que consumiram proteína intacta, ou com caseína, sendo que nos últimos a glicose sérica foi sempre menor, o que indica que o grau de hidrólise com que a proteína foi apresentada ao animal influiu significativamente na manutenção da glicemia ao longo da prova. Os resultados parecem ser consistentes com a idéia de que o uso do proteolizado possibilita a poupança de glicose. Porém, nesse estudo, a autora determinou todos seus parâmetros logo em seguida da exaustão. No estudo atual, os ratos foram sacrificados 48 horas após a última sessão de exercício exaustivo, logo, esses não devem ser considerados conflitantes. Por outro lado 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 com alto grau de hidrólise.

Insulina sanguínea

Na **Tabela 6** são apresentadas as concentrações médias de insulina sérica dos ratos alimentados com **ISL** e **HSL**. O nível de atividade parece não ter exercido qualquer efeito na concentração de insulina circulante. Analisando os dados dentre de cada par de grupos, a forma de apresentação da proteína na dieta, vemos que o hidrolisado promoveu a liberação de maiores quantidades de hormônio, particularmente para os grupos levados à exaustão e sedentários.

Considerando o fato de que a diferença entre os grupos **HT** e **IT** não foi significativa, acreditamos que a maior secreção de insulina induzida pelo hidrolisado ainda seja dependente de outros fatores. De toda forma, este resultado nos leva a crer que o efeito da proteína hidrolisada na secreção de insulina mereça uma investigação mais apurada. Não passou despercebida a coerência entre os dados de insulina e glicemia.

É sabido que a ingestão de aminoácidos livres leva a um aumento da concentração de insulina, os quais após entrarem na célula não saem. Nesse caso os aminoácidos são aproveitados dentro da célula, em contraste com a ação de outros hormônios. Ramos (2001) não achou diferenças significativas na concentração de insulina em ratos alimentados com concentrado de soro de leite e seu hidrolisado de alto grau de hidrólise. Ele atribuiu este resultado à alta concentração de aminoácidos livres os quais diminuíram a velocidade de absorção pelo intestino, diminuindo o estímulo à secreção de insulina.

É interessante notar que, se o fator determinante de uma maior secreção de insulina é a taxa de produção de aminoácidos livres no sangue, o hidrolisado com alto grau de hidrólise deveria produzir um efeito hiperinsulinimiente maior do que outro com grau de hidrólise menor. Entretanto, não é isso que se observa com clareza, razão pela qual estudos mais aprofundados se fazem necessários.

Neste estudo observou-se diferenças significativas no efeito das duas dietas, o qual pode-se atribuir ao fato do grau de hidrólise da proteína neste

caso ser médio (7,8%). O anabolismo da insulina não aumenta o tamanho da fibra muscular, mas sim melhora a estocagem de substrato intercelular.

Ácidos graxos

A **Tabela 6** mostra que não existem diferenças significativas entre os pares de grupos **HT x IT**, **HE x IE** e **HS x IS**, mostrando assim que a forma de apresentação da proteína nas dietas **HSL** e **ISL** não teve influência nos níveis séricos de AGLs. Sendo que os grupos que consumiram a dieta **ISL** apresentam valores um pouco superiores aos que os que consumiram a dieta **HSL**, exceto nos grupos que foram levados à exaustão **HE** e **IE** onde ocorreu o contrário.

Por outro lado, podemos observar que os grupos **IT** e **IS** possuem quase a mesma concentração sérica de AGL, mas, quando comparados com o grupo **IE**, observa-se uma expressiva diferença significativa, mostrando que o grupo que consumiu o isolado e foi levado à exaustão teve a média mais baixa de todos os grupos.

O achado estaria explicado, segundo COSTILL *et al.* (1977), pelo fato de que a concentração sérica de AGL aumentada, diminui a utilização do glicogênio, enquanto que o decréscimo nos AGL, pode resultar em depleção do glicogênio, sendo esta uma das principais causas da exaustão.

Finalmente, a **Tabela 6** mostra que os grupos que consumiram a dieta com hidrolisado (**HT**, **HE** e **HS**) não apresentaram diferenças significativas entre si na concentração sérica de AGL (0,64 a 0,82 mmol/L), concluindo que mais uma vez que a atividade física realizada não teve influência sobre tal parâmetro.

Triacilgliceróis

Na **Tabela 6** podemos observar que os grupos que foram alimentados com isolado do soro de leite (**ISL**) apresentaram concentrações menores de TGL do que os que foram alimentados com hidrolisado de soro de leite (**HSL**), independentemente da atividade.

Por outro lado, podemos dizer que o par de grupos **HT x IT** e **HE x IE** apresentaram diferenças significativas entre si. Estes resultados foram coerentes com os observados por Nagaoka *et al.*, 1991. Além disso, podemos observar que os grupos que foram levados à atividade física de exaustão (**HE** e **IE**) apresentaram a maior concentração de TGL entre todos os pares de grupos.

Estes resultados, apreciados de uma forma geral sugerem que o aumento dos triacilgliceróis representa o preparo do organismo para um estado metabólico acelerado.

Outra observação é que os grupos **HT** e **HS** não apresentaram diferenças significativas concluindo que para esse caso o exercício não teve influencia sobre a concentração de TGL, cabe realçar que o grupo **IT** apresentou a menor concentração de TGL entre todos os grupos.

Colesterol

Neste caso podemos observar que não existem diferenças significativas na concentração de colesterol em nenhum dos grupos analisados. Podemos indicar que o grupo **IT** apresentou a menor concentração de colesterol no plasma em relação aos outros grupos, mas essa diferença não é significativa, podemos concluir que o tipo de proteína ao igual que o tipo de exercício não tiveram 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 pode influenciar a concentração de colesterol sérico. As proteínas de origem animal geralmente exercem um efeito hipercolesterolemiantelêmico, quando comparadas com as de origem vegetal; podendo causar diferentes graus de hipercolesterolemia.

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo nos permitiram chegar as seguintes conclusões:

1. A dieta com hidrolisado de soro de leite de grau de hidrólise médio promoveu um melhor desempenho físico em animais treinados, como foi evidenciado pelo teste de exaustão.
2. A ingestão de produtos parcialmente hidrolisados (soro de leite) promoveu alterações metabólicas capazes de reduzir as concentrações de lactato sangüíneo.
3. As concentrações da glicose sangüínea não apresentaram diferenças significativas após recuperação dos ratos por 48 horas.
4. A concentração de glicogênio hepático foi maior em todos os grupos de ratos alimentados com HSL em relação aos alimentados com ISL, além de apresentar diferenças significativa consideráveis entre as duas dietas.
5. Embora as dietas não tenham apresentado diferenças na concentração de glicogênio muscular após o período de recuperação (48h), o nível de atividade física mostrou que os animais sedentários apresentaram menores estoques de GM.
6. Os uso do hidrolisado resultou em aumento significativo das reservas de glicogênio do miocárdio, detectável apenas nos animais que foram submetidos à exaustão. 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.
7. A concentração de insulina não apresentou diferenças significativas entre os diferentes grupos com exceção dos grupos HE e HS os quais tiveram um incremento significativo na concentração deste parâmetro.

8. Embora as dietas e a atividade física não tenham apresentado influências sobre a concentração de ácidos graxos, após recuperação podemos dizer que os grupos que foram levados até exaustão apresentaram a menor concentração deste parâmetro.
9. Com respeito aos níveis de triacilgliceróis podemos concluir que os animais levados à exaustão apresentaram concentrações maiores de TGL.
10. Foi confirmado que o uso de isolado e hidrolisado de soro de leite não têm influência sobre os níveis de colesterol.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABELL, L.L; LEVY, B.B; BRODIE, B.B.; KENDALL, F.E. **Journal Biological Chemistry** 195:357 (1952).
- ADLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzesulfonic acid, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 27 (6): 1256-1262, 1979.
- AZEVÉDO J.R.M. **Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados, durante e após o exercício agudo de natação** Campinas 1994 172p Dissertação (Doutor em fisiologia)- Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- BRUKE, L. M.; READ, RSD. Dietary supplements in sport. **The Physician and Sports Medicine**, Minneapolis, 15(1): 43-65, 1993.
- 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**, Bethesda, vol.43, p. 695-699, 1977.
- DOLE V.P.; MEINERTZ H. Micro determination of long chain fatty acids in plasma and tissues, **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, vol.235, No. 9, p 241-246, 1960.
- DUNCOMBE W.G. Colorimetric micro-determination of non-etherified fatty acids in plasma, **Clinical Chemicals Acta**, Amsterdam, vol.29, 567 p., 1964.
- ELPHICK M.D. Modified colorimetric ultramicro method for estimating NEFA in serum, **Journal of Clinical Pathology**, [s.I.], vol.21, 567p, 1968.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Amino-acid content of food and biological data on proteins. FAO Nutritional Studies, Roma, vol.24, 1970.
- FELL, J.W.; RAYFIELD, J.M.; GULBIN, J.P.; GAFFNEY, P.T. Evaluation of the Accusport® Lactate analyzer. **Int. J. Sports Medicine**. 19: 199-204, 1998
- FORSLUND, A.H.; EL-KHOURY, A.E.; OLSSON, R.M.; SJODIN, A.M.; HAMBRAEUS, L.; YOUNG, V.R. Effect of protein intake and physical activity on 24h pattern and rate of macronutrient utilization. **American Journal of Physiology**, Bethesda, 276(39): E964-E976, 1999.
- FROKJAER, S. Use de Hydrolysates for protein supplementation. **Food Technology**. Chicago, 86-88, Oct. 1994.
- 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. 156p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia)-Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

HENRY R.J. **Clinical Chemistry Principles and Techniques**, 2^a ed. Hargeston: Harper ; Row, 1974.

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

JACOBS, N.J.; VAN DENMARK, P.J. **Aarch. Biochemistry Biophysical** 88, p. 250-255, 1960.

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

JAYAPRAKASHA, H.M.;TIRUMALESHA; A. RAMACHANDRA; RAO. H.G. Whey protein concentrate and butter milk solids in the formulation of ready-to-use dried ice cream mix. In: **Proceeding of Indian Convention of Food Scientists and Technologists**. Mumbai, 7-21, 1997.

LEMON, P. W. R. Effect of exercise on protein requirements. **Journal of Sports Sciences**, 9: 53-70, 1991.

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

McINTOSH, G.H.; ROYALE, P.J.; LEU, R.K.L.; REGESTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L.; KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey proteins as functional food ingredients. **Int. Diary Journal**, 8 425-434, 1998.

McINTOSH G.H; LE LEU R.K.,The influence of dietary on colon cancer risk, **Nutrition Research Australia**, Vol.21, Issue:7 July, 1053-1066p, 2001.

NAGAOKA S.; KANAMARU Y.; KUZUYA Y. effects of whey protein and casein on the plasma and liver lipids in rats, **Agriculture Biological Chemistry**, 55: (3), 813-818, 1991.

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

PHILLIPS, S.M.; TIPTON, K.D. FERRANDO, A.A.; WOLE, R.R., Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turn over **American Journal of Physiology**, Bethesda, 276(36): E118-E124, 1999.

PILEGAARD H.; DOMINO K.; NOLAND T.; HELLSTEN Y.; HALESTRAP AP.; BANGSBO J. Effect of high-intensity exercise training on lactato/H⁺ transport

capacity in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, Bristol, 276(39): E255-E261, 1999

PIMENTA, F.M.V. **Efeito do consumo do hidrolisado das proteínas do soro lácteo no desempenho físico e no metabolismo protéico do rato exercitado.** Campinas, 2003.106p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição)-Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

RAMOS, A.G. **Utilização das proteínas do soro lácteo por ratos jovens.** Campinas, 2001. 83p Dissertação (Mestrado em ciências da nutrição)-Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

REEVES, P.G.; NIELSEN, FH.; FAHEY, GC. JR.. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**. 1993; 123: 1939-51.

SILVESTRE, M. P. C. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates, **Food Chemistry**, Vol. 60. No. 2 pp 263-271 1997.

SPACKMAN D.C.; STEIN W.H.; MOORE S. A recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Biochemistry**, New York, 30: 11190-1206, 1958.

TASSI, E.M.M. **Desenvolvimento de dietas para o desempenho físico. Comparação de oligopeptideos de α -lactoalbumina com a proteína intacta como fonte protéico-energética no rato.** Campinas, 1996 79p. Dissertação (Mestrado em ciência da nutrição) – UNICAMP, FEA.

TASSI, E M. M.. AMAYA-FARFAN, J. AZEVEDO R. Hydrolyzed (-lactalbumin as a source of protein to the exercising. **Nutrition Research**, 18(3): 875-881, 1998.

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

ZHANG X; BEYNEN A.C. Lowering effect of dietary milk-whey protein v. casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats, **British Journal of Nutrition**, 70 p139-146, 1993.

*Referências seguindo as normas da NBR 6023/2002.

EFICIÊNCIA METABÓLICA DO HIDROLISADO SORO DE LEITE COM GRAU DE HIDRÓLISE MÉDIO NA RECUPERAÇÃO DE RATOS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO EXAUSTIVO

RESUMO

As proteínas de soro de leite, além de possuírem um alto valor biológico e escore químico superior à de outras proteínas de origem animal, são consideradas proteínas de rápida absorção facilitando o metabolismo. Esta característica especial resulta na recuperação mais rápida de organismos debilitados, estimulando a síntese protéica, o que justifica sua utilização como suplemento na alimentação de esportistas. Recentemente as proteínas do soro vêm sendo muito utilizadas por atletas, devido a suas características funcionais, fisiológicas e nutricionais. Contudo não se sabe ainda qual é o melhor grau de hidrólise dessas proteínas capaz de proporcionar resultados benéficos ao exercício físico. O presente trabalho teve como objetivo verificar a capacidade de recuperação de ratos submetidos a exercício físico exaustivo quando alimentados com o hidrolisado de soro de leite bovino (grau de hidrólise 7,8%), visando comparar o desempenho físico e alguns parâmetros bioquímicos. Neste experimento foram utilizados 60 ratos Wistar ((100g) e divididos em seis grupos: sedentários (SM), sedentários-exaustos (SEM), treinados (TM), treinados-exaustos (TEM) e treinados com recuperação de 24 e 48h (TER/24 e TER/48 respectivamente). A dieta foi formulada de acordo com as normas da AIN-93G modificada. O período experimental foi de 9 semanas, durante o qual os animais foram submetidos a treinamento contínuo em esteira, o grupo sedentário foi considerado como controle. Após período de treinamento, os animais foram submetidos à exaustão, seguida de avaliação da capacidade de recuperação. Foram monitorados: evolução ponderal, tempo de exaustão, lactato, glicogênio hepático (GH), glicogênio muscular (GM), glicogênio do miocárdio (GC), também foram determinados glicose, insulina, ácidos graxos livres (AGL), triglicérides (TGL) e colesterol sanguíneos. Foi observado que os ratos sedentários atingiram o ponto de exaustão muito antes que os animais treinados (42(14 e 79(16 min, respectivamente). Em relação

aos níveis de glicose não houve diferenças significativas entre os grupos. Os níveis de lactato sanguíneos apresentaram diferenças significativas nos grupos submetidos à atividade física exaustiva ($p<0,05$), mostrando que o hidrolisado foi vantajoso. O GH não apresentou diferenças significativas entre os grupos **SM** e **TM**, mas mostrou diferenças significativas quando comparados aos demais grupos, havendo uma recuperação gradual do glicogênio, todavia incompleta. Os resultados do GM foram semelhantes aos do GH, porém a recuperação foi completa. Quanto ao GC, estes não apresentaram diferenças significativas entre os grupos **SEM** e **TEM**, mas apresentaram diferenças significativas quando comparados aos demais grupos. Os parâmetros de glicose sérica, insulina e colesterol não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos grupos. A concentração de AGL foi significativamente maior para o grupo **SEM** e menor para o grupo **TER/24**. Finalmente em relação aos níveis de TGL, os grupos **SM**, **SEM** e **TM** não apresentaram diferenças significativas entre si, mas apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos **TEM**, **TER/24** e **TER/48**, sendo notada uma recuperação gradual deste parâmetro.

Palavras chaves: Proteína de soro, hidrolisado, recuperação, ratos, exercício.

**METABOLIC EFFICIENCY OF THE MILK WHEY PROTEIN
HYDROLYSATE WITH MEDIUM DEGREE OF HYDROLYSIS ON THE
RECOVERY OF RATS SUBMITTED TO EXHAUSTING PHYSICAL
EXERCISE**

SUMMARY

Milk whey proteins, besides their high biological value and superior chemical score in comparison to other proteins of animal origin, are considered proteins of fast absorption and metabolism. Fast proteins are thought to be more efficient in the recovery of debilitated organisms in a pronounced catabolic state because of great stimulation to protein synthesis, which justifies its possible use as food supplement for sports men. Today, the whey proteins have become widely used by athletes due to their various properties. Regarding the effect of the degree of hydrolysis, it is not yet known what influence this factor can have on the beneficial effects to the exercising rat. The present work had the objective of verifying the capacity of recovery of rats submitted to exhausting physical exercise when fed with bovine milk whey hydrolysate a medium degree of hydrolysis. In this experiment, 60 male Wistar rats were used. The diet was formulated in accordance with the norms of the modified AIN-93G. The assay was planned aiming to compare the physical performance of some biochemical parameters of groups of Wistar rats. With about 100g, the animals were fed with the experimental diet during 9 weeks and submitted to continuous training in the treadmill. The sedentary group was considered the control one. After a period of training the animals were submitted to exhaustion and the recovery capacity was evaluated. Weight gain, time of exhaustion, lactate and hepatic (GH), muscular (GM), and myocardium (GC) Glycogen were monitored. Other standard parameters were also determined glucose, insulin, fatty acids, triglycerides and cholesterol levels in blood. It was observed that the sedentary rats reached the exhaustion point long before the trained animals (42 ± 14 versus 79 ± 16 min. respectively). In relation to the glucose levels, there were no significant

differences among the different groups. The lactate levels in blood presented significant differences in the groups submitted to the exhausting physical activity ($p<0,05$), as compared to the groups not submitted to exhaustion (**SM** and **TM**). In the case of the **GH**, it was observed that the **SM** and **TM** groups presented significant differences with the other groups and the recovery of the glycogen was not complete. A similar behavior was observed for the **GM** except that the recovery was complete. The **SEM** and **TEM** groups presented significant differences in comparison with the other groups in the case of the **GC**. The serum glucose, insulin and cholesterol parameters presented no significant differences in any of the groups. For the fatty acids, it was observed that the **SEM** and the **TER/24** groups had the highest and lowest concentrations, respectively. These groups were statically different from the rest of the groups. Finally, for the **TGL** levels, it was observed that the recovery of this parameter was gradual and not complete.

Keywords: Whey protein, hydrolysate, recovery, rats.

1. INTRODUÇÃO

O hidrolisado protéico do soro do leite vem sendo utilizado em grande escala na produção de alimentos para esportistas, visto que ele possui absorção mais rápida do que a proteína na forma intacta. A pesar disso, não existe ainda embasamento científico suficiente quanto à sua correta utilização nutricional ou seus efeitos fisiológicos, especialmente se é administrada de forma crônica ou sub-crônica. O efeito do exercício nos requerimentos alimentares em proteína tem sido um tópico controvertido durante muitos anos. Uma quantidade considerável de evidências experimentais indica que o exercício regular incrementa as necessidades de proteína (LEMON, 1991).

O consumo de hidrolisado de soro de leite tem sido associado à melhor capacidade de preservar o glicogênio muscular, glicose e albumina sérica, para animais (ratos) em atividade física (TASSI, 1996).

Estudos mostraram que para uso dietético os hidrolisados de proteínas podem ser ricos em peptídeos de baixo peso molecular, especialmente em di- e tripeptídeos com o menos possível de aminoácidos livres e assim o hidrolisado obtém um alto valor nutricional e terapêutico, por outra parte, se presume que peptídeos de alto peso molecular (mais de 20 resíduos de aminoácidos) estão associados com a funcionalidade melhorada do hidrolisado (SILVESTRE, 1997).

O exercício intenso proporciona um aumento na síntese de proteína muscular, bem como a degradação desta mesma proteína no pós exercício. Recentes estudos têm demonstrado que a suplementação de proteínas acarreta em uma melhora do balanço entre síntese e degradação de proteínas musculares pós exercício (TIPTON *et al.*, 1999).

Ramos (2001) trabalhou com as proteínas do soro de leite com alto grau de hidrólise e atividade física por um curto período. Os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas que pudessem relacionar o benefício da dieta subministrada em benefício da atividade física realizada. O autor sugeriu a necessidade da realização de pesquisas com períodos mais prolongados de tempo e grau de hidrólise médio.

Segundo os resultados obtidos no ensaio do capítulo 1, onde foi observado que a dieta com proteína hidrolisada foi mais eficaz em promover um melhor desempenho físico nos animais submetidos ao treinamento, tanto na resistência à exaustão, como pelas alterações metabólicas desejáveis. Por tanto foi planejado um segundo ensaio utilizando somente a proteína que proporcionou os melhores resultados.

O presente experimento foi programado para verificar a capacidade do hidrolisado de soro de leite de grau de hidrólise médio, na recuperação dos parâmetros bioquímicos estudados de ratos submetidos a exercício físico numa esteira, tendo como grupo controle os ratos sedentários. A recuperação foi avaliada após 24 e 48 horas em resposta à dieta experimental utilizada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Verificar a eficiência metabólica do hidrolisado de soro de leite de grau de hidrólise médio (7,8%), na capacidade de recuperação de ratos submetidos ao exercício físico exaustivo.

2.2. Objetivos Específicos:

- Determinar e comparar os parâmetros bioquímicos típicos do exercício produzidos pelo consumo do hidrolisado de soro de leite para avaliar a recuperação de ratos submetidos a três níveis de atividade:

Parâmetros em tecidos duros

- ❖ Glicogênio hepático
 - ❖ Glicogênio muscular
 - Gastrocnêmio
 - Coração

Parâmetros séricos

- ❖ Lactato
 - ❖ Glicose
 - ❖ Insulina
 - ❖ Ácidos graxos
 - ❖ Triacilgliceróis
 - ❖ Colesterol

- Acompanhar o processo da recuperação dos diferentes parâmetros bioquímicos ao longo das primeiras 24 e 48 horas após a atividade exaustiva.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DIETAS EXPERIMENTAIS

No segundo experimento a dieta oferecida foi elaborada de acordo com a formulação preconizada pelo *American Institute of Nutrition* (Reeves et al., 1993) para dieta AIN-93 G com modificação no conteúdo de proteína bruta para 12% (Pellet, 1980). A fonte de proteína utilizada neste ensaio foi hidrolisado de soro de leite bovino (ALATAL™ 817), da NZMP™, fornecedor global de ingredientes lácteos (Wellington, N.Z.), com um grau de hidrólise médio (7,8%).

3.2. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS

Os componentes da dieta experimental, da mistura mineral e da mistura vitamínica utilizados neste ensaio são exatamente iguais às utilizadas no ensaio do capítulo 2 (p. 52, 53 e 54). A dieta foi elaborada para fornecer uma concentração de proteína de 12%, os animais foram alimentados com a dieta a partir do início da segunda semana de ensaio, e mantida até o final, sendo num total de 10 semanas.

Foi determinada a composição centesimal da dieta, após análises laboratoriais, as análises foram feitas em triplicata, conforme descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1. Composição centesimal da dieta experimental, utilizando como fonte de proteína o hidrolisado de soro de leite (GH 7,8%).

C o m p o n e n t e s	%
Proteína	11,76
Lipídeo	7,06
Carboidrato	68,84
Unidade	8,03
Cinzas	4,31

A proteína bruta e o nitrogênio foram determinados pelo método de Kjeldahl, descrito pela AOAC (1990). Lipídeos totais foram determinados pelo método de Bligh e Dyer (1959). Sólidos totais, unidade e cinzas pelos métodos descritos pela AOAC (1990). Os carboidratos foram determinados através de cálculos matemáticos, a partir das determinações de umidade, cinzas, proteína bruta e lipídeos.

3.3. ENSAIO BIOLÓGICO

Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem Wistar SPF, recém-desmamados (28 dias, $78,5 \pm 16$) procedentes do Centro de Bioterismo (CEMIB, UNICAMP). Os animais foram manipulados segundo o "Guiding Principles for the Use and Care of animals". Foram mantidos na temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de 50-60%, com o ciclo de luz invertida de 12 horas, em gaiolas individuais para seu crescimento.

Os animais foram alimentados com dieta comercial (Nuvital para roedores, Curitiba, Brasil) e água à vontade, até atingir um peso de aproximadamente 100g. Até este período os animais permaneceram no biotério do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição (DEPAN/FEA/UNICAMP). No final deste período, os ratos foram transferidos para o biotério do laboratório de bioquímica do exercício Instituto de Biologia da UNICAMP, onde os ratos foram separados (5 por gaiola), para o treinamento e testes de atividade física numa esteira, os ratos foram pesados e submetidos a 9 semanas de ensaio, sendo a primeira semana de adaptação à dieta experimental AIN-93G modificada com água a vontade.

O tempo total do ensaio biológico foi de 10 semanas, o experimento foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia de UNICAMP com o protocolo para uso de animais # 247-1.

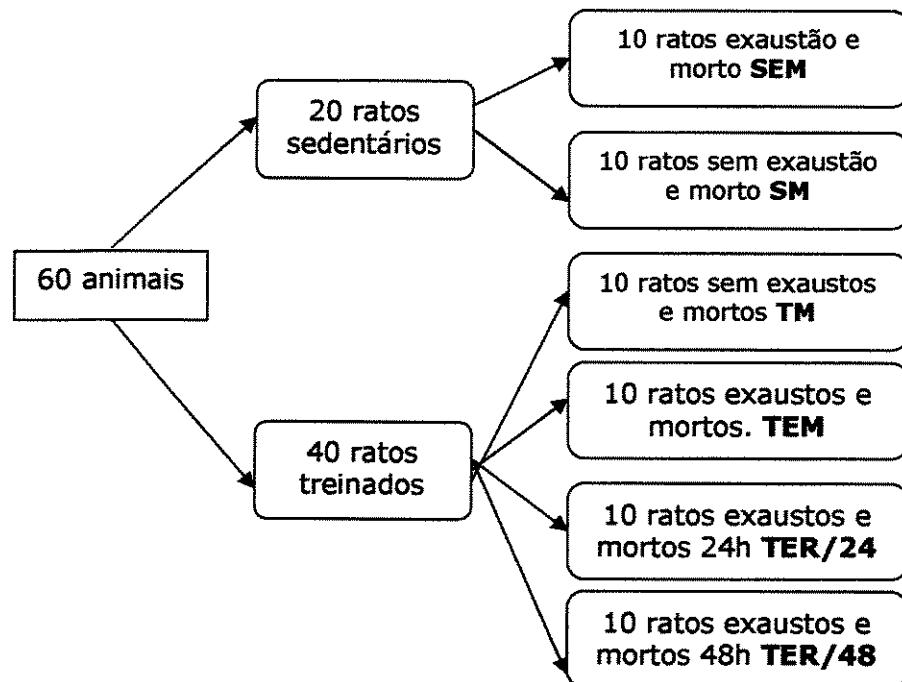
3.4. CONTROLE DA EVOLUÇÃO PONDERAL.

Os animais foram pesados, numerados e separados em seis grupos, no momento que eles foram recebidos, após este momento, os ratos foram pesados a cada sete dias em uma balança eletrônica durante o período de treinamento e inclusive o dia de sacrifício.

Neste ensaio não foi acompanhada a ingestão alimentar dos animais, já que eles só permaneceram por uma semana em gaiolas individuais. Pelo fato de utilizar a mesma dieta com o hidrolisado do soro de leite, que o primeiro experimento, não foi feito o balanço nitrogenado, o qual já foi determinado no ensaio do capítulo 2.

3.5. DIVISÃO DOS ANIMAIS

Os ratos foram divididos em seis grupos com 10 animais por grupo, quatro dos seis grupos foram submetidos a treinamento físico, dos quais três foram levados até exaustão. Dos grupos sem atividade física um de eles foi levado até exaustão, esta divisão pode ser observada no **Fluxograma 1**.



SM =Sedentário e morto

TEM = Treinado exausto e morto

SEM =Sedentário exausto e morto

TER/24 = Treinado exausto e morto após 24 horas

TM = Treinado e morto

TER/48 = Treinado exausto e morto após 48 horas

Fluxograma 1 Divisão dos ratos em treinados (4 grupos) e sedentários (2 grupos) e alimentados com hidrolisado de soro de leite e submetidos a exercício físico.

3.6. PROTOCOLO DE TREINAMENTO

De início foram selecionados os animais, em sedentários e treinados, eles foram submetidos a um teste de aptidão física, por 5 minutos a uma velocidade de 10m/min. Para assim separar os animais que correm voluntariamente dos que não, obtendo os grupos desejados. Os animais foram separados em seis grupos, como foi mencionado anteriormente (fluxograma 1). Destes 6 grupos 4 foram submetidos a um treinamento físico, com o objetivo de avaliar o desempenho do animal em resposta à dieta oferecida, os 2 grupos restantes (sedentários) foram utilizados como controle.

Os animais escolhidos para realizar a atividade física passaram por um período adaptação ao treinamento físico de 8 dias. Após esta fase, os ratos iniciaram o período de treinamento durante 8 semanas segundo a recomendação de Zoppi (1999), este protocolo é mostrado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Protocolo de treinamento, aplicado durante 9 semanas nos diferentes grupos de ratos submetidos a exercício físico (**SEM,TEM,TER/24** e **TER/48**).

Semana	Nº de dias	Tempo (min)	Velocidades (m/min)
		10 **	5 **
1	2 *	10 ***	10 ***
		10 **	5 **
1	6 *	30 ***	10 ***
2	7	40	10
3	7	40	15
4	7	40	20
5	7	50	22,5
6	7	50	25
7	7	60	25
8	7	60	25
9	7	60	25

*Período de adaptação ao treinamento físico.

**Tempo e velocidade inicial.

***Tempo e velocidade final

Após as 9 semanas de exercício físico, os grupos **SEM,TEM,TER/24** e **TER/48** foram submetidos ao exercício exaustivo, correndo no início a uma velocidade de 25m/min, até atingir 32,5m/min. Foi considerado a exaustão como o momento em que o animal não conseguia sair do choque elétrico localizado na base da esteira, o tempo da exaustão de cada animal foi devidamente registrado.

Os grupos **SEM** e **TEM** foram sacrificados imediatamente após a exaustão, enquanto os grupos **TER/24** e **TER/48** foram sacrificados 24 e 48

horas após a exaustão respectivamente, isto para avaliar o processo de recuperação.

O treinamento físico foi feito durante todas as manhãs de segunda à sexta feira entre 8:30 e 13:30 horas. Alguns animais apresentaram dificuldades em se adaptar ao exercício físico, esses animais foram devidamente monitorados, até que retomassem o ritmo adequado de treinamento, evitado-se que ficassem no choque constante.

3.7. TESTE DE EXAUSTÃO

Os grupos **TM** e **SM** não foram submetidos a este teste. Para ter um melhor acompanhamento do teste, grupos de 5 animais de aproximadamente 320 g foram removidos de suas gaiolas aleatoriamente, isto para facilitar o controle do ponto de exaustão de cada animal, cabe aclarar que a esteira utilizada tem capacidade para 12 animais mas na hora de submeter aos animais à exaustão somente foram usados 5 por vez.

Nos grupos **SEM**, **TEM**, **TER/24** e **TER/48** o lactato foi medido logo em seguida da atividade física exaustiva, com a diferença de que os dois primeiros (**SEM** e **TEM**) grupos foram sacrificados após esta medição, os outros dois (**TER/24** e **TER/48**) grupos foram sacrificados após 24 e 48 horas respectivamente. Para os grupos que não foram levados até exaustão (**TM** e **SM**) o lactato foi medido momentos antes do sacrifício do animal.

Em todos os casos após o sacrifício foi feita a colheita do sangue, retirada dos diferentes tecidos, para uma futura determinação dos parâmetros a ser estudados.

3.8. MÉTODOS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

3.8.1. Dosagem da concentração de lactato sanguíneo

- Lactímetro. Accusport (Böehringer Mannheim GmbH Biochemica, Alemanha) (Fell *et al.*, 1998).
- Fita para medição de lactato BM-Lactate (Roche Diagnostics, GmbH Mannheim, Germany)
- Tubos capilares.
- Sangue caudal de cada animal.

Para realizar a medição do lactato sanguíneo foi cortado a ponta da cauda do animal, o sangue foi imediatamente coletado no tubo capilar e depositado sobre a fita, a qual se introduz no lactímetro, onde foi realizada a leitura da concentração de lactato. Esta medição no caso dos animais sedentários e treinados sem exaustão foram feitos um pouco antes de seu sacrifício e no caso dos ratos submetidos ao treinamento exaustivo foi feita logo após da última sessão de treinamento, objetivando-se a comparação entre a obtenção do lactato em repouso e logo após exaustão.

3.8.2. Coleta do sangue

A coleta do sangue foi feita por punção cardíaca, imediatamente depois que o animal ficou anestesiado por inalação com hidrato de cloral (10%), o sangue coletado foi colocado em tubos sem anticoagulante e refrigerados em gelo. A seguir foram centrifugados a 3000rpm (765 G) por 10-20min, em uma centrifuga laborzentrifugen 2k15 refrigerada (Sigma) à temperatura de 5°C, o plasma obtido foi imediatamente congelado em N₂ líquido a -195°C. Vale aclarar que o tempo para que o sangue fosse centrifugado foi inferior a 1 hora do momento da coleta.

3.8.3. Coleta dos órgãos

Foram coletados os seguintes órgãos:

Fígado

Coração

Músculo Gastrocnêmio

Após a coleta do sangue, se procedeu à extração dos diferentes órgãos, uma vez extraídos, eles foram imediatamente colocados em nitrogênio líquido para seu congelamento e logo foram envolvidos em papel alumínio e armazenados em de nitrogênio para sua análise posterior.

3.8.4. Determinação de glicogênio

Foi determinado o glicogênio dos diferentes órgãos:

- FÍGADO
- MUSCULO
 - a) Gastrocnêmio
 - b) Cardíaco

A determinação de glicogênio destes órgãos foi realizada com base no método empregado por Lo *et al.* (1970), sendo, porém substituído o uso do glicogênio por glicose, na solução glicogênio padrão (ANEXO2).

Para a determinação do *glicogênio hepático* foi padronizado o corte do lóbulo (lóbulo inferior) em todas as amostras e a mesma quantidade para minimizar os erros, a quantidade da amostra foi aproximadamente 25mg, as amostras foram pesadas numa balança de torção de precisão "Roller-Smith" e transferidas com pinça tipo fórceps para um tubo com 0,5 mL de KOH a 30%, saturado com Na₂SO₄. Os tecidos foram imersos na solução e mantidos em banho de gelo até que todos os tubos fossem preenchidos.

Na determinação do *glicogênio muscular* e *glicogênio do miocárdio* se procedeu da mesma forma que para o glicogênio hepático, a única diferença sendo a quantidade de amostra. Para o tecido muscular foram separados aproximadamente 30mg e para o miocárdio aproximadamente 35mg.

3.8.5. Determinação da glicose sérica

A determinação de glicose foi feita utilizando o kit do Laborlab S/A produtos para laboratório (Guarulhos, SP), Glicose Stable, pelo método enzimático. A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda 500nm (HENRY, 1974). O procedimento de esta determinação esta no ANEXO 3.

3.8.6. Determinação de insulina

A determinação da insulina foi realizada pela técnica de radioimunoensaio (RIE), feita por o pessoal do Departamento de Fisiologia da Faculdade da Biologia da UNICAMP. O procedimento e os reativos utilizados estão no ANEXO 4.

3.8.7. Determinação de ácidos graxos

Foi utilizado um kit comercial fornecido pela Wako Chemicals, Gmhb (Neuss, Alemanha). O método consiste na determinação colorimétrica de ácidos graxos não esterificados no soro. Adicionando-se Acyl-CoA sintetase, ocorre uma acilação da coenzima A (Côa) e os ácidos graxos livres formando Acil-CoA. O Acil-CoA produzido então é oxidado na presença da Acil-CoA oxidase para produzir peróxido de hidrogênio no qual na presença de peroxidase permite a condensação oxidativa de 3-metil-Netil-N-(β -hidroxietil)-alanina com 4-aminoantipirina desenvolvendo uma coloração rosa que pode ser mensurada colorimetricamente à 550nm (DUNCOMBE, 1964; ELPHICK, 1968; DOLE; MEINERTZ, 1960).

3.8.8. Determinação dos triacilgliceróis

A determinação foi feita mediante a utilização de um kit do Laborlab S/A, produtos para laboratório (Guarulhos, SP), Kit-TRIGLICERÍDEOS GPO-PAP método colorimétrico enzimático liquid stable (Jacobs *et al.*, 1960). A leitura foi feita em espectrofotômetro em 505nm de comprimento de onda. O procedimento de esta determinação esta no ANEXO 5.

3.8.9. Determinação do colesterol

A determinação foi feita utilizando um Será determinado utilizando por um kit do Laborlab S/A, produtos para laboratório (Guarulhos, SP) Kit-COLESTEROL método enzimático, colesterol oxidase, colorimétrico e ponto final (Abell *et al.*, 1952). A leitura foi feita em espectrofotômetro em 505nm de comprimento de onda. O procedimento de esta determinação esta no ANEXO 6.

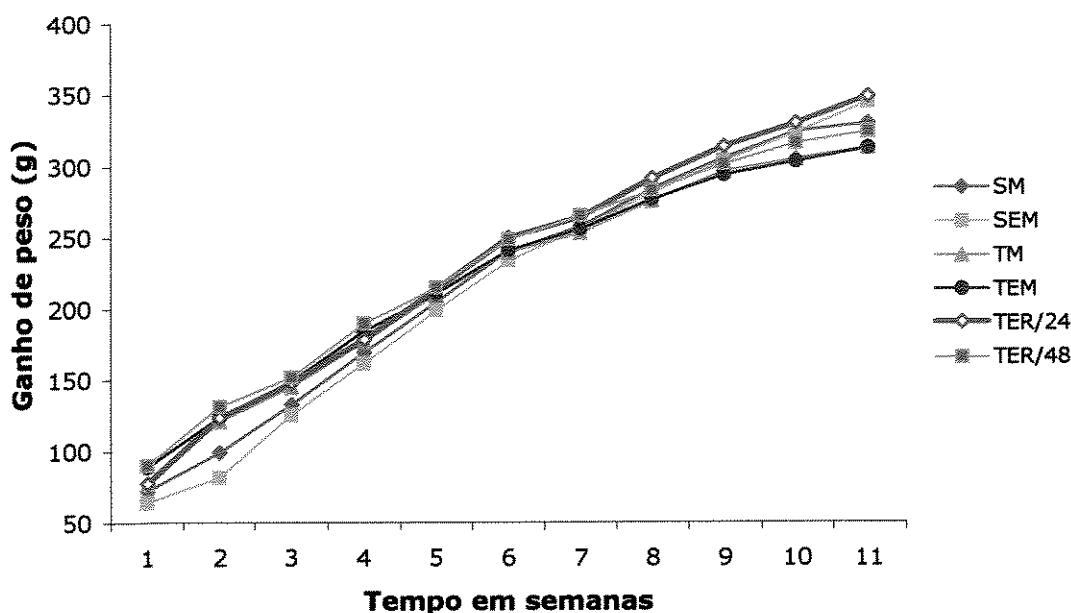
3.9. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram submetidos a análise estatística usando o programa STATISTICA® para ambiente Windows®, através da análise de variância (ANOVA) e análise das diferenças entre médias segundo o teste de Tukey, considerando $p<0,05$ como critério de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Evolução Ponderal

Na **Figura 1** podemos observar que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre as curvas de crescimento dos diferentes grupos, também podemos dizer que a evolução ponderal foi gradualmente progressiva durante todo o ensaio experimental.



SM =Sedentário e morto **TEM** = Treinado exausto e morto
SEM =Sedentário exausto e morto **TER/24** = Treinado exausto e morto após 24 horas
TM = Treinado e morto **TER/48** = Treinado exausto e morto após 48 horas

Figura 1. Evolução ponderal de ratos Wistar alimentados com hidrolisado de soro do leite bovino durante 10 semanas.

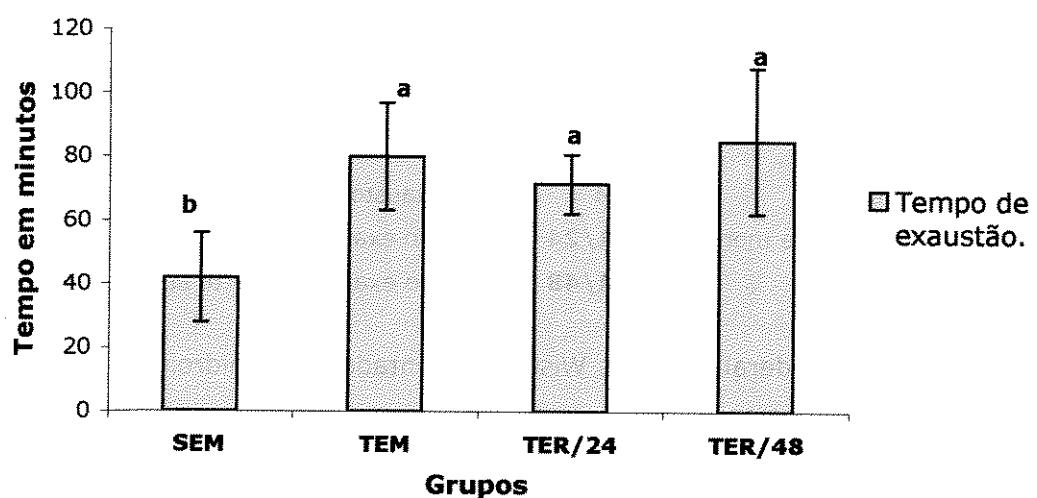
Tempo de Exaustão

Foram levados ao treinamento exaustivo os grupos de animais previamente programados (**SEM, TEM, TER/24** e **TER/48**), este treinamento foi feito com a finalidade de comparar o tempo médio necessário para atingir a

exaustão. Os grupos **SM** e **TM** foram utilizados para obter os parâmetros basais, já que eles não passaram por o treinamento exaustivo. O objetivo de levar ao um treinamento exaustivo ao grupo **SEM** foi para avaliar o efeito do treinamento físico em animais treinados e não treinados.

Foi considerado como a exaustão como o momento que o animal não conseguia sair do choque constante localizado na base da esteira, este tempo foi devidamente registrado e como era de se esperar foi diferente para cada grupo. A origem específica da fadiga muscular que ocorreu após exercício exaustivo não é conhecida. Entretanto, sabe-se que o exercício físico por tempo prolongado, em alta intensidade, como no caso do treinamento em esteira, provoca danos oxidativos (Diniz, 2000) podendo esta ser uma das explicações.

A atividade física promove alterações metabólicas adaptativas ao exercício, proporcionando uma utilização mais eficiente dos nutrientes e melhor desempenho no treinamento exaustivo, quando comparado com o grupo sem treinamento. Estes dados são mostrados na **Figura 2**.



SM =Sedentário e morto

TEM = Treinado exausto e morto

SEM =Sedentário exausto e morto

TER/24 = Treinado exausto e morto após 24 horas

TM = Treinado e morto

TER/48 = Treinado exausto e morto após 48 horas

Figura 2. Tempo médio de exaustão de ratos (10 por cada grupo) alimentados com soro de leite bovino e submetidos a exercício físico.

Como podemos observar no **Figura 2** os grupos treinados (**TEM, TER/24 e TER/48**) chegaram à exaustão quase no dobro de tempo (79 ± 16 minutos) que os animais que nunca foram exercitados (42 ± 14 minutos). Os tempos médios de exaustão deste ensaio foram consideravelmente inferiores aos encontrados no experimento do capítulo 2, o que parece dificultar a interpretação dos resultados da recuperação. Entretanto foi observado que o tempo médio de exaustão do animal mais velho (neste ensaio os ratos estavam com 18 semanas ($\pm 327g$)) é menor do que o do animal jovem (ensaio do capítulo 2 os ratos se encontravam com 11 semanas ($\pm 239g$)). No experimento de Tassi *et al.* (1998) os animais utilizados eram da mesma idade dos usados no experimento do capítulo 2 deste trabalho, sendo que a média dos tempos de exaustão foram equivalentes (152 ± 8 contra 156 ± 18 minutos respectivamente).

Para animais de 22 semanas Oliveira *et al.* (2003) relataram tempo médio de exaustão de 39 ± 6 minutos para uma dieta controle de manutenção.

Determinações teciduais

Foi determinada a concentração de glicogênio hepático, muscular (gastrocnêmio) e do miocárdio, a partir de amostras de tecidos de animais submetidos a exercício físicos e sedentários, alimentados com hidrolisado de soro de leite, com a finalidade de avaliar o efeito da dieta de grau de hidrólise médio na capacidade recuperação de animais fisicamente exauridos. Os valores médios (10 animais por grupo) das concentrações de glicogênio hepático, muscular e do miocárdio são mostrados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Concentrações médias e desvios-padrão de glicogênio hepático, muscular e do miocárdio em ratos alimentados com HSL e submetidos a exercício físico.

Determinações mg/100mg	Sedentários		Treinados		Exaustos com recuperação	
	Morto	Exausto	Morto	Exausto	24 horas	48 horas
	SM	SEM	TM	TEM	TER/24	TER/48
Glicogênio hepático	1,91 ^a ±0,28	0,26 ^d ±0,13	1,92 ^a ±0,34	0,51 ^{ad} ±0,19	0,68 ^c ±0,29	1,39 ^b ±0,33
Glicogênio muscular	0,21 ^{ab} ±0,05	0,13 ^c ±0,04	0,21 ^{ab} ±0,05	0,14 ^c ±0,04	0,17 ^{bc} ±0,03	0,23 ^a ±0,05
Glicogênio miocárdio	0,04 ^b ±0,01	0,18 ^a ±0,03	0,05 ^b ±0,01	0,18 ^a ±0,05	0,05 ^b ±0,01	0,06 ^b ±0,02

*Os grupos com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas entre si; avaliadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$). As médias apresentadas são de 10 ratos por grupo. Esta observação é valida para todos os resultados.

Glicogênio hepático (GH)

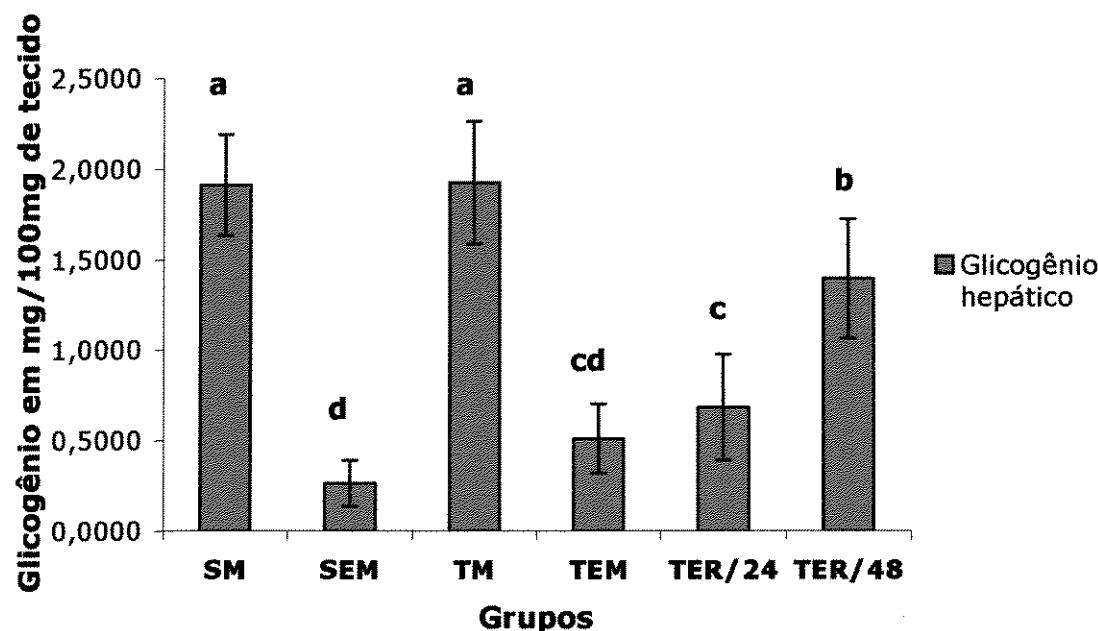
Primeiramente foi observado que os grupos que não foram levados até exaustão (**SM** e **TM**) apresentaram a maior concentração de glicogênio hepático (GH) de todos os grupos, do mesmo modo é possível que **SM** e **TM** não apresentaram diferenças significativas entre eles, independentemente da atividade física. Neste caso podemos dizer que o exercício não influenciou a concentração de glicogênio, mas esses grupos apresentaram diferenças significativas consideravelmente com os outros grupos.

Também como era esperado, foi observada uma notável diferença entre os grupos **SM** e **SEM**, mostrando que os animais levados até exaustão apresentaram a menor concentração de GH de todo os grupos, chegando quase à depleção total. Talvez isto seja devido ao fato que o grupo **SEM** não

teve nenhum tipo de atividade física antes da exaustão, o que pode significar que o grupo **SEM** esgotou inclusive sua reserva de GH devido ao grande esforço que este grupo realizou de uma só vez.

Um comportamento muito similar foi observado entre os grupos **TM** e **TEM**, uma vez que ao comparar com os grupos **SEM** e **TEM** foram observadas distinções, numéricas embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas. Este fenômeno era esperado, pois é bem sabido que o GH é esgotado quando se realiza uma atividade física extrema.

Uma observação interessante que merece destaque refere-se à recuperação do GH nos grupos **TER/24** e **TER/48** com respeito ao grupo **TEM**, onde observou-se que a recuperação foi paulatina e que ao cabo das 48 horas o GH alcançou o nível de normalidade (**Figura 3**).



SM =Sedentário e morto

TEM = Treinado exausto e morto

SEM =Sedentário exausto e morto

TER/24 = Treinado exausto e morto após 24 horas

TM = Treinado e morto

TER/48 = Treinado exausto e morto após 48 horas

Figura 3. Efeito do hidrolisado de soro láctico bovino no glicogênio hepático de ratos submetidos a exercício físico.

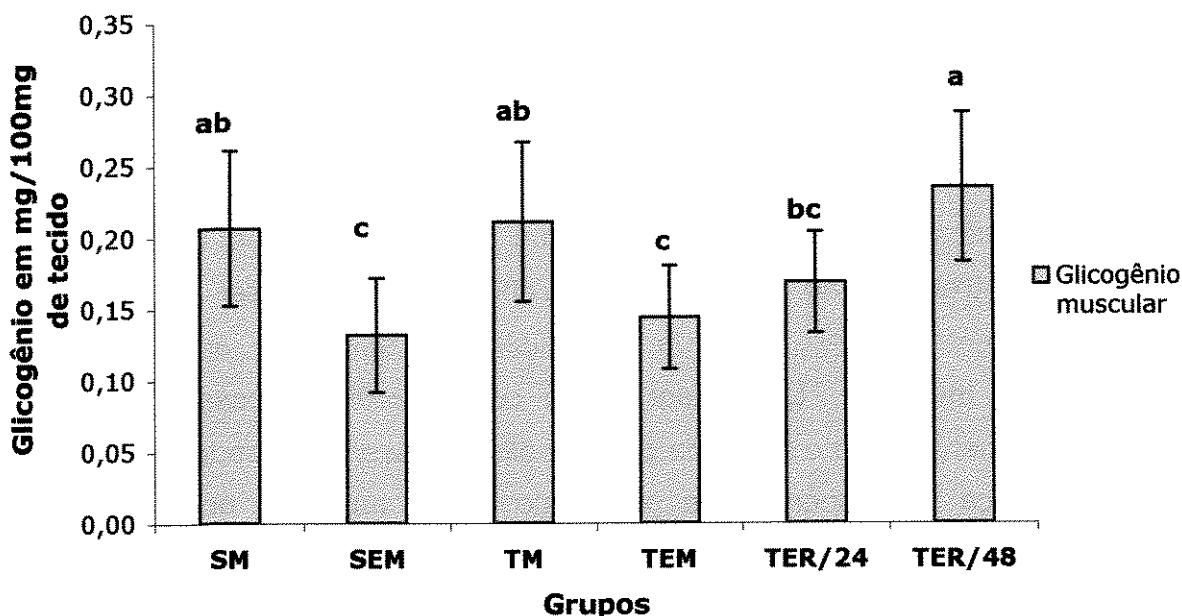
Glicogênio muscular (GM)

Verifica-se na **Tabela 3** e a **Figura 4** que o glicogênio muscular (GM) teve de forma geral um comportamento muito parecido ao glicogênio hepático, mostrando que os grupos **SM** e **TM** não apresentaram diferenças significativas entre eles, independentemente da atividade física realizada. Também foi observado que esses grupos apresentaram quase o mesmo valor de concentração de glicogênio muscular que o grupo **TER/48**, o que nos leva a suposição de que o glicogênio muscular poderia ter sido restaurado quase completamente ao cabo das 48 horas.

Do mesmo modo podemos dizer que os grupos **SEM** e **TEM** não apresentam diferenças significativas entre si, além de apresentar as menores concentrações de GM. Tal situação era esperada pelo fato de terem sido submetidos à atividade exaustiva. Sabe-se que tanto os estoques de glicogênio muscular como o hepático tendem a diminuir logo após o exercício físico estremo e que são necessárias normalmente 48 horas para que a reserva volte à normalidade (Mazepa *et al.*, 2000). Chama a atenção o fato de não existirem diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos, tendo em vista que um recebeu treinamento e o outro não. Isto permite concluir mais uma vez que o treinamento não influenciou a taxa de depleção do GM, sendo apenas a exaustão o fator determinante.

Comparando-se os resultados obtidos para os grupos **SM** com **SEM** e **TM** com **TEM**, é possível observar que entre cada par existe uma diferença significativa considerável, a qual era esperada.

A depleção de glicogênio depende da intensidade e duração do exercício imposto. Azavedo (1994) estudo os parâmetros bioquímicos em ratos em atividade física, tendo como controle animais sedentários. Seu estudo indicou que o treinamento físico possui a capacidade de promover alterações metabólicas, levando à economia desse substrato energético. Por outra parte é importante realçar que a recuperação completa de glicogênio foi obtida após 48 horas da exaustão, a recuperação é feita gradualmente como se pode observar na **Figura 4**.



SM = Sedentário e morto

TEM = Treinado exausto e morto

SEM = Sedentário exausto e morto

TER/24 = Treinado exausto e morto após 24 horas

TM = Treinado e morto

TER/48 = Treinado exausto e morto após 48 horas

Figura 4. Médias e desvio-padrão da concentração de glicogênio muscular (gastrocnêmio) de ratos (10 por grupo) alimentados com hidrolisado de soro do leite e submetidos a exercício físico.

Glicogênio do miocárdio

Na **Tabela 3** e **Figura 5** podem ser observadas as concentrações do glicogênio do miocárdio de todos os grupos alimentados com o proteolisado. Foi registrada uma concentração substancialmente maior de glicogênio no miocárdio do animal logo após o final da exaustão (**SEM** e **TEM**), a qual parece retornar ao nível normal antes de transcorridas as primeiras 24h. Isto significa que, para a mesma dieta, o treinamento não teve influência no nível final de glicogênio. Pelo fato de não possuirmos grupos controle consumindo dieta com o Isolado, não é possível se afirmar exatamente se o hidrolisado seria responsável pelo aparente aumento de concentração registrado com o

exercício exaustivo. Entretanto, fazendo uma comparação com o Experimento I, pode se observar que o consumo do hidrolisado deve ter sido o responsável direto por tal aumento. Na **Figura 6** do Capítulo II, tendo sido os animais exauridos (**HE** e **IE**) sacrificados 48h após a exaustão, observa-se que não houve diferença significativa entre as dietas, embora o treinamento tenha deixado uma diferença com relação aos animais sedentários.

O significado do aumento no estoque de glicogênio não é claro neste momento. Entretanto, ao menos duas possibilidades podem ser consideradas para o aumento do estoque. Uma possibilidade surge ao admitir que o metabolismo muscular, tanto esquelético como cardíaco, possa facilitar a geração de energia sem o apoio da glicogenólise. Nesse caso, pode ter ocorrido uma poupança no dispêndio de glicogênio e um aumento no estoque. A segunda possibilidade teria a ver com o eventual aumento de atividade da glicogênio sintase.

Em apoio da primeira hipótese, Depre e Hue (1997), num estudo de inibição da glicogenólise no miocárdio do rato por um análogo da glicose, sugerem que a degradação excessiva de glicogênio no coração iria aumentar a taxa de lactato e prótons, podendo retardar a recuperação isquêmica, ou seja aumentando o risco de dano ao tecido. Esses autores relatam que a função do estoque de glicogênio não está completamente esclarecida, pois outra corrente de pesquisadores ainda defende uma função protetora do glicogênio. De toda forma, os elevados estoques de glicogênio gerados pela dieta com o proteolizado durante o exercício exaustivo foram reduzidos os níveis considerados normais.

Já para a segunda hipótese, não foram encontradas quaisquer referências na literatura.

É interessante realçar o fato que existe uma diferença significativa marcante entre os pares de grupos **SM x SEM** e **TM x TEM** onde os grupos exauridos (**SEM** e **TEM**) apresentaram a maior concentração de GC, quase 4 vezes mais do que os não exauridos (**SM** e **TM**). Outra observação que pode se feita é a de que os grupos **TM**, **TER/24** e **TER/48** mostraram médias

semelhantes, sugerindo que a restauração dos níveis normais ocorre dentro o período inicial de recuperação ou seja, antes das primeiras 24h.

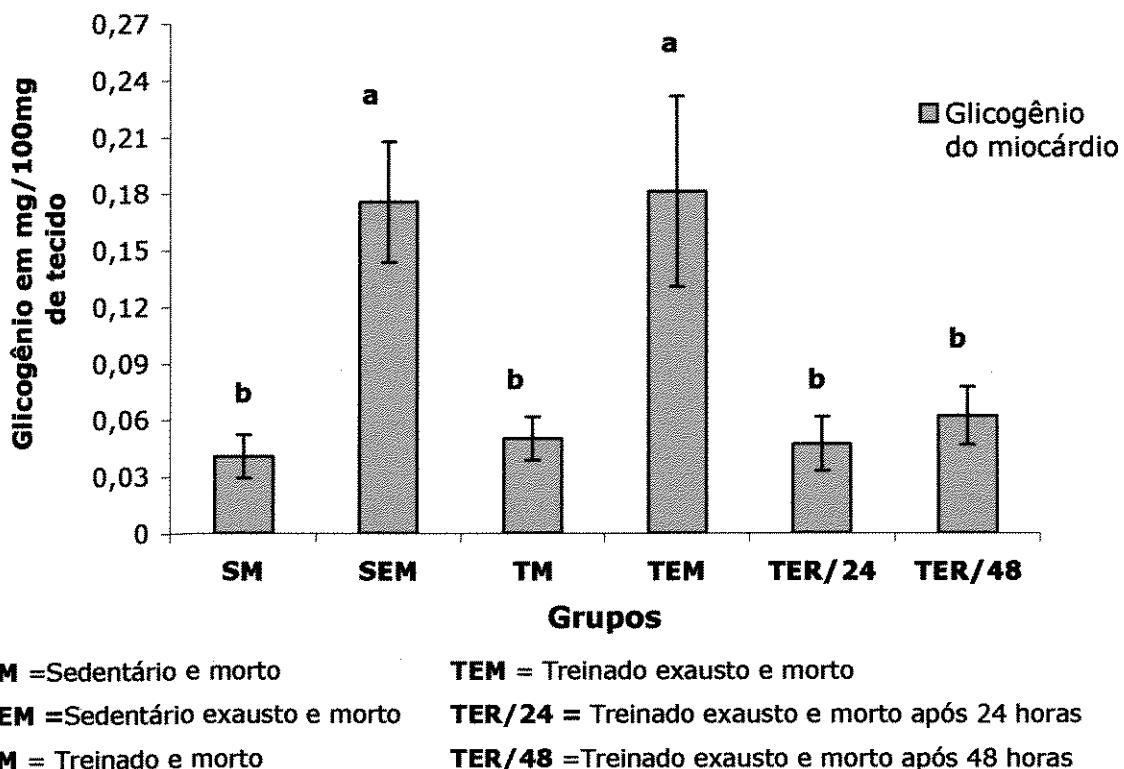


Figura 5. Concentrações médias e desvio-padrão do glicogênio do miocárdio nos diferentes grupos de ratos alimentados com hidrolisado de soro de leite e submetidos a exercício físico.

Determinações plasmáticas

A **Tabela 4** mostra as médias e Desvio padrão das concentrações finais de lactato, glicose, insulina, ácidos graxos, triglicerídeos e colesterol determinados no plasma sanguíneo de ratos alimentados com hidrolisado de soro de leite e submetidos a exercício físico.

Tabela 4. Parâmetros plasmáticos determinados no plasma sanguíneo (lactato, glicose, insulina, ác. graxos, triglicerídeos e colesterol) dos diferentes grupos de ratos (10 por grupo) submetidos ao exercício físico e alimentados com e HSL.

Determinações	TRATAMENTO FÍSICO					
	Sedentários		Treinados			
					Exaustos com recuperação	
	Morto	Exausto	Morto	Exausto	24 horas	48 horas
	SM	SEM	TM	TEM	TER/24	TER/48
Lactato (nmol/L)	1,99 ^b ±0,44	6,18 ^a ±0,55	2,52 ^b ±0,35	5,68 ^a ±0,28	5,84 ^a ±0,68	5,95 ^a ±0,33
Glicose mg/100mL	117,83 ^a ±17,68	118,05 ^a ±15,70	107,30 ^a ±17,26	118,52 ^a ±17,68	104,93 ^a ±15,71	116,62 ^a ±13,27
Insulina ng/mL	3,65 ^a ±0,84	3,12 ^a ±0,64	3,50 ^a ±0,87	4,00 ^a ±1,19	4,22 ^a ±0,69	3,83 ^a ±0,81
Ác. Graxos (mmol/L)	0,76 ^b ±0,15	0,96 ^a ±0,18	0,65 ^b ±0,15	0,57 ^{bc} ±0,10	0,43 ^c ±0,09	0,63 ^b ±0,19
TGL (mg/dL)	103,59 ^a ±11,89	100,60 ^a ±11,42	102,7 ^a ±13,09	64,63 ^c ±7,35	78,72 ^{bc} ±11,44	84,49 ^b ±9,90
Colesterol (mg/dL)	30,97 ^a ±7,61	33,92 ^a ±7,97	36,08 ^a ±8,42	36,80 ^a ±9,34	39,76 ^a ±7,84	34,76 ^a ±8,49

SM =Sedentário e morto

TEM = Treinado exausto e morto

SEM =Sedentário exausto e morto

TER/24 = Treinado exausto e morto após 24 horas

TM = Treinado e morto

TER/48 =Treinado exausto e morto após 48 horas

*Os grupos com mesmas letras não apresentam diferenças significativas entre si; avaliadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$). As médias apresentadas são de 10 ratos por grupo. Esta observação é valida para todos os resultados.

Lactato

Na **Tabela 4** podemos observar que as concentrações de lactato, dos grupos que foram levados até exaustão (**SEM**, **TEM**, **TER/24** e **TER/48**) apresentaram valores superiores, que aos que não foram submetidos ao teste (**SM**, **TM**) conforme esperado, medição foi feita logo após do treinamento exaustivo.

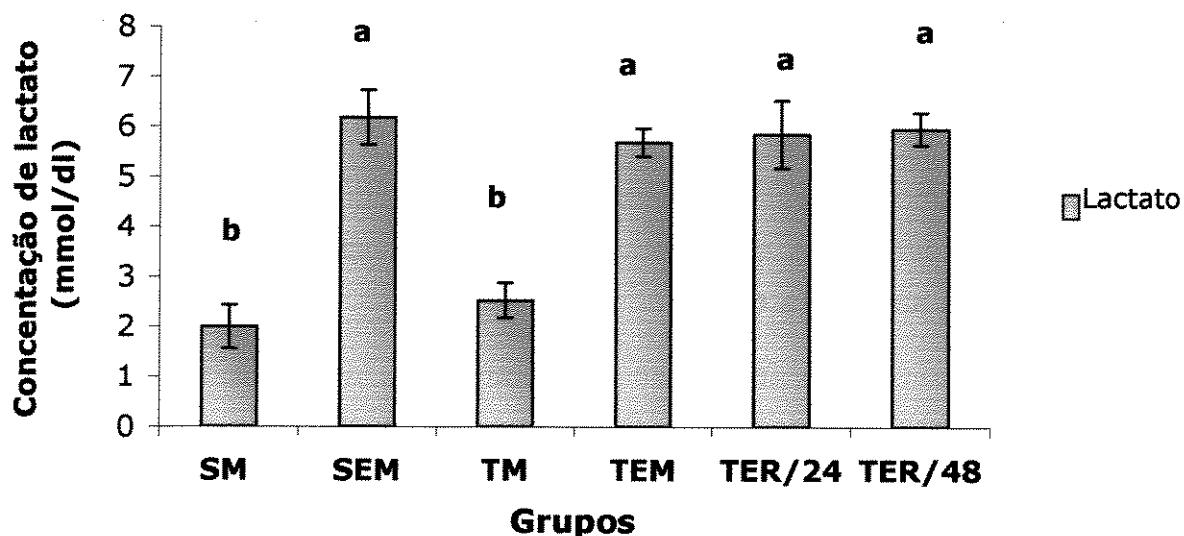
Os grupos que tiveram uma atividade exaustiva não apresentaram diferenças significativas entre eles, pode-se observar que o grupo **SEM**

apresentou a maior média de concentração de lactato, sendo este grupo menos capaz de remanejar o lactato sanguíneo, em comparação com aqueles grupos submetidos à atividade física.

Do mesmo modo foi observado que os grupos **SM** e **TM**, não apresentaram diferenças significativas entre eles, estas observações podem ser observadas na **Figura 6**.

Esta medição foi feita com o objetivo de indicar a intensidade de exercício imposta aos animais, comprovou que a atividade física realizada pelos mesmos foi adequada, e capaz de produzir alterações metabólicas quando falamos da utilização de substratos energéticos.

Azevedo (1994) e Tassi (1996), assim como no estudo atual, verificou-se que os dados de lactato sanguíneo eram sempre mais elevados nos ratos sedentários, após o teste exaustivo. Tal fato sugere que o treinamento prolongado seja capaz de diminuir o acúmulo de ácido láctico, permitindo que ratos treinados demorem mais tempo para atingir a exaustão.



SM =Sedentário e morto

TEM = Treinado exausto e morto

SEM =Sedentário exausto e morto

TER/24 = Treinado exausto e morto após 24 horas

TM = Treinado e morto

TER/48 =Treinado exausto e morto após 48horas

Figura 6. Concentrações médias e desvios-padrão de lactato sanguíneo dos diferentes grupos de ratos (10 por grupo) alimentados com hidrolisado de soro de leite e submetidos a exercício físico.

Glicose sérica

Na **Tabela 4** podemos observar que não existem diferenças significativas na concentração de glicose entre os diferentes grupos. Também podemos observar que os grupos **SM**, **SEM**, **TEM** e **TER/48** apresentam quase a mesma concentração de glicose, por outro lado o gráfico mostra que o grupo **TER/24** teve a menor concentração de glicose sangüínea, independente do tempo transcorrido após a exaustão (0, 24 e 48h), com uma $p(<0,05)$. Podemos observar também que os grupos sedentários terminaram o teste de exaustão com os níveis de glicose quase iguais que os animais treinados, podemos dizer que tanto a dieta experimental (**HSL**), com a atividade física realizada não teve influencia na concentração de glicose.

Resultados similares foram encontrados por Ramos (2001) nesse estudo a dieta tinha um grau de hidrólise alto, e foi subministrado para ratos em

atividade física, o valor de glicose foram um pouco maiores aos nossos, mas ele também não achou diferenças significativas entre os diferentes grupos.

Ácidos graxos

Na **Tabela 4** e **Figura 7** podemos observar que os grupos sedentários (**SM** e **SEM**) apresentaram as maiores concentrações de ácidos graxos entre todos os grupos, o grupo **SEM** apresentou a concentração mais elevada de AGL, além de apresentar diferenças significativas com relação ao grupo **SM** e ao resto dos grupos.

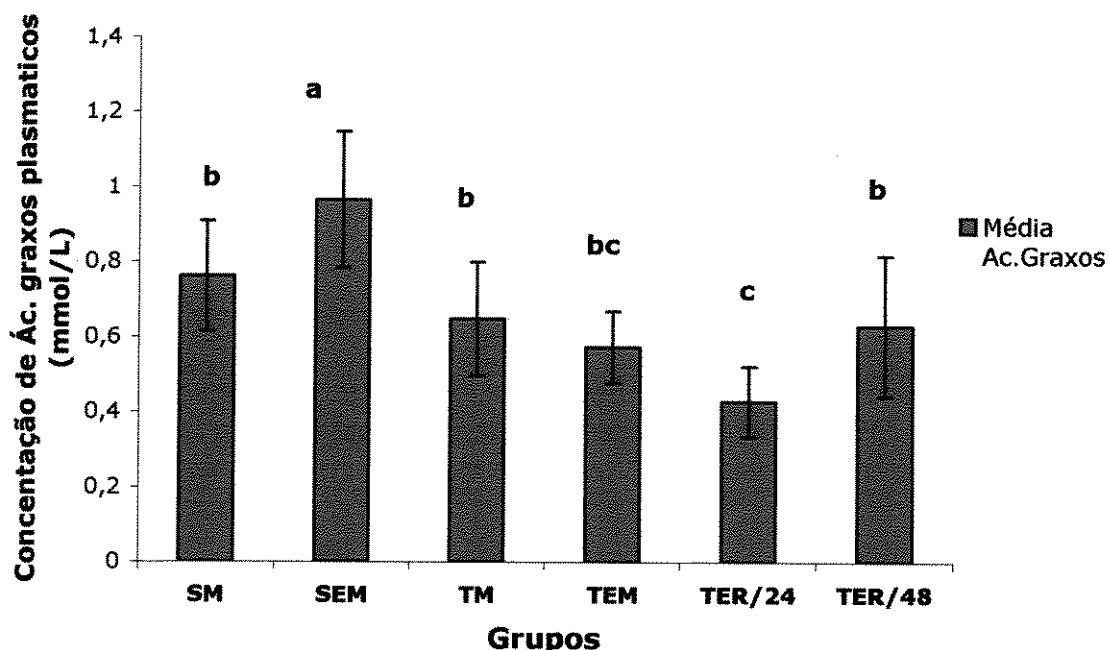
Também foi observado que os grupos **SM**, **TM**, **TEM** e **TER/48** não apresentam diferenças estatísticas entre eles, embora apresentem valores diferentes da concentração de AGL. Por outro lado foi observado que o grupo **TER/24** apresentou a menor concentração de AGL, além de apresentar diferenças significativas com todos os grupos exceto com o grupo **TEM**.

Outra observação é o fato de que existe uma diminuição gradual na concentração de AG nos grupos **TM**, **TER** e **TER/24** respectivamente, para logo aumentar essa concentração a quase o mesmo valor que o grupo **TM**, mostrando que depois de 48 horas da exaustão, os níveis de ácidos graxos são quase recuperados completamente, o que quer dizer que a dieta experimental teve certa influência na recuperação deste parâmetro.

A presente pesquisa mostrou resultado similar do achado por Tassi (1996) no sentido de que os grupos sedentários apresentaram maiores concentrações de AGL que os treinados. Cabe esclarecer que nesse estudo nem a dieta nem o nível de atividade física influíram significativamente nos níveis plasmáticos de AGL, ressaltando a diferença de chegada à exaustão.

Uma vez que os AGL são utilizados como os principais combustíveis em atividades físicas prolongadas, a concentração plasmática de AGL aumenta, diminui a utilização do glicogênio, enquanto que o declínio de AGL, conduz à depleção do glicogênio, sendo esta uma das principais causas da exaustão (Costill *et al.*, 1977). É sabido que o fornecimento de uma fonte lipídica a ratos

submetidos ao exercício exaustivo, produz o adiamento do ponto de exaustão devido ao deslocamento do metabolismo para o dispêndio seletivo de lípides, com consequente poupança do glicogênio muscular e hepático (Hickson et al., 1977). Talvez seja esta a explicação, do porque o grupo **TER/24** na **Figura 2** (tempo de exaustão) alcançou a exaustão em um tempo menor que os outros



grupos treinados.

SM =Sedentário e morto

TEM = Treinado exausto e morto

SEM =Sedentário exausto e morto

TER/24 = Treinado exausto e morto após 24 horas

TM = Treinado e morto.

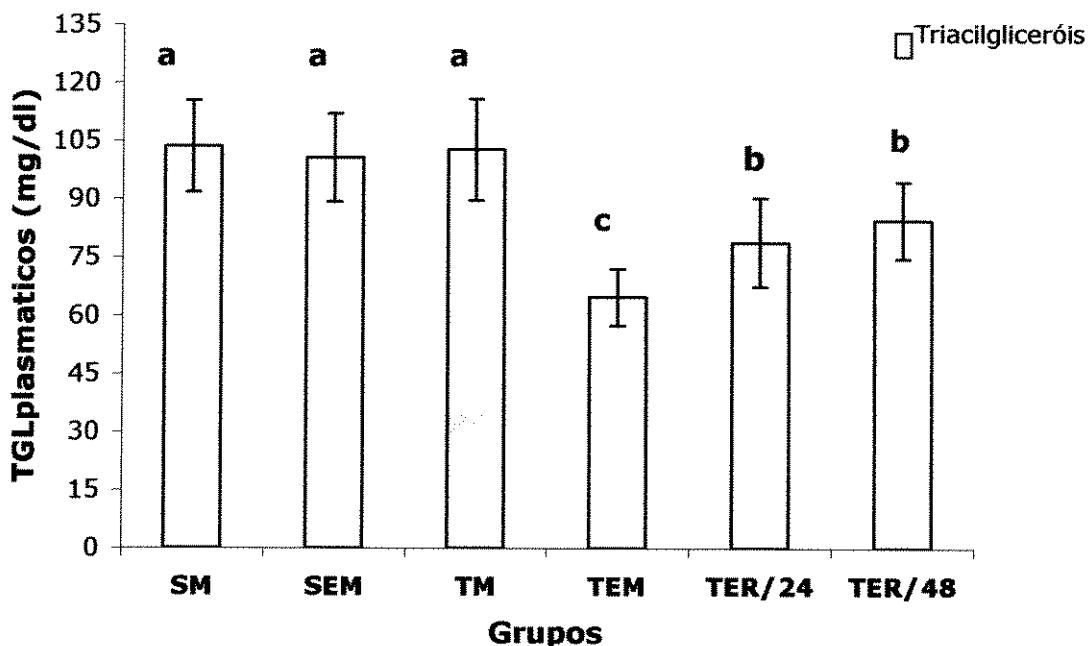
TER/48 =Treinado exausto e morto após 48 horas.

Figura 7. Concentrações médias e desvios-padrão de ácidos graxos medidos no plasma de ratos alimentados com hidrolisado de soro de leite e submetidos a exercício físico.

Triacilgliceróis (TGL)

Com respeito à concentração de TGL, podemos observar na **Tabela 6** que os grupos sedentários (**SM** e **SEM**) não apresentaram diferenças significativas entre eles, outra observação é o fato de que o grupo **TM** não apresentou diferenças estatísticas como nos grupos sedentários, mostrando nesse caso que a atividade física não teve influência na concentração de TGL. Foi observado que o grupo **TEM** apresentou a menor concentração de TGL, além de apresentar diferenças significativas com todos os grupos exceto com o grupo **TER/24**. Também podemos dizer que não houve diferenças significativas entre os grupos **TER/24** e **TER/48**.

Para finalizar podemos observar que houve uma recuperação gradativa, mas não completa das reservas de TGL, confirmando mais uma vez que a dieta com o Hidrolisado de soro de leite teve certa influência na recuperação dos diferentes parâmetros analisados em ratos submetidos a exercício físico exaustivo, isto se pode observar na **Figura 8**.



SM =Sedentário e morto

SEM =Sedentário exausto e morto

TM = Treinado e morto.

TEM = Treinado exausto e morto

TER/24 = Treinado exausto e morto após 24 horas

TER/48 =Treinado exausto e morto após 48 horas.

Figura 8 Concentrações médias e desvios padrão de triacilgliceróis medidos no plasma de ratos alimentados com hidrolisado de soro de leite e submetidos a exercício físico.

Colesterol

A **Tabela 4** também apresenta a concentração de colesterol de ratos alimentados com hidrolisado de soro de leite e submetidos à atividade física exaustiva. Podemos observar que a concentração de colesterol não apresentou diferenças significativas em nenhum dos grupos, além de revelar valores praticamente iguais.

Também podemos observar que os valores dos desvios-padrão são reduzidos, o que nos leva a concluir que a dispersão dos dados foi pequena.

Dados similares foram encontrados em outros estudos Ramos (2001) ele utilizou hidrolisado de soro de leite com grau de hidrólise alto, nesse estudo a concentração de colesterol não apresentou diferenças significativas.

5. CONCLUSÕES

Nossos resultados nos permitiram concluir que:

1. O uso da proteína hidrolisada mostrou que a atividade física desenvolvida pelos animais foi coerente com a observada no experimento do capítulo 1 e capaz de produzir alterações metabólicas referentes à utilização de substratos energéticos.
2. As concentrações de lactato sanguíneo, medidas logo após o treinamento exaustivo, mostraram claramente o efeito da atividade intensa no metabolismo do animal. O lactato dos ratos não submetidos a exaustão foi sempre inferior ao dos animais exaustos.
3. A exaustão não implicou na instalação de um estado de glicemias anômalas.
4. A recuperação dos estoques de glicogênio hepático ocorreu gradativamente, apesar de não ter alcançado os níveis originais no prazo de 48h.
5. A recuperação de glicogênio muscular se efetua também de forma gradual, contudo alcançando níveis normais no período de 48h. O treinamento não influencia significativamente a magnitude do estoque.
6. O glicogênio do miocárdio mostrou um acúmulo significativo (~400%) no final da exaustão, sendo que os níveis originais foram alcançados já nas primeiras 24h pós-exaustão.
7. As concentrações de insulina e colesterol séricos foram considerados sem alteração nos estágios de pré e pós-exaustão.
8. As concentrações de triaciilgliceróis diminuíram de forma significativa e expressiva com a exaustão, havendo uma posterior recuperação, contudo significado desta variável ainda não é claro.
9. Durante a recuperação dos animais exaustos os níveis de ácidos graxos livres não sofrem alteração.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABELL, L.L; LEVY, B.B; BRODIE, B.B.; KENDALL, F.E. **Journal Biological Chemistry** 195:357 (1952).

AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS-Official Methods of the association of the Official Analytical Chemists, 15th Ed., Washington DC, 1141p, 1990.

AZEVEDO J.R.M. **Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados, durante e após o exercício agudo de natação** Campinas 1994 172p Dissertação (Doutor em fisiologia)- Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

BLIGH EC.;DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, 37:911-917, 1959.

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, vol.43, p. 695-699, 1977.

DEPRE C ; HUE L. Inhibition of glycogenolysis by a glucose analogue in the working rat heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 29: 2253 – 2259, 1997.

DINIZ DB.,**Parâmetros comportamentais e estresse oxidativo em cérebro de ratos submetidos a tratamento crônico de restrição energética ou suplementação com vitamina E** Campinas, 2000. 139p. Dissertação (Doutorado em Ciências da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia de Alimentos.

DOLE V.P.; MEINERTZ H. Micro determination of long chain fatty acids in plasma and tissues, **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, vol.235, No. 9, p 241-246, 1960.

DUNCOMBE W.G. Colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma, **Clinical Chemicals Acta**, Amsterdam, vol.29, 567 p., 1964.

ELPHICK M.D. Modified colorimetric ultramicro method for estimating NEFA in serum, **Journal of Clinical Pathology**, [s.I.], vol.21, 567p, 1968.

FELL, J.W.; RAYFIELD, J.M.; GULBIN, J.P.; GAFFNEY, P.T. Evaluation of the Accusport® Lactate analyzer. **Int. J. Sports Medicine**. 19: 199-204, 1998.

HENRY R.J. **Clinical Chemistry Principles and Techniques**, 2^a ed. Hargeston: Harper ; Row, 1974.

- HICKSON, R.C.; RENNIE, M.J.; CONLEE, R.K.; WINDER, W.W.; HOLLOSZY, J.O. Effects of increased plasma fatty acids on glycogen utilization and endurance. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.43, n.5, p.829-833, 1977.
- HORWITZ W. ed **Official Methods of Analysis**, 12 ed. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1094p, 1975.
- JACOBS, N.J.; VAN DENMARK, P.J. **Aarch. Biochemistry Biophysical** 88, p. 250-255, 1960.
- LEMON, P. W. R. Effect of exercise on protein requirements. **Journal of Sports Sciences**, 9: 53-70, 1991.
- LO S.L, RUSSELL J.C, TAYLOR A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology**, 28(2): 234-236, 1970.
- MAZEPA, R.C.; CUEVAS, M. J.; COLLADO, P.S.; GALLEGOS, J.G. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in no exercised and exercised rats **Life Science**. 66 (2): 153-160. 2000.
- OLIVEIRA, S.L; DINIZ, D.B.; AMAYA-FARFAN, J. Carbohydrate-energy restriction may protect the rat brain against oxidative damage and improve physical performance. **British Journal of Nutrition** 89, p. 89-96, 2003.
- PELLET P.L.; YOUNG V.R. **Nutritional evaluation of protein foods**, Tokyo: The United Nations University, 154p, 1980.
- PIMENTA, F.M.V. **Efeito do consumo do hidrolisado das proteínas do soro lácteo no desempenho físico e no metabolismo protéico do rato exercitado**. Campinas, 2003.106p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição)-Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- RAMOS, A.G. **Utilização das proteínas do soro lácteo por ratos jovens**. Campinas, 2001. 83p Dissertação (Mestrado em ciências da nutrição)-Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, FH.; FAHEY, GC. JR.. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**. 1993: 123: 1939-51.
- SILVESTRE, M. P. C. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates, **Food Chemistry**, Vol. 60. No. 2 pp 263-271 1997.
- 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 79p. Dissertação (Mestrado em ciência da nutrição)-UNICAMP, FEA.

TASSI, E M. M.. AMAYA-FARFAN, J. AZEVEDO R. Hydrolyzed α -lactalbumin as a source of protein to the exercising. **Nutrition Research**, 18(3): 875-881, 1998.

TIPTON, KD.; FERRANDO, AA.; PHILLIPS, SM. JR.; DOYLE, D.; WOLFE, RR. Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. **American Journal of Physiology**, 276(39): E628-E634, 1999.

ZOPPI CC. **Adaptações induzidas pelo treinamento físico no metabolismo oxidativo e sistema de defesa antioxidante em músculo e sangue de rato e sua correlação com os níveis de lesão muscular.** Campinas, 1999. 83p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

*Referências seguindo as normas da NBR 6023/2002.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Procedimento utilizado na determinação do grau de hidrólise da proteína hidrolisada comercialmente, oferecida pela NZMP™. (Adler-Niesen, 1979).

Reagentes:

HCl 0,1N.

Ácido trinitrobenzenosulfônico diidratado p.a. (0,1%) **TNBS**

Dodecil sulfato de sódio p.a.(1%) **SDS**

Padrão Luecina ($1,500 \times 10^{-3}$ M de L-leucina, Merck)

Tampão fosfato 0,2125M

Condições durante a reação:

Concentração do tampão=0,10M

Concentração do TNBS= $1,43 \times 10^{-3}$ M

pH=8,2

Temperatura=50°C

pH após adição de HCl (0,1N)=3,7-3,9

Reação:

- Misturar em tubo de ensaio 0,250mL de amostra contendo entre $0,25 \times 10^{-3}$ e 25×10^{-3} amino equiv/L a 2mL de tampão fosfato a pH 8,2.
- Adicionar 2mL de solução TNBS 0,10% e agitar. Manter o tubo envolvido com papel alumino para evitar exposição a luz.
- Colocar em banho Maria a 50°C por 60 minutos
- Acrescentar 4mL de HCl 0,1N.
- Resfriar em temperatura ambiente por 30 minutos.
- Leitura a 340nm, utilizando água como branco.

ANEXO 2

Procedimento utilizado para a determinação de glicogênio dos diferentes órgãos (Lo et al., 1970).

Reagentes:

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

Álcool etílico 95%

Solução de fenol 5%. Cristais de fenol (250g, Mallincrodt 9928, grua reagente) dissolvidos em água destilada até completar 5 litros.

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

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

Procedimento

Em primeiro lugar foram escolhidos os tecidos desejados do biofreezeer, onde estavam armazenados. As amostras escolhidas foram colocadas em um isopor que continha gelo para manutenção das mesmas.

1. Pesando-se aproximadamente 35 – 50 mg de tecido em um prato de pesagem, procurando no possível tirar toda a gordura, tecido conectivo e sangue que ela possa conter com pinças e tesouras cirúrgicas, as amostras foram pesadas em uma balança de torção de precisão (Roller- Smith).
2. A amostra pesada foi colocada em um tubo que continha $\frac{1}{2}$ mL de KOH a 30% saturado com Na_2SO_4 , tendo o cuidado de que o tecido este completamente imerso na solução. Os tubos foram mantidos no gelo até que todos os tubos pesados preenchidos.

3. Os tubos foram fechados com tampas e colocados em banho quente com água fervente de 30 a 60 min, até a digestão completa do tecido, obtendo uma solução homogênea.
4. Os tubos foram removidos do banho e resfriados em gelo.
5. Adicionaram-se 0,6 mL da solução de etanol 95% para precipitar o glicogênio do digerido alcalino.
6. Os tubos com as amostras ficaram no gelo por 30 minutos, após de esse tempo, foram centrifugados a 840X g/20 a 30 min. Logo após da centrifugação foi aspirado cuidadosamente os sobrenadantes.
7. Os precipitados de glicogênio foram dissolvidos em 3mL de água destilada.
8. Uma vez dissolvido o precipitado colocou-se 1mL da solução obtida em um tubo de ensaio de 150x20mm.
9. Foi adicionado 0,5 mL da solução de fenol 5% e rapidamente foi adicionado pelas paredes do tubo 2,5 mL de ácido sulfúrico 96-98%, isto para garantir a mistura, deixando em repouso por uns 10 min.
10. Após o repouso os tubos foram agitados e colocados em banho maria a uma temperatura de 25-30°C, antes de realizar as leituras.
11. Também foi preparado um branco como controle, se utilizou 1mL de água destilada em lugar da solução de glicogênio.
12. As leituras de absorbância foram feitas num espectrofotômetro Beckman DU-70 a 490nm.

Todos os teste foram feitos em duplicatas.

ANEXO 3

Determinação de glicose sérica pelo método cinético-UV (Henry, 1974).

DEFINIÇÃO

O teste é feito para identificar a enzima AST anteriomamente chamada de Transaminase Glutâmico Oxalacetática encontrada no coração, fígado, músculo esquelético, rins e pâncreas. O teste é usado primariamente para identificar danos ao coração ou fígado e é usado em conjunto com CK, LD e ALT, na diagnose de problemas específicos.

FISIOPATOLOGIA

Os níveis de AST começam a se elevar 6 a 10 horas após o infarto do miocárdio, com pico entre 24 e 48 horas, retornando ao normal entre 4 e 7 dias.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Valores elevados - Infarto agudo do miocárdio, câncer do fígado, cirrose, hepatite, pancreatite aguda, angina pectoris severa, exercício físico.
Valores baixos - Gravidez, barbitúricos, cetoacidose diabética.

INTERFERÊNCIAS

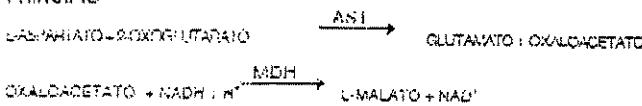
Falsos valores elevados - Acetaminofen, Arfotericina B, Alopurinol, Anticongestivos orais, Metildopa, Fenotiazinas, Colchicina, Narcóticos, Cumaricosideróides, Barbitúricos.

Falsos valores baixos - Salicílicos (aspirina)

MÉTODO

Teste UV minimizado de acordo com IFCC (Federação Internacional de Química Clínica).

PRINCÍPIO



LINEARIDADE E ESTABILIDADE DA REAÇÃO

A reação é linear até $A_{340} = 0.200$ a 340 nm. Para valores superiores repetir a reação com amostra diluída em solução fisiológica 1:5 ou 1:10, multiplicando o resultado final por 5 ou 10 respectivamente.

COMPOSIÇÃO DO KIT

Reagente Líquido CAT N° 08501
 5 x 20 mL. Pronto para uso

Reagente Enzimático CAT N° 08502

1 x 20 mL. Pronto para uso

Composição do mono-reagente:

TBS, pH 7,8	60 mmol/L
L-Aspartato	240 mmol/L
LDH	> 1200 U/L
MDH	> 600 U/L
2-Oxoglutarato	12 mmol/L
NADH	0,18 mmol/L

MATERIAL NÃO FORNECIDO (NECESSÁRIO):

Espetômetro com:

Sensibilidade a 340 nm ± 0,001 A

Dzida de passagem: < 10nm

Luz estreita a 0,6%

Expressão da cubeta: < 1,00 cm

Temperatura termostatizada entre ± 0,2°C.

Micropipetas e pipetas com e capacidade indicada na técnica.

Banho-maria com a temperatura indicada na técnica.

Cronômetro.

VIDA ÚTIL E ARMAZENAMENTO

O kit é estavel ate a data de seu vencimento impressa na caixa, quando manido refrigerado.

O Reagente único de Trabalho (mono-reagente) é estável, após sua preparação, por 2 semanas refrigerado.

PRECAUÇÕES

O kit não contém derivados do sarsog humano, porém, considerar qualquer amostra de paciente como potencialmente infectante. Evitar o contato direto com as amostras.

Não pipetar reagentes ou amostras com a boca.

Descartar as sobras das reações de acordo com as Boas Práticas de Laboratório em local próprio para materiais potencialmente infectantes.

AMOSTRA

Ser obtida da mancha usual, livre de hemólise. É estável 3 dias refrigerado.

NÃO CONGELAR.

Amostras de soro com concentração de ceto-éceridos endógenos elevados produzem valores falsamente elevados, enquanto que as provenientes de pacientes hipercolesterolêmicos ou com hipovitamina E ou outras patologias associadas com deficiência de piridoxal fosfato, produzem valores falsamente diminuídos.

REG. M.S. N.º 10246610039

LABORLAB PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA. Estr. do Capão Bonito, 837 - 07263-010 - Guarulhos - SP CNPJ 72807043/0001-94
 Fone: (11) 6460-1306 (Central de Atendimento ao Cliente)

PREPARAÇÃO DO REAGENTE DE TRABALHO

Misture 1 frasco do Rv. Tampão (20 mL) com 5 mL do Rv. Enzimático ou para quantidades menores, 4 partes da Rv. Tampão + 1 parte da Rv. Enzimático = Mono-reagente

Estabilidade:

2 semanas a 2°-8°C.

2 dias a 15°-25°C.

Protela o mono-reagente da luz!

Os reagentes contém Azida Hídrica como conservante. Não ingerir e evitar contato com a pele e mucosas.

A absorbância do Reativo Único de Trabalho (mono-reagente) a 340 nm com o Espectrofotômetro zeraado com água túnionizada, deverá estar entre 0,800 e 1,000. Leituras inferiores indicam deterioração do Reativo.

TÉCNICA

O DGKC recomenda a temperatura de 25°C, o Comitê de Enzimas da SSGC 37°C e a IFCC sugere 30°C.

PROCEDIMENTO PARA O TESTE

Comprimento da onda: 340nm

Caminho óptico: 1 cm.

Temperatura: 25°, 30°, 37°C.

Temperatura	25°C	30°C ou 37°C
Amostra	200 µL	100 µL
Mono-reagente	1000 µL	1000 µL

Misturar, ler a absorbância após 1 min. e iniciar o cronômetro.

Ler absorbâncias novamente após 1, 2 e 3 min. Calcular as diferenças de absorbâncias por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$).

CÁLCULO

Multiplicar o $\Delta A/\text{minuto}$ obtido pelo fator correspondente a temperatura e comprimento de onda da leitura:

	25°C	30°C ou 37°C
340 nm	952	1748

VALORES DE REFERÊNCIA

	25°C	30°C	37°C
Homens	10 U/L	25 U/L	37 U/L
Mulheres	15 U/L	21 U/L	31 U/L

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Recuperação

Foram efetuados testes de recuperação, utilizando 5 amostras de concentração determinada. Foram efetuadas diluições entre as mesmas dentro da faixa da linearidade do teste. A média da comparação da concentração calculada com a concentração obtida foi de 95%.

PRECISÃO

Intra-ensaio: Foram testadas 5 amostras, em 5 replicates, durante um ensaio. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Média em U/L = 45 U/L

Coeficiente de Variação (CV %) = 6,0 %

Entre-ensaio: Foram testadas replicatas de 5 amostras em 5 ensaios diferentes. Os resultados foram os seguintes:

Média em U/L = 120 U/L

Coeficiente de Variação (CV %) = 1,9 %

ESTABILIDADE

Os estudos de estabilidade efetuados em um lote durante o período desde a fabricação ate a data de vencimento, utilizando amostras conhecidas demonstraram que não houve alteração dos resultados, quando o kit é estocado em geladeira 2-10°C. Após o vencimento do kit, os valores vão se alterando progressivamente. Portanto, recomenda-se não utilizar o kit após a data de validade impressa nas embalagens.

APRESENTAÇÃO

Kit suficiente para o preparo de 125 mL de Reagente Único de Trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC) Z. Klin. Chem., 10: 291 (1972)
- 2) Scandinavian Society for Clinical Chemistry (SSGC) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33: 291 (1974)
- 3) International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Clinica Chimica Acta 100:147 (1980)

REV. 01/02

— 133 —

ANEXO 4

Determinação de insulina pela técnica radioimunoensaio (Hebert et al., 1965)

Soluções

Stock I

Na₂HPO₄-----28,4g

Água deionizada q.s.p.-----1000mL

StockII

NaH₂PO₄. H₂O-----35,8g

Água deionizada q.s.p.-----1000mL

"Buffer" ou Stock III

Stock I-----160mL

StockII-----40mL

Água deionizada-----800mL

Observação: Estas soluções não podem ser mantidas na geladeira e não são autoclavadas. Por tanto, fazer somente o volume que será utilizado.

Buffer para o ensaio

Para cada 100mL de tampão (solução III) adicionar:

- 0,9g de NaCl (Concentração final 0,9%).
- 0,5g de albumina (agitá-la lentamente para que não haja formação de espuma. Ajustar o pH para 7,4 com NaOH (0,1N)).

Início do experimento

1. Preparar o protocolo que será desenvolvido.
2. Numerar os tubos de ensaio que serão utilizados:

Preparo da curva padrão

- ✓ 3 totais (T)

- ✓ 3 NBS (non-specific binding)
- ✓ 3 REF (referência)
- ✓ 3 S1
- ✓ 3 S2
- ✓ 3 S3
- ✓ 3 S4
- ✓ 3 S5
- ✓ 3 S6
- ✓ 3 S7
- ✓ 3 S8
- ✓ 3 S9

Preparo das amostras a serem analisadas

Deverão ou não ser diluídas de acordo com o protocolo em questão.

OBSERVAÇÃO

S1, S2,.....S9 irão apresentar uma concentração conhecida.

Totais: 200 μ L de "buffer com insulina marcada".

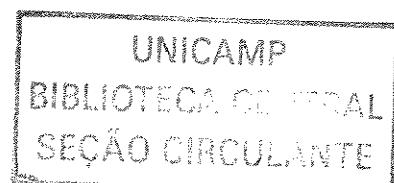
NSB: 100 μ L de "buffer" + 200 μ L de "buffer" com insulina marcada + 200 μ L de carvão.

REF: 100 μ L de "buffer" + 200 μ L de "buffer" com (insulina marcada + anticorpo) + 200 μ L de carvão.

3. Diluição da insulina conhecida

S1 a S8: Colocar 1mL do buffer.

S9: Colocar 2mL de tampão + 50 μ L da insulina conhecida (220ng/mL) obtendo 5ng/mL no final.



A seguir pipetar 1ml de S9 em S8, depois retirar 1ml do S8 e coloca-se em S7 e assim sucessivamente, S6.....S1 (agitando todos os tubos em Vortex-tubos iniciais).

Pipetar a curva (tubos que serão utilizados diretamente no experimento)

NSB e REF: Pipetar 100 μ L do tampão antes de qualquer outro procedimento.

Totais: não colocar nada.

S1-S9: Pipetar 100 μ L da solução contendo (insulina em diluições conhecidas tubos S1 a S9 iniciais) em cada tubo respectivo da curva.

4. Insulina marcada

Contar o número de tubos e multiplicar por 0,2mL para saber o volume de buffer necessário para a adição da insulina marcada (preparar sempre um pouco mais de buffer).

Cálculo do volume de insulina radioativa necessário:

nº total d tubos x2000

cpm marcada na geladeira onde 2000=cpm desejada para leitura a 1 minuto

OBS: Medir a radiação desta solução no contador gamma (acrescentando em um tubo 200 μ L da mesma e colocando para ler em 1 minuto). O valor ideal para esta leitura deve ser de 2000 com.

5. Anticorpo anti-insulina: 60mL do "buffer" : 20 μ L do anticorpo (colocar no "buffer" junto com a insulina marcada).

OBS; Após a realização destes itens deve-se incubar as amostras em geladeira durante 48 horas.

Preparo do Buffer com carvão ativado

(O preparo deste Buffer deve ser realizado em banho de gelo ou na geladeira).

(Colocar primeiro no buffer o carvão e o dextran e posteriormente a albumina, pois esta última forma muita espuma).

Para 100mL de buffer

2,5g de carvão

0,25g de dextran

0,5g de albumina

Deixar agitando por 30 minutos.

Adicionar em cada tubo 200 μ L desta solução (exceto nos totais), agitar os tubos no vortex e deixar na geladeira por 30 minutos.

Centrifugar a 2800 rpm, durante 20 minutos, a 4°C.

A leitura dos totais deve dar em torno de 5000 com. Portanto, deve-se ajustar o tempo de leitura.

ANEXO 6

Determinação de colesterol pelo método enzimático (Abell et al., 1952).

DEFINIÇÃO

O teste é feito no soro para a determinação do nível de lipídio que é produzido no fígado.

O Colesterol está presente nos glóbulos vermelhos e músculos, mas a maioria do Colesterol está combinado com os óleos ácidos graxos no sangue circulante.

Existe o Colesterol HDL (bom Colesterol) e o LDL (mau Colesterol). As pessoas com altos níveis de LDL têm grande risco de doenças do coração.

FISIOPATOLOGIA

O Colesterol é necessário na digestão das gorduras, formação dos hormônios adrenal, ovariano e testosterona.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Valores elevados - Infarto do miocárdio, obstrução do trato biliar, nefrose, hipotireoidismo, 3º trimestre de gravidez, dieta rica em Colesterol.

Valores baixos - Síndrome de Cushing, Desnutrição, Hipertireoidismo, infecções agudas, Anemia e Cirrose.

INTERFERÊNCIA

Falso valor alto - Esteróides, anticoncepcional oral, bromatos, fenotiazina sulfonamidas, fenitoína, aspirina, epinefrina.

Falso valor baixo - Esteróides aspirina, canamicina, neomicina, tetraciclina, estrógenos, heparina, colchicina, agentes antidiabéticos.

MÉTODO

Enzimático, Colesterol Oxidase, Colorimétrico e de Ponto Final.

LINEARIDADE E ESTABILIDADE DA REAÇÃO

A reação é linear até 500 mg/dL. Para resultados com valores superiores, diluir a solução colorida final 1:2 ou 1:4 com o Reativo de Trabalho e multiplicar o resultado pelo fator da diluição utilizada. A cor final da reação é estável por 120 minutos.

COMPOSIÇÃO DO KIT

Reativo Padrão CAT N.º 01401

Solução de Colesterol (200 mg/dL)

Volume = 4 mL

Reativo Enzimático CAT N.º 01402

Lipase ≥ 300 U/mL

COD ≥ 3 U/mL

POD ≥ 20 U/mL

Volume = 5 mL

Reativo de Cor (1) CAT N.º 01403

4 aminofenazona 0,025 mol/L

Volume = 13 mL

Reativo de Cor (2) CAT N.º 01404

Fenol 0,055 mol/L

Volume = 13 mL

Atenção: O reativo (2) é tóxico e irritante.

MATERIAL NÃO FORNECIDO (NECESSÁRIO)

Água desionizada.

Espectrofotômetro ou Colorímetro.

Micropipetas, pipetas e provetas capazes de medir os volumes indicados na técnica.

Tubos de ensaio para o aparelho a ser utilizado. Frasco de vidro âmbar.

Banho-maria 37°C.

Relógio ou cronômetro.

PREPARAÇÃO DO REATIVO DE TRABALHO

Todos os reativos vêm prontos para uso

N.º de provas	Rvo. (1)	Rvo. H ₂ O	Rvo. (2)	Rvo. Enzimático
10 - 20	0,5 mL	19 mL	0,5 mL	0,2 mL
20 - 40	1 mL	38 mL	1 mL	0,4 mL
80 - 160	4 mL	152 mL	4 mL	1,6 mL
250 - 500	12,5 mL	475 mL	12,5 mL	5,0 mL

O Reativo de trabalho é estável por um mês, quando refrigerado e acondicionado em frasco âmbar (colocar o rótulo auto-adesivo com a data de preparação).

ESTABILIDADE DO REATIVO DE TRABALHO

Leituras de Blank acima de 0,160 em absorbância indicam deterioração do Reativo de Trabalho. Neste caso desprezá-lo.

CONCENTRAÇÃO DO REATIVO DE TRABALHO

Lipase ≥ 6000 U/L

COD ≥ 60 U/L

POD ≥ 400 U/L

Rvo (1) = 0,00125 mol/L

Rvo (2) = 0,00275 mol/L

PH = 7,4 ± 0,1

VIDA ÚTIL E ARMAZENAMENTO

O kit é estável até seu vencimento indicado na caixa, quando mantido refrigerado. Evitar deixá-lo à temperatura ambiente por períodos prolongados, impedindo assim a deterioração das enzimas.

PRECAUÇÕES

O kit não contém derivados de sangue humano, porém, considerar qualquer amostra de paciente como potencialmente infectante. Evitar o contato direto com as amostras.

Não pipetar reagentes ou amostras com a boca.

Descartar as sobras das reações de acordo com as Boas Práticas de Laboratório em local próprio para materiais potencialmente infectantes.

AMOSTRA

Soro ou Plasma heparinizado, outros anticoagulantes interferem no resultado final. Não usar amostras visivelmente hemolizadas. As amostras podem ser guardadas refrigeradas antes da dosagem por uma semana ou por dois meses congeladas.

TÉCNICA

Colocar em 3 tubos de ensaios marcados: B (blank), P (padrão) e D (desconhecido)

	B	P	D
Padrão	-	20 µL	-
Desconhecido	-	-	20 µL
Rvo Trab.	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

Incubar a 37°C por 10 minutos.

Retirar do banho-maria e ler em Espectrofotômetro a 505 nm ou em fotocolorímetro com filtro verde (490-530 nm), zerando o aparelho em Absorbância com B (blank).

A cor é estável por 120 minutos.

Nota: Os volumes de amostra e Rvo de Trabalho podem ser modificados proporcionalmente.

Ex.: 10 µL de amostra + 1 mL de Rvo de Trabalho ou 50 µL de amostra + 5 mL de Rvo de Trabalho, etc.

CÁLCULOS

Colesterol mg/dL = D x f

$$f = \frac{200 \text{ mg/dL}}{P}$$

VALORES DE REFERÊNCIA

Homens (idade de 35 a 62 anos) até - 248 mg/dL

Mulheres (idade de 30 a 60 anos) até - 240 mg/dL

INTERFERÊNCIAS

Os detergentes, metais pesados e os cianetos são inibidores enzimáticos. Uma perfeita limpeza de vidraria utilizada é necessária.

Utilizar água desionizada ou destilada recente no preparo de Reativo de Trabalho. O nível de água no banho-maria deve ser superior ao dos tubos de ensaio que contém as reações. A temperatura e o tempo de reação não são críticos: 37°C ± 2 e 15 a 20 minutos.

A turvação que pode ser observada na incubação é devida ao tensoativo incorporado, mas, desaparece quando os tubos esfriam.

APRESENTAÇÃO

Kit suficiente para o preparo de 500 mL de Reativo de Trabalho = 500 reações (1 mL)

BIBLIOGRAFIA

1 - Abell, L.L.; Levy, B.B.; Brodie, B.B., Kendall, F.E.: J. Biol. Chem.

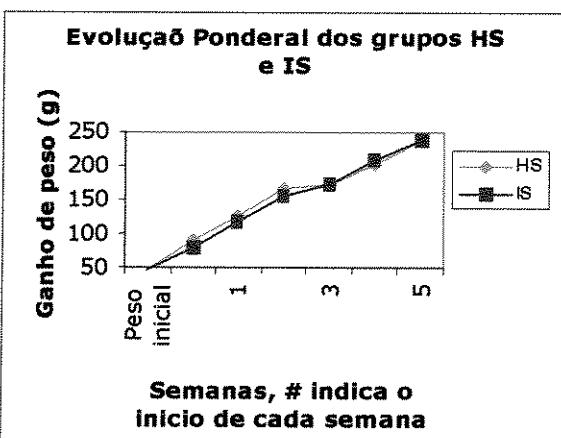
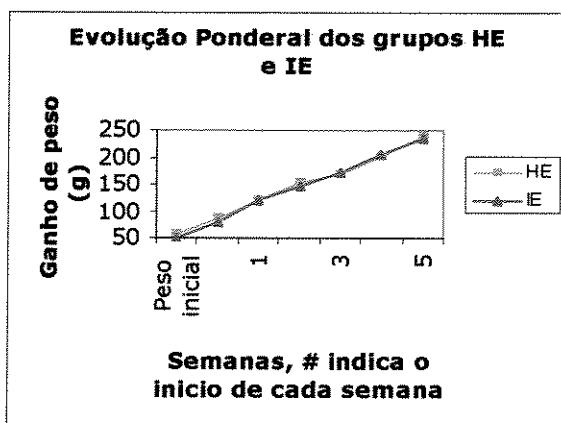
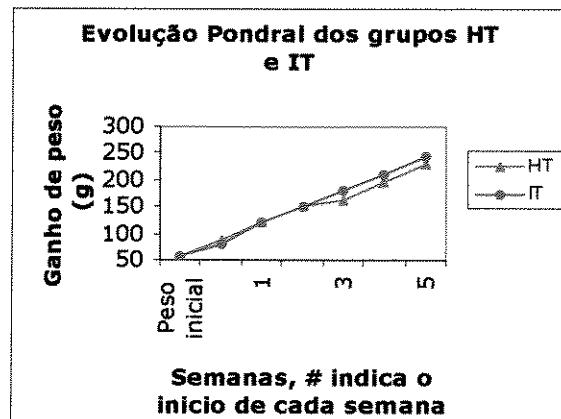
195:357 (1952)

2 - Trinder, P. - Ann. Clin. Biochem. 6/24 (1969)

3 - Castelli, W.P. - Current Prescribing 6/77: 39 (1977)

ANEXO 7

Gráficos da evolução ponderal de ratos alimentados com isolado e hidrolisado de soro de leite, comparando o mesmo tipo de atividade vs. tipo de dieta.



ANEXO 8

Médias e desvios padrão dos pesos (g) de ratos alimentados com isolado e hidrolisado de soro de leite e submetidos a exercício físico.

Tempo	GRUPOS						IS
	HT	IT	HE	IE	HS		
Peso inicial	58,33±5,50	48,39±4,50	57,84±5,90	47,3±5,00	57,84±5,90	48,21±6,30	
Dieta Comer.	88,16±5,40	79,97±8,50	88,7±8,30	79,41±7,60	90,03±7,40	79,11±13,80	
1 semana	121,43±10,00	119,62±9,80	121,87±11,60	119,77±11,60	126,33±5,30	118,2±14,20	
2 semana	149,55±13,20	150,69±10,00	153,7±10,10	146,6±10,50	159,47±11,21	145,91±12,40	
3 semana	160,96±16,30	180,07±11,20	168,23±11,60	173,08±14,30	174,22±8,70	174,17±10,60	
4 semana	193,95±19,90	211,95±15,60	202,88±15,70	204,92±17,20	201,89±9,80	207,92±12,00	
5 semana	230,33±19,50	242,58±16,90	240,14±16,90	234,93±16,80	239,25±12,90	237,77±10,10	

