



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

Tese de Mestrado

**EFEITOS DO CONSUMO DO HIDROLISADO DAS PROTEÍNAS  
DO SORO LÁCTEO NO DESEMPENHO FÍSICO E NO  
METABOLISMO PROTÉICO DO RATO EXERCITADO**

200373749

**Fernanda Motta Veiga Pimenta**

Nutricionista

**Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán**

Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Fernanda Motta Veiga Pimenta** aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de fevereiro de 2003.

Campinas, 19 de fevereiro de 2003.

  
Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán  
Presidente da Banca

Campinas – SP  
Brasil

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.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	Unicamp P649e
V	EX
TOMBO BC/	56289
PROC.	16-124/03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	9/24/03
Nº CPD	

CM00189477-1

BIBID 305018

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

P649e Pimenta, Fernanda Motta Veiga  
Efeitos do consumo do hidrolisado das proteínas do soro lácteo no desempenho físico e no metabolismo protéico do rato exercitado / Fernanda Motta Veiga Pimenta. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

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

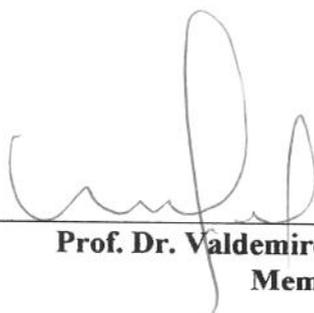
1.Dieta. 2.Exercício físico. 3.Rato. 4.Soro de Leite.  
I.Amaya-Farfan, Jaime. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan**  
**Orientador**



---

**Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri**  
**Membro**



---

**Prof. Dra. Semíramis Martins Alvares Domene**  
**Membro**

---

**Prof. Dra. Erika Maria Marcondes Tassi Granja**  
**Membro Suplente**

## DEDICO

*Aos meus queridos  
pais por sempre  
acreditarem em  
mim e participarem  
de tudo na minha  
vida com palavras  
de incentivo.*

## OFEREÇO

*Ao meu querido  
esposo Daniel  
que compartilhou  
tão positivamente  
de todo o meu  
mestrado,  
oferecendo apoio  
nos momentos mais  
difíceis e dividindo  
de forma única as  
alegrias.*

## *AGRADECIMENTOS*

- Ao Professor Dr. Jaime Amaya-Farfán, de maneira especial, pela orientação, confiança, apoio, incentivo e ensinamentos. E também pela sua paciência diante algumas interrupções em função da minha mudança para Inglaterra.
- À Professora Dra. Semíramis Martins Alvares Domene, com quem venho aprendendo muito desde o início de minha vida acadêmica. Agradeço também pelos três anos em que fui sua aluna de iniciação científica, que muito influenciou na decisão de prosseguir para o mestrado. Agradeço-lhe pela confiança e apoio desde o início do meu trabalho, e pelas valiosas sugestões como membro da banca e, acima de tudo, pela valiosa amizade consolidada ao longo destes seis anos.
- Ao Professor Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, pelas sugestões tão importantes prestadas no desenvolvimento do trabalho, desde o momento da qualificação até a revisão da dissertação.
- À Professora Dra. Erika Maria Marcondes Tassi Granja, pela colaboração na fase inicial com seus conhecimentos práticos, e agora como membro da banca.
- À Professora Dra. Débora de Queiroz Tavares, por todo o suporte oferecido para a realização deste trabalho e amizade.
- À Professora Dra. Denise Macedo, do Labex/IB-Unicamp, por ceder-me o laboratório para o ensaio biológico.
- À grande amiga Lilia Zago F. Santos, pela amizade, que começou nos tempos da graduação. Pelo companheirismo, ajuda, por compartilhar os bons e maus momentos da minha vida. Pela imensa e valiosa ajuda quando eu já estava na Inglaterra. E claro, agradeço ao Marcelo Santos pela amizade e paciência.
- À grande amiga Flávia Auler, a quem muito admiro, companheira de trabalho no laboratório, amiga de toda hora, com a qual aprendi muito e espero continuar aprendendo. Agradeço principalmente pela sua imprescindível ajuda durante todo o meu trabalho.
- À grande amiga Camila Lenci por dividir comigo todos os momentos do meu mestrado colaborando para que meu mestrado fosse mais alegre, além de estar sempre pronta a me ajudar com a tese.
- À amiga Pricila Veiga, tão importante no meu ingresso ao mestrado, companheira nas disciplinas. Esteve sempre disposta a me ajudar e esclarecer dúvidas.
- Aos colegas do Labex/IB-Unicamp, não somente por me aceitarem no laboratório, mas principalmente por toda ajuda prestada. Agradeço em especial ao Daniel, técnico do laboratório, e Joaquim Netto por serem sempre tão solícitos e amigos.
- Ao André Godoy Ramos colega de trabalho na fase inicial, com quem muito aprendi.

- Aos colegas de trabalho do laboratório de Fontes Protéicas. Agradeço a todos, em especial a Carla Creggi, D. Iná, Norka Beatriz, Lucilene, Maria Cláudia e Maria Inês pelo suporte e por tornarem meus dias de trabalho mais alegres.
- À Eliete Carvalho, pelo incondicional auxílio no sacrifício dos animais laboratoriais.
- À Suzana, Yara Fagnani, Chico, Eliana, Suely, Fátima, Técnicos dos diferentes laboratórios do Departamento de Alimentos e Nutrição, da UNICAMP sempre tão prestativos comigo.
- À amiga Nádia Dias, do ITAL, por várias vezes ter facilitado meu trabalho.
- À Nilda Nueva, pelas valiosas aulas de estatística.
- Aos amigos Lúcia Helena e Pedro Cypriano, Patrícia e André Brossel, Adriana e Fernando Brantis, pelos nossos momentos de lazer que tanto me ajudavam a renovar as energias necessárias.
- Às amigas Mônica Jordan e Cintia Arten pelo carinho de sempre. À Maria Helena Martini, sempre disposta a ouvir e trocar experiências.
- Aos meus pais e marido pela paciência, amor e compreensão.
- À minha querida irmã Alice, melhor amiga, sempre companheira e disposta a me ouvir.
- Ao meu querido cunhado Ezequiel, um verdadeiro irmão para mim.
- À minha querida sobrinha Laura, que embora bebê na época, tornou meus dias de mestrado ainda mais felizes.
- Aos meus avós, Alice e Fernando, pelo constante apoio, amor e confiança dados a mim.
- Aos meus tios e primos, pelo carinho e apoio.
- Ao Frisbee e Penny, fiéis companheiros, sempre ao meu lado, até nas geladas madrugadas na Inglaterra, quando precisava estudar até tarde.
- À amiga Lilian Costa, de BH, pela força no momento em que comecei o mestrado.
- Aos amigos da Inglaterra, que também contribuíram para meu trabalho, como Ana Vaz, Gisleine Silveira, Sandy Covington, Sue Speed e Renee Zendejas.
- Ao CNPq, pela bolsa concedida no decorrer do curso.
- À NZMP™, pela doação das proteínas do soro lácteo utilizadas para a realização deste trabalho.
- A todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e confiaram em mim.

## SUMÁRIO

Lista de Fluxogramas	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo Geral	xiv
General Summary	xvi
1- Introdução Geral	1
2- Objetivos	3
3- Revisão da Literatura	4
4- Referências Bibliográficas	14

### **CAPÍTULO 1: EFEITO DO PROTEOLISADO DO SORO LÁCTEO COM GRAU DE HIDRÓLISE MÉDIO COMO FONTE PROTÉICO-ENERGÉTICA PARA O RATO EM ATIVIDADE FÍSICA**

Resumo	23
Abstract	25
1- Introdução	27
2- Material e Métodos	29
3- Resultados e Discussão	43
4- Conclusões	57
5- Referências Bibliográficas	58

**CAPÍTULO 2: CAPACIDADE DE RECUPERAÇÃO DO RATO FISICAMENTE EXHAURIDO QUANDO ALIMENTADO COM O PROTEOLISADO DO SORO LÁCTEO COM GRAU DE HIDRÓLISE MÉDIO**

Resumo	63
Abstract	65
1- Introdução	67
2- Material e Métodos	69
3- Resultados e Discussão	83
4- Conclusões	96
5- Referências Bibliográficas	97
6- Anexos	101

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

### CAPÍTULO 1

<b>Fluxograma 1</b>	Divisão dos grupos experimentais, conforme dieta e atividade física	<b>34</b>
<b>Fluxograma 2</b>	Protocolo de treinamento utilizado durante o ensaio biológico	<b>36</b>

### CAPÍTULO 2

<b>Fluxograma 1</b>	Divisão dos grupos experimentais, conforme dieta e atividade física	<b>74</b>
<b>Fluxograma 2</b>	Protocolo de treinamento em esteira utilizado durante o ensaio	<b>77</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1</b>	Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico por 35 dias	<b>31</b>
<b>Tabela 2</b>	Composição da mistura mineral utilizada nas dietas experimentais	<b>32</b>
<b>Tabela 3</b>	Composição da mistura vitamínica utilizada nas dietas experimentais	<b>33</b>
<b>Tabela 4</b>	Protocolo de treinamento, aplicado durante 22 dias contínuos	<b>35</b>
<b>Tabela 5</b>	Parâmetros sanguíneos obtidos para os diferentes grupos de ratos	<b>49</b>
<b>Tabela 6</b>	Parâmetros musculares obtidos para os diferentes grupos de ratos	<b>54</b>

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1</b>	Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico por 10 semanas	<b>71</b>
<b>Tabela 2</b>	Composição da mistura mineral utilizada na dieta experimental	<b>72</b>
<b>Tabela 3</b>	Composição da mistura vitamínica utilizada na dieta experimental	<b>73</b>
<b>Tabela 4</b>	Composição centesimal da dieta experimental utilizada no ensaio de recuperação com o proteolisado	<b>74</b>
<b>Tabela 5</b>	Protocolo de treinamento, aplicado durante 9 semanas	<b>76</b>
<b>Tabela 6</b>	Dados de idade, peso e tempo de exaustão desta dissertação, Tassi (1996) e Diniz(2000)	<b>86</b>
<b>Tabela 7</b>	Parâmetros sanguíneos obtidos para os diferentes grupos de ratos	<b>87</b>
<b>Tabela 8</b>	Parâmetros musculares obtidos para os diferentes grupos de ratos	<b>92</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1</b>	Gaiola individual de crescimento utilizada na primeira fase do ensaio	<b>29</b>
<b>Figura 2</b>	Gaiola de crescimento utilizada na Segunda fase do ensaio	<b>30</b>
<b>Figura 3</b>	Esteira rolante utilizada para o treinamento dos animais experimentais	<b>37</b>
<b>Figura 4</b>	Aparelho utilizado para medição de lactato sanguíneo	<b>40</b>
<b>Figura 5</b>	Perfil aminoacídico do hidrolisado e isolado utilizados nas dietas	<b>44</b>
<b>Figura 6</b>	Evolução ponderal dos ratos alimentados com dieta experimental	<b>45</b>
<b>Figura 7</b>	Tempos médios de exaustão no teste físico final	<b>47</b>
<b>Figura 8</b>	Concentração de albumina sérica nos diferentes grupos de atividade física e dieta	<b>52</b>
<b>Figura 9</b>	Concentração de proteínas séricas totais nos diferentes grupos de atividade física e dieta	<b>53</b>
<b>Figura 10</b>	Conteúdo de massa muscular para os diferentes tipos de dieta	<b>56</b>

## CAPÍTULO 2

<b>Figura 1</b>	Gaiola individual de crescimento utilizada na primeira fase do ensaio	70
<b>Figuras 2 e 3</b>	Gaiola conjuntas utilizada na segunda fase do ensaio	70
<b>Figuras 4 e 5</b>	Animais experimentais durante o treinamento	78
<b>Figura 6</b>	Procedimento de coleta de sangue para análise de lactato	80
<b>Figura 7</b>	Evolução ponderal dos ratos alimentados com dieta experimental	83
<b>Figura 8</b>	Tempos médios de exaustão no teste físico final	85
<b>Figura 9</b>	Concentração de albumina sérica nos diferentes grupos de atividade física	89
<b>Figura 10</b>	Concentração de proteínas séricas totais nos diferentes grupos de atividade física	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP:** Trifosfato de adenosina
- E:** Exaustão
- H:** Hidrolisado de soro lácteo com grau de hidrólise médio ALATAL™ 817
- HE:** Hidrolisado e levado à exaustão
- HS:** Hidrolisado e sedentário
- HT:** Hidrolisado e treinado
- I:** Isolado de soro lácteo ALACEN™ 895
- IE:** Isolado e levado à exaustão
- IS:** Isolado e sedentário
- IT:** Isolado e treinado
- S:** Sedentários
- SEM:** Sedentário, exaustão e morte
- SM:** Sedentário sem exaustão
- T:** Treinados
- TEM:** Treinado, exaustão, seguido de morte
- TER24:** Treinado, exaustão, morte após 24 horas
- TER48:** Treinado, exaustão, morte após 48 horas
- TM:** Treinado sem exaustão
- TNBS:** ácido trinitrobenzenosulfônico

## RESUMO GERAL

Por décadas, a indústria considerou a proteína do soro lácteo como subproduto de pouco valor econômico, mesmo contendo 20% das proteínas do leite. Contudo, as propriedades funcionais tecnológicas e biológicas de seus componentes têm sido reconhecidas, chegando-se a desenvolver metodologias específicas para sua utilização. As propriedades físicas e físico-químicas como textura, formação de géis e filmes dessas proteínas são consideradas excepcionais, assim como a capacidade de melhorar a eficiência imunológica do organismo. Esta pesquisa teve por objetivo verificar a eficácia metabólica do proteolizado do soro de leite de vaca, como única fonte de proteína na dieta de ratos submetidos a atividade física, em comparação à utilização do seu isolado. As dietas foram preparadas contendo uma proteolizado industrial (**H**), e a outra o isolado (**I**) do qual o anterior se originou. Ratos Wistar com aproximadamente 100g foram divididos em 6 grupos: treinados (**HT** e **IT**), treinados levados a exaustão (**HE** e **IE**) e os sedentários (**HS** e **IS**). A dieta contendo o hidrolisado protéico de soro de leite forneceu melhores resultados na exaustão em comparação aos ratos em dieta com o isolado ( $156 \pm 18 \text{min}$  vs.  $60 \pm 13 \text{min}$ ). Para os níveis de lactato sanguíneo foi encontrada diferença significativa para quase todas as categorias, sendo sempre o  $p < 0,0001$ , com exceção dos grupos **T** e **S**. Para albumina e proteínas totais séricas foram encontradas diferenças significativas entre as categorias **H** e **I** ( $p < 0,001$ ). Para o glicogênio muscular foi encontrada diferença significativa somente entre os diferentes níveis de atividade física, sendo  $p < 0,04$ . Não houve diferença significativa para os níveis de proteína muscular ( $p > 0,2084$ ) e glicemia ( $p > 0,0714$ ). Os resultados sugerem que a proteína hidrolisada produziu efeito mais positivo em relação ao seu isolado intacto, para ratos em atividade física. No segundo ensaio trabalhou-se apenas com um tipo de dieta para todos os ratos. O experimento teve a duração de 10 semanas, objetivando avaliar o efeito da fonte protéica na capacidade de recuperação do animal exaurido. O estudo mostrou que o desempenho dos sedentários no momento do treinamento exaustivo era sempre inferior ( $79 \pm 16 \text{min}$  vs.  $42 \pm 14 \text{min}$ ). Em relação aos níveis de glicose não houve variação significativa entre categorias ( $p > 0,1784$ ). Quanto aos níveis de lactato sanguíneo foi encontrada diferença significativa para as categorias não submetidas ao treinamento exaustivo ( $p < 0,0002$ ). Para os níveis de albumina e proteínas totais séricas não foram encontradas diferenças significativas entre as categorias **TM** e **TER48** ( $p=1$ ;  $p=0,356$ ),

sugerindo ter havido a recuperação após a exaustão. Para o glicogênio muscular houve diferenças entre os dados obtidos no gastrocnêmio e sóleo, revelando que após 48 horas o primeiro ainda não havia se recuperado totalmente da exaustão (**TM** e **TER48**  $p=0,0008$ ), já no sóleo entre **TM** e **TER24** houve uma recuperação próxima de 50%. Não foram encontradas diferenças significativas para os níveis de proteína muscular ( $p>0,7421$ ). Os resultados sugerem que a dieta com o proteolísado com grau de hidrólise médio foi capaz de promover uma recuperação 48 horas após exercício exaustivo e que o treinamento físico foi suficientemente intenso para produzir alterações metabólicas referentes a utilização de substratos energéticos.

**Palavras chave:** soro de leite de vaca; dieta; exercício físico; recuperação.

## GENERAL SUMMARY

For decades, the dairy industry ignored the economic importance of milk whey, regardless of the fact that it contained 20% of whole milk. Recently, however, its technological and biological functional properties have been recognised and specific technologies have been developed for its utilisation. Among the special milk-whey properties, the texture, gel and film formation and the ability to enhance the immune system can be mentioned. This study compares the metabolic effect of the whey-protein isolate and its hydrolysate as a protein source to rats undergoing physical activity. The diets were prepared with either an industrial whey isolate (**I**) or its hydrolysate (**H**) as the only source of protein. According to the diet and the level of activity, sixty male Wistar rats (100g), were divided into six groups as follows: trained (**HT** and **IT**), exercised to exhaustion (**HE** and **IE**) and sedentary (**HS** and **IS**). At the end of performance test in the treadmill, the animals fed the **H** diet were seen to be significantly more resistant to exhaustion than those fed diet **I** ( $156\pm 18\text{min}$  vs.  $60\pm 13\text{min}$ ). Blood lactate levels were lower ( $p\leq 0,0001$ ) with the exception of groups **T** and **S**. Albumin and total serum protein levels were superior in the **H** fed groups, as compared to **I** ( $p\leq 0,001$ ). Significant differences were found for muscular glycogen only when varying physical activity levels ( $p>0,04$ ), but there was no difference for either muscular protein ( $p>0,2084$ ) or glucose levels ( $p>0,0714$ ). The results suggest that the hydrolysed protein (**H**) exerted a positive metabolic effect leading to an enhanced physical performance of the rat. In the second experiment only one diet type was used to feed all rats. This experiment took 10 weeks to complete, with the final aim of analysing the effect of protein source on the restoration capacity of exhausted animals. 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 ( $79\pm 16\text{ min}$  vs.  $42\pm 14$ ). Glucose level did not show significant changes for distinct categories ( $p>0,1784$ ). Blood lactate levels showed significant difference for the categories that were not subjected to exhaustive exercise ( $p<0,0002$ ). As for albumin and total seric proteins there were no significant differences for the **TM** and **TER48** ( $p\leq 0,0001$ ) categories, which is strong evidence of the fact that full recovery was achieved after exhaustion. For muscular glycogen there were differences between the levels found for gastrocnemius and soleum muscles, which reveals the fact that the first had not fully recovered after 48h (**TM** and **TER**  $p= 0,0008$ ), and the

latter, between **TM** and **TER24**, had close to 50% recovery. No significant differences were found for muscular protein levels ( $p>0,7421$ ). Therefore the results indicate that the diet based on the hydrolysate with partial hydrolysis was able to promote full recovery within 48 hours after exhaustive exercise, and that physical exercise was the cause of metabolic changes linked to the utilisation of energetic substrates.

**KEY WORDS:** milk whey protein; diet; physical activity; recovery.

---

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

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 diminuição da 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.

Uma sequência de cargas de esforço repetitivas e crescentes, objetivado o aumento da performance do atleta, constitui o treinamento físico (Weineck, 1989). Exercícios de curta duração e alta intensidade utilizam reservas imediatas e limitadas de creatina fosfato e adenosina fosfato. Exercícios prolongados utilizam carboidratos, lipídios e uma pequena parte das proteínas, para assegurar o aporte energético (Tassi, 1996; Hargreaves *et al.*, 1998; McArdle *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 2000).

A importância da nutrição para a performance do atleta é bastante conhecida (Pelly, 2000). Desta maneira, os alimentos capazes de contribuir para um melhor desempenho do atleta vem sendo continuamente estudados.

Várias pesquisas sobre exercício e metabolismo protéico vêm sendo realizadas. Todavia, ainda não se sabe ao certo a quantidade ou qualidade da proteína capaz de otimizar a performance do atleta, assim como sua forma de consumo. Existem formulados com proteína parcialmente hidrolisada de soro do leite que vêm sendo utilizados em função das suas propriedades funcionais (Tassi, 1996; Van Loon *et al.*, 2000a).

As proteínas do soro do leite, no que tange à alimentação, são efetivas em suprir requerimentos energéticos e de aminoácidos essenciais, possuindo elevada digestibilidade. Além disso, essas proteínas possuem inúmeras propriedades funcionais tecnológicas (Huffman, 1996; Sgarbieri, 1996; Lifran *et al.*, 2000).

Quando parcialmente hidrolisadas, tais proteínas servem como fontes de peptídeos bioativos com atividades fisiológicas, os quais em produtos industrializados oferecem uma variada gama de oportunidades de aplicação (Fritsché, 1998; McIntosh *et al.*, 1998). Vale ressaltar que a proteína parcialmente hidrolisada é mais rapidamente absorvida do que sua

---

forma intacta (Meredith *et al.*, 1990). Apesar das excelentes propriedades das proteínas do soro do leite, as mesmas possuem utilização ainda hoje limitada (Regester *et al.*, 1996; McIntosh *et al.*, 1998; Lifran *et al.*, 2000).

Este plano de pesquisa corresponde à parte de um projeto global, envolvendo o efeito da administração de dietas no metabolismo do animal exaurido e exercitado. Tais efeitos foram analisados através da medida do tempo de resistência à exaustão e a capacidade de recuperação pós-exaustão. O objetivo é o desenvolvimento de dietas para o melhor desempenho físico. Para tal estudo, foram utilizados como fontes de proteína produtos já existentes no mercado para fins especiais, como alimentação de atletas e pacientes em recuperação.

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar a eficácia metabólica do concentrado protéico do soro de leite bovino e seu hidrolisado enzimático como únicas fontes protéicas na dieta padrão de ratos, objetivando o desenvolvimento de dietas para o desempenho físico.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Definir as características da utilização das proteínas do lactossoro como única fonte protéica em dietas para ratos treinados e exercitados em esteira, utilizando para tanto parâmetros nutricionais clássicos como balanço nitrogenado, evolução ponderal e métodos e parâmetros bioquímicos tais como tempo de exaustão, glicose sérica, lactato sanguíneo, albumina sérica, proteínas séricas totais, glicogênio e proteínas musculares.
2. Definir as características da utilização do proteolisado enzimático do lactossoro como única fonte protéica em dietas para ratos treinados e exercitados em esteira, utilizando para tanto dados de evolução ponderal e métodos e parâmetros bioquímicos tais como tempo de exaustão, glicose sérica, lactato sanguíneo, albumina sérica, proteínas séricas totais, glicogênio e proteínas musculares.
3. Comparar as características biológicas oferecidas pelas duas fontes protéicas no rato exercitado com aquelas correspondentes do rato sedentário.
4. Tendo em vista os resultados do trabalho no primeiro ensaio, estudou-se posteriormente, o efeito da fonte protéica que melhores resultados proporcionou aos ratos, através da capacidade de recuperação do animal exaurido nos tempos 0, 24 e 48 horas após o treinamento exaustivo.

---

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

O exercício físico tem profundo efeito no metabolismo das proteínas (Tipton *et al.*, 1999), consumo de O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>) acima dos níveis de repouso (Laforgia *et al.*, 1997; Bahr & Sejersted, 1991; Parolin *et al.*, 1999), transporte de aminoácidos (Roy *et al.*, 1997), glicose plasmática e níveis de insulina (Takala *et al.*, 1999; Jeukendrup *et al.*, 1999; Wojtaszewski *et al.*, 2000), assim como nas concentrações de lactato muscular (Pilegaard *et al.*, 1999).

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). De acordo com Phillips *et al.* (1999) o retorno aos níveis de repouso, após atividade física ocorre em 36h.

Existem alguns estudos demonstrando que a provisão precoce de aminoácidos e glicose pode resultar em uma boa estimulação da síntese de proteínas pós-exercício (Okamura *et al.*, 1997). Não obstante, outros estudos verificaram que o exercício induz um aumento de reciclagem de aminoácidos intramusculares provenientes da quebra da proteína. Conseqüentemente, o suprimento de aminoácidos para o músculo, bem como seu transporte para este meio, e a quebra completa da proteína, podem ser importantes fatores regulatórios na determinação do padrão de síntese de proteína muscular (Phillips *et al.*, 1999).

A ingestão relativamente alta de proteína muitas vezes é considerada benéfica pelos atletas, para o 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).

Forslund *et al.* (1999) verificaram que a utilização da proteína aumenta gradualmente de acordo com a concentração de proteína da dieta, quando comparada a utilização de dietas normoprotéicas. É importante citar que também neste estudo foi observado que a utilização da proteína pós-exercício continuou sendo mais alta para a dieta

---

com alta concentração de proteína. Depois de 60 minutos houve um aumento ainda mais acentuado da utilização da proteína, atingindo-se um pico máximo em 120 minutos após o exercício. Uma possível explicação seria que no pós-exercício há um aumento rápido de aminoácidos intracelulares, sendo esse processo mais acentuado na dieta com alta concentração de proteína.

Dentre as mudanças causadas pela atividade física, é sabido 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 importante substrato durante o exercício (Jeukendrup, *et al.*, 1999). Em humanos, o efeito do exercício no transporte de glicose para o músculo tem rápida duração, aumentando a sensibilidade para ativação do transporte de glicose pela insulina, por mais de 48h pós-exercício. Em músculo esquelético de ratos há um aumento na sensibilidade à glicose pelos dois motivos, transporte de glicose e ativação da glicogênio sintetase após o exercício. Essas mudanças facilitam a ação da enzima glicogênio resintetase, e possivelmente constitui o meio pelo qual o estoque de glicogênio muscular é aumentado no pré-exercício (mecanismo de super compensação) (Wojtaszewski *et al.*, 2000).

Quando a glicose plasmática e os níveis de insulina estão aumentados, o coração prioriza a utilização de glicose, e a oxidação de ácidos graxos é suprimida (Takala *et al.*, 1999).

Quatro horas após a atividade física, as concentrações de glicogênio muscular estão mais baixas do que em repouso. Outra importante consideração diz respeito ao fato de a atividade da enzima glicogênio sintase ser significativamente mais alta no músculo previamente exercitado que no músculo em repouso (Wojtaszewski *et al.*, 2000).

De acordo com Jeukendrup *et al.* (1999) há um aumento rápido nos níveis de glicose durante o exercício. Este fato é provavelmente causado pela ativação do mecanismo responsável pelo uso da glicose, que por sua vez resulta em um aumento no fluxo de capilares sanguíneos, bem como no transporte de glicose para o músculo em atividade.

---

Durante a ingestão de carboidratos, a quebra de glicogênio pode continuar em níveis altos em alguns músculos, e pode reduzir em outros. Por sua vez, a síntese de glicogênio pode ocorrer em exercícios de baixa intensidade, em determinados músculos. Jeukendrup *et al.* (1999) concluíram que a insulina plasmática foi mais baixa em repouso e durante exercício intenso, sendo no entanto mais elevada para o grupo submetido à ingestão de glicose durante o exercício. Neste mesmo estudo foi verificado o efeito da ingestão de carboidratos na produção endógena de glicose, através da ingestão de glicose marcada. Constatou-se que quanto maior a dose de glicose ingerida mais acentuada é a queda na produção de glicose endógena.

Segundo Jeukendrup *et al.* (1999), a ingestão de dietas à base de carboidrato uma hora antes da atividade física pode aumentar as concentrações de insulina no sangue. No entanto, a ingestão posterior ao exercício pode inibir a produção da insulina causada pela dieta rica em carboidrato. É importante lembrar que a ingestão de carboidrato durante o exercício prolongado aumenta a resistência do atleta, esse mecanismo ainda hoje não é totalmente compreendido.

### **3.1 Exercício físico**

O desempenho físico é muitas vezes determinado pela rapidez com a qual o atleta pode recuperar sua força entre os períodos de atividade, o que indica o quão rapidamente os sistemas energéticos podem se recuperar. Radak *et al.* (1999) verificaram os efeitos do exercício no organismo, concluindo que a atividade física regular produz resultados benéficos para a saúde, como parte do processo adaptativo.

Durante o exercício físico o organismo dispõe de substratos energéticos, para converter energia química em mecânica. A energia para contração muscular é oriunda do trifosfato de adenosina (ATP), que tem sua geração de ATP diretamente associada ao tipo de exercício efetuado (McArdle *et al.*, 1992; Smolka, 1999). A formação de ATP se dá principalmente através de processos aeróbios. Ocorre também durante exercícios de alta

---

intensidade, ou quando há deficiência de O<sub>2</sub> por processos anaeróbios, com consequente formação de lactato e quebra de fosfocreatina (McArdle *et al.*, 1992).

A utilização dos carboidratos é maior nos exercícios de alta 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 a oxidação em atividades de intensidade moderada (Martin III & Klein, 1998). O mesmo foi observado na recente revisão feita por Stroud (1998). Mazepa *et al.* (2000) submetem ratos à atividade física e observaram que a utilização de lípides é maior durante o exercício prolongado, o que conseqüentemente poderia ser o agente causador do retardamento no ponto de exaustão.

O tipo de treinamento submetido determina as propriedades contráteis dos músculos, que por sua vez têm grande capacidade adaptativa. No entanto, músculos com predominância de fibras de contração rápida, como o gastrocnêmio, são aqueles capazes de produzir movimentos rápidos de grande força e pouco repetitivos, com baixa defesa antioxidante, e que utilizam carboidratos como fonte de energia. Já os músculos com predominância de fibras de contração lenta, como o sóleo, são capazes de produzir movimentos lentos e repetitivos, pois conferem resistência, alta defesa antioxidante e utilizam carboidratos e lípides como fonte de energia (Guyton, 1988; Smolka, 1999).

Diferentes métodos de treinamento proporcionam adaptações distintas no organismo. Um treinamento contínuo, o qual consiste em exercícios com velocidades submáximas e crescentes, proporciona um efeito adaptativo benéfico ao organismo, além do aumento na defesa antioxidante dos músculos. Por sua vez o treinamento intermitente, que consiste em breves exercícios de alta intensidade, pode levar ao aumento nos danos teciduais (Molnar, 2000).

O limiar entre o treinamento ideal e o excessivo é muito tênue. Os atletas podem ser submetidos a excessivas cargas de treinamento, que podem levar à ocorrência de lesões (Zoppi, 1999). Da mesma forma, embora muitas vezes a atividade física induza a adaptações benéficas ao organismo, a intensidade de sua utilização pode produzir condições

---

adversas, tais como hipertermia, estresse oxidativo, depleção de glicose e reservas de glicogênio, bem como o acúmulo de ácido láctico (Smolka, 1999).

O acúmulo de ácido láctico é frequentemente associado com declínio na geração máxima de força, sendo considerado um dos principais agentes fatigantes (McArdle *et al.*, 1999). Segundo Zoppi (1999), o dano oxidativo causado pelo exercício poderia ser a causa da fadiga muscular, que ocorre após uma atividade física exaustiva.

### **3.2 Relação proteína e atividade física**

O exercício físico requer a transformação de energia química em mecânica. Sabe-se que a energia química provém da ingestão alimentar. O alimento por sua vez, é metabolizado pelos músculos para produção de ATP, necessária para produção de energia mecânica. Consequentemente, a relação entre ingestão alimentar e metabolismo muscular no exercício é clara (Spriet & Peters, 1998).

Nos últimos tempos tem-se registrado um avanço expressivo da nutrição esportiva, embasada em princípios fisiológicos e bioquímicos. Uma alimentação especial pode promover melhor saúde e otimizar os benefícios do treinamento. Para isso são necessárias ações anteriores, posteriores e concomitantes ao exercício, objetivando o melhoramento da performance e recuperação do atleta (Burke, 2000).

Até a década de 70 acreditava-se que o papel da proteína na atividade física não era significativo, sendo este relegado à segundo plano, em detrimento da importância dos carboidratos e lípidos (Lemon, 1995). Atualmente sabe-se que os aminoácidos, como precursores para a síntese protéica, exercem papel fundamental para o organismo. Sob condições de exercício intenso, os aminoácidos influem no desenvolvimento da fadiga, embora muito pouco se saiba à respeito de tal mecanismo (Davis *et al.*, 1997).

Segundo Henderson *et al.* (1985), a oxidação de leucina em ratos treinados é superior à de ratos não treinados. Assim sendo, o condicionamento físico aumenta o

---

*turnover* e a oxidação de leucina. A oxidação deste aminoácido é acelerada se o estoque de glicogênio estiver depletado.

O exercício físico induz a diminuição da concentração muscular de alguns aminoácidos como a leucina e o aumento de outros como a alanina. A suplementação de aminoácidos após o exercício pode estimular a síntese de proteínas (Stein *et al.*, 1989; Biolo *et al.*, 1999; Tipton *et al.*, 1999), uma vez que sem esta, o exercício físico reduz a síntese protéica e leva à uma diminuição do conteúdo de proteínas no músculo, fígado e plasma (Linder, 1991). Um estudo realizado por Roy *et al.*, (1997) mostrou 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 a 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.

Van Loon *et al.* (2000a) trabalharam com diferentes tipos de dietas, incluindo mistura de aminoácido livres, mistura de hidrolisado protéico e proteína intacta, mistura de aminoácido livres e hidrolisado, e o grupo controle, ingerindo apenas o carboidrato. A ingestão da combinação de aminoácidos resultou em 100% de aumento do efeito insulínico quando comparado com a ingestão de fórmula de carboidratos. Já a administração de leucina e fenilalanina dentro do proteólisado promoveu efeito similar, sem causar desconfortos gastrointestinais, tal como ocorrido na administração de aminoácidos livres.

### **3.3 Isolado protéico intacto e seu hidrolisado**

Vários estudos tem sido publicados abordando a importância das proteínas na dieta do atleta. Contudo, ainda hoje não está clara qual a melhor forma de se administrar a proteína com o objetivo de melhorar a performance do atleta, bem como a quantidade ideal a ser oferecida.

---

O exercício físico requer um maior aporte protéico. Parte disso se deve a maior utilização de aminoácidos como fonte energética para o exercício. Na atividade física, a diminuição da disponibilidade de aminoácidos pode limitar o efeito estimulatório da insulina sobre a síntese protéica (Biolo *et al.*, 1999). Excessos na ingestão de proteína contudo, podem proporcionar efeitos negativos, como problemas hepáticos e renais, dentre outros.

Tassi (1996) verificou em ensaio com animais de laboratório que o consumo de dieta com proteína do soro lácteo parcialmente hidrolisada (grau de hidrólise de 15%) foi capaz de preservar os teores séricos de glicose, albumina e glicogênio muscular após exercício exaustivo. Já Ramos (2001) trabalhando com um hidrolisado protéico de soro lácteo com grau de hidrólise alto (30%) não observou mesmo efeito, conforme esperado para proteínas de mais rápida absorção, devido a alta concentração de aminoácidos livres. Tal fato sugere que os aminoácidos livres em maior quantidade, atravessam a mucosa intestinal com maior dificuldade, quando comparados aos peptídeos, demonstrando também uma menor eficiência protéica.

Van Loon *et al.* (2000a) compararam dietas com a proteína intacta e parcialmente hidrolisada e constataram que 2 horas após a ingestão das formulas, os níveis de aminoácidos plasmáticos eram inferiores para os grupos que ingeriram a forma intacta da proteína.

Van Loon *et al.* (2000b) constataram que a dieta com mistura de proteínas do soro lácteo parcialmente hidrolisado e carboidratos foi capaz de estimular a secreção de insulina, aumentando também a disponibilidade de aminoácidos plasmáticos em comparação com o uso de dietas contendo a proteína intacta e carboidrato.

Contudo Van Hall *et al.* (2000), trabalhando com dietas com adição de proteolísado de soro lácteo, e como controle dietas com adição somente de carboidratos não constatou efeito positivo na adição de proteína na dieta. Não foi observada melhoria da resíntese de glicogênio pós exercício, para aqueles em dieta com a proteína, tal como inicialmente esperado.

---

Estudo mais recente, realizado por Jentjens *et al.* (2001) constatou que dietas com adição de proteínas de soro de leite hidrolisadas podem não contribuir para a síntese de glicogênio, no entanto proporcionaram maiores níveis de insulina plasmáticas, que por sua vez estimulam a captação de glicose e síntese protéica.

### **3.4 Glicose sérica**

Concentrações de glicose sérica acima do esperado caracterizam o estado hiperglicêmico, interferindo quimicamente nas funções das proteínas do plasma e do fígado. Desta forma, quando em excesso no sangue a glicose deve ser convertida à glicogênio. De maneira oposta, quando os níveis de glicose sanguínea se encontram diminuídos a produção de glicose deve ser originada pela glicogenólise ou pela gliconeogênese, de forma a suprir as necessidades cerebrais. Vale ressaltar que na gliconeogênese há formação de glicose a partir das proteínas (Wojtaszewski *et al.*, 2000).

Outro meio de controle da concentração de glicose sanguínea é a produção de insulina pelo pâncreas. Para situações de alta concentração, a insulina promove o transporte rápido de glicose para dentro da célula, além do mecanismo tampão hepático. Já a baixa concentração de glicose estimula o pâncreas a secretar glucagon, fazendo com que o glicogênio hepático seja quebrado em glicose, a ser liberada para o sangue (Guyton, 1988). Durante o exercício prolongado a concentração de glicose é mantida, mesmo que por mecanismos de compensação, como os descritos anteriormente.

Tassi (1996) estudando o efeito de diferentes dietas na atividade física, não observou diferença significativa entre os níveis de glicemia. Contudo, tais níveis foram distintos entre grupos sedentários e treinados, sendo maiores para estes últimos. Tal fato provavelmente se relaciona ao menor tempo para chegada no ponto de exaustão para os ratos sedentários.

Sabe-se que o treinamento físico prolongado conduz a mudança do combustível utilizado pelo organismo, que inicialmente constitui-se basicamente de carboidrato para a gordura. O declínio na utilização do carboidrato durante o exercício se deve em parte ao

---

rápido declínio de glicose muscular. Dessa forma o treinamento contínuo tende a aumentar as reservas de glicogênio muscular, podendo ser mais lento o acentuado declínio na utilização da glicose para atletas em comparação com sedentários, justamente devido a essa maior concentração de glicogênio (Richter *et al.*, 1998).

Kristiansen *et al.* (2000) trabalhando com pessoas treinadas e não treinadas obtiveram níveis de glicose muscular mais elevados para grupo de treinados, quando ambos eram submetidos a mesma sobrecarga de exercício.

### **3.5 Lactato sanguíneo**

O acúmulo de ácido láctico muscular é apontado como causador de fadiga extrema. Por conseguinte existe uma quantidade máxima tolerável nos músculos e líquidos corporais. Esta limitação determina o nível máximo do uso do sistema glicogênio-ácido láctico para o suprimento de energia (Guyton, 1988).

O lactato é considerado um importante indicador do metabolismo anaeróbio glicolítico, sendo formado durante o exercício prolongado. Tassi (1996) constatou que ratos treinados apresentam menores valores de lactato que ratos sedentários, quando levados à exaustão. O tempo para a exaustão destes ratos foi menor, possivelmente em função dos mesmos apresentarem nível mais elevado de lactato sanguíneo.

Resultados semelhantes foram obtidos por Bergman *et al.* (1999) e Coker *et al.* (2001), os quais constataram, da mesma forma, níveis mais elevados de lactato sanguíneo durante o exercício. Bergman *et al.* (1999) observaram que o treinamento contínuo promoveu concentrações mais baixas no lactato sanguíneo dos indivíduos, fato que já havia sido relatado no estudo feito por Tassi (1996), com ratos treinados e sedentários. Tal fato pode ser atribuído à maior utilização de ácidos graxos livres (AGL) em resposta ao treinamento, o que leva a uma menor utilização do glicogênio e conseqüentemente menor concentração de lactato sanguíneo (Fox *et al.*, 1991).

---

Pilegaard *et al.* (1999) observaram que o treinamento com alta intensidade induziu o aumento da capacidade de transporte de ácido láctico para o músculo, em humanos. Este resultado sugere que o transporte de lactato muscular pode ser alterado pelo treinamento intenso, que constitui um importante meio de regulação do acúmulo de ácido láctico no músculo.

Parolin *et al.* (1999) verificaram, em humanos, que a disparidade entre a produção de piruvato através da via glicolítica e sua oxidação, provocava um real acúmulo de piruvato e lactato durante os primeiros 15 segundos de exercício.

### **3.6 Glicogênio**

Henriksson (1995) por meio de um artigo de revisão, relatou que o treinamento físico constante reduz a utilização de glicogênio muscular no exercício. Tal fato estaria relacionado principalmente com o aumento adaptativo das mitocôndrias musculares, além de alterações na economia de gasto de ATP. Sabe-se que tanto o glicogênio muscular, como o hepático tendem a diminuir logo após o exercício físico, tornando a gliconeogênese ainda mais importante, mesmo levando-se em conta a diminuição da utilização de glicogênio com o decorrer do treinamento físico (Mazepa *et al.*, 2000).

O glicogênio é um importante substrato energético para o músculo durante o exercício, estando a capacidade aeróbia diretamente relacionada com a concentração de glicogênio muscular. Desta forma a redução de glicogênio é progressiva de acordo com o tempo de atividade física (Goreham *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2001).

O treinamento físico também aumenta a capacidade de armazenamento muscular de glicogênio, favorecendo o restabelecimento mais rápido após sessões de exercício. Além disso, o treinamento também é capaz de aumentar a atividade da enzima glicogênio sintetase (Azevedo, 1994; Wojtaszewski *et al.*, 2000). Segundo Wojtaszewski *et al.* (2000) quatro horas após o exercício, a concentração de glicogênio muscular é 40% inferior em ratos treinados, quando comparados a ratos sedentários.

---

Musi *et al.* (2001) pesquisaram a variação da concentração de glicogênio muscular durante o exercício físico de ratos em esteira. Os mesmos verificaram que as concentrações de glicogênio muscular diminuem cerca de 24% como decorrência de uma atividade física moderada, já uma atividade física intensa é capaz de depletar 52% do glicogênio muscular.

### **3.7 Proteínas séricas e musculares**

Durante o exercício físico de longa duração, há uma utilização ativa de proteínas. Estima-se que 5 a 10% da fonte energética necessária ao desempenho físico seria suprida por aminoácidos (Dohm *et al.* 1987; Lemon & Mullin 1980). A mobilização protéica durante o exercício físico é resultado da diminuição da síntese e do aumento da degradação de proteína no músculo e fígado (Dohm *et al.* 1987).

Parreira (1993), trabalhando com ratos treinados, recebendo dietas com variáveis teores de proteína, não encontrou diferença significativa entre dietas normoprotéicas e hiperprotéicas para proteína muscular, sugerindo que a quantidade de proteína oferecida não aumenta a resistência aeróbica de atletas.

Gobatto (1993) estudando alterações metabólicas decorrentes do treinamento físico em ratos desnutridos e recuperados, não encontrou diferença significativa para as concentrações de albumina e proteínas totais no plasma. Entretanto, Tassi (1996) oferecendo diferentes tipos de proteína, porém com semelhante teor protéico, para ratos treinados, observou diferença significativa, sendo a dieta com a proteína parcialmente hidrolisada mais capaz de preservar os níveis de albumina sérica. Tal achado demonstra uma vantagem da proteína parcialmente hidrolisada em relação às outras.

---

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo JRM. *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.
- Bahr R, Sejersted OM. Effect of feeding and fasting on excess postexercise oxygen consumption. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 71(6): 2088-2093, 1991.
- Bergman BC, Butterfield GE, Wolfel EE, Casazza GA, Lopaschuk GD, Brooks GA. Evaluation of exercise and training on muscle lipid metabolism. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 276(39): E106-E117, 1999.
- Biolo G, Williams BD, Fleming RYD, Wolfe RR. Insulin action on muscle protein kinetics and amino acid transport during recovery after resistance exercise. *Diabetes*, New York, 48: 949-957, 1999.
- Burke L. Sports foods – a new market for the food industry? *Food Australia*, North Sydney, 52(9): 405, 2000.
- Coker R H, Simonsen L, Bulow J, Wasserman D H, Kjaer Michael. Stimulation of splanchnic glucose production during exercise in humans contains a glucagon-independent component. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, Baltimore, 280: E918-E927, 2001.
- Davis JM, Bailey SP. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, Madison, 29(1):45-57, 1997.
- Dohm GL, Tapscott EB, Kasperek GJ. Protein degradation during endurance exercise and recovery. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, Madison, 19(5): S166-s171, 1987.
- Forslund AH, El-Khoury AE, Olsson RM, Sjödín AM, Hambraeus L, Young VR. Effect of protein intake and physical activity on 24-h pattern and rate of macronutrient utilization. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 276(39): E964-E976, 1999.

- 
- Fox EL, Bowers RW, Foss ML. *Bases Fisiológicas da Educação Física e dos Desportos*. 4ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara, 1991, 518p.
- Fritsché R. Induction of oral tolerance to cow's milk proteins in rats fed with a whey protein hydrolysate. *Nutrition Research*, "S.L.", 18(8): 1335-1341, 1998.
- Goreham C, Green HJ, Burnett MB, Ranney D. High-resistance training and muscle metabolism during prolonged exercise. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 276(39): E489-E496, 1999.
- Gobatto CL. *Alterações metabólicas decorrentes do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados*. . Campinas, 1993. 122p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- Guyton AC. *Fisiologia humana*. 6ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.
- Hargreaves M, McKenna MJ, Jenkins DG, Warmington AS, Li JL, Snow RJ, Febbraio MA. Muscle metabolites and performance during high-intensity, intermittent exercise. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 84(5): 1687-1691, 1998.
- Henderson SA, Black AL, Brooks GA. Leucine turnover and oxidation in trained rats during exercise. *American Journal of Physiology*, Baltimore, 249:137-144, 1985.
- Henriksson J. Muscle fuel selection: effect of exercise and training. *Proceedings of the Nutrition Society*, Cambridge, 54: 125-138, 1995.
- Hernandez JM, Fedele MJ, Farrel PA. Time course evaluation of protein synthesis and glucose uptake after acute resistance exercise in rats. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 88(3): 1142-1149, 2000.
- Huffman, L.M. Processing whey protein for use as a food ingredient. *Food Technology*, Chicago, 50(2): 49-52, 1996.
- Jentjens RLPG, Van Loon LJC, Mann CH, Wagenmakers AJM, Jeukendrup AE. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 91: 839-846, 2001.

- 
- Jeukendrup AE, Wagenmakers AJM, Stegen JHCH, Gijsen AP, Brouns F, Saris WHM. Carbohydrate ingestion can completely suppress endogenous glucose production during exercise. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 276(39): E672-E683, 1999.
- Kristiansen S, Gade J, Wojtaszewski JFP, Kiens B, Richter EA. Glucose uptake is increased in trained vs. Untrained muscle during heavy exercise. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 89: 1151-1158, 2000.
- Laforgia J, Withers RT, Shipp NJ, Gore CJ. Comparison of energy expenditure elevations after submaximal and supramaximal running. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 82(2): 661-666, 1997.
- Lemon PWR. Do athletes need more dietary protein and amino acids? *International Journal of Sports Nutrition*, Champaign, 5:S39-S61, 1995.
- Lemon PWR, Mullin JP. Effect of initial muscle glycogen levels on protein catabolism during exercise. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 48(4): 624-629, 1980.
- Lifran EV, Hourigan JÁ, Sleigh RW, Johnson RL. New wheys for lactose. *Food Australia*, North Sydney, 52(4): 120-125, 2000.
- Linder MC. Energy metabolism, intake and expenditure. In: Nutritional Biochemistry and Metabolism with Clinical Applications. 2ª edição. Appleton & Lange, 277-300, 1991.
- Martin III WH, Klein S. Use of endogenous carbohydrate and fat as fuels during exercise. *Proceedings of the Nutrition Society*, Cambridge, 57: 49-54, 1998.
- Mazepa RC, Cuevas MJ, Collado PS, Gallego JG. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Science*, New York, 66(2): 153-160, 2000.
- McArdle WD, Katch FI, Katch VL. *Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano*, 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 510p.

---

McArdle WD, Katch FI, Katch VL. Sports & Exercise Nutrition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 1999. 750p.

McIntosh GH, Royale PJ, Leu RKL, Register GO, Johnson MA, Grinstead RL, Kenward RS, Smithers GW. Whey proteins as functional food ingredients? *International Dairy Journal*, Barking, 8: 425-434, 1998.

Meredith JW, Ditesheim JA, Zaloga GP. Visceral protein levels in trauma patients are greater with peptide diet than intact protein diet. *The Journal of Trauma*, Baltimore, 30(7): 825-29, 1990.

Molnar AM. *Padronização da técnica de BN-page e coloração histoquímica dos complexos I e IV da cadeia de transporte de elétrons em diferentes músculos de rato*. Campinas, 2000. 76p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

Musi N, Hayashi T, Fujii N, Hirshman MF, Witters LA, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 280: E677-E684, 2001.

Nielsen JN, Derave W, Kristiansen S, Ralston E, Ploug T, Richter EA. Glycogen synthase localization and activity in rat skeletal muscle is strongly dependent on glycogen content. *Journal of Physiology*, "S.L.", 531(3): 757-769, 2001.

Okamura K, Doi T, Hamada K, Sakurai M, Matsumoto K, Imaizumi K, Yoshioka Y, Shimizu S, Suzuki M. Effect of amino acid and glucose administration during post-exercise recovery on protein kinetics in dogs. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 272(35): E1023-E1030, 1997.

Parolin ML, Chesley A, Matsos MP, Spriet LL, Jones NL, Heigenhauser GJF. Regulation of skeletal muscle glycogen phosphorylase and PHD during maximal intermittent exercise. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 277(40): E890-E900, 1999.

Parreira MR. *Exercício físico associado a diferentes teores de proteína na dieta: Estudo das alterações bioquímicas e corporais em ratos adultos*. Campinas, 1993. 84p.

---

Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

Pelly F. Nutrition at the Sydney 2000 Olympic and Paralympic games. *Food Australia*, North Sydney, 59(9): 404, 2000.

Phillips SM, Tipton KD, Ferrando AA, Wolfe RR. Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turn over. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 276(39): E118-E124, 1999.

Pilegaard H, Domino K, Noland T, Juel C, Hellsten Y, Halestrap AP, Bangsbo J. Effect of high-intensity exercise training on lactate/H<sup>+</sup> transport capacity in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 276(39): E255-E261, 1999.

Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvári M, Nyakas C, Goto S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology & Medicine*, Oxford, 27(1/2): 69-74, 1999.

Ramos AG. *Utilização das proteínas do soro lácteo por ratos jovens*. Campinas, 2001. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Regester GO, McIntosh GH, Lee VWK, Smithers GW. Whey proteins as nutritional and functional food ingredients. *Food Australia*, North Sydney, 48(3): 123-127, 1996.

Richter EA, Jensen P, Kiens B, Kristiansen S. Sarcolemal glucose transport and glut-4 translocation during exercise is diminished by endurance training. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 274: E89-E95, 1998.

Roy BD, Tarnopolsky MA, MacDougall JD, Fowles J, Yarasheski KE. Effect of glucose supplement timing on protein metabolism after resistance training. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 82(6): 1882-1888, 1997.

---

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

Smolka BM. *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.

Spriet LL, Peters SJ. Influence of diet on the metabolic responses to exercise. *Proceedings of the Nutrition Society*, Cambridge, 57: 25-33, 1998.

Stein TP, Hoyt RWW, Toole MO, Leskiw MJ, Schluter MD, Wolf RR, Hiller WDB. Protein and energy metabolism during prolonged exercise in trained athletes. *International Journal of Sports Medicine*, Stuttgart, 10(5): 311-316, 1989.

Stroud M. The nutritional demands of very prolonged exercise in man. *Proceedings of the Nutrition Society*, Cambridge, 57: 55-61, 1998.

Takala TO, Nuutila P, Katoh C, Luotolahti M, Bergman J, Mäki M, Oikonen V, Ruotsalainen U, Grönroos T, Haaparanta M, Kapanen J, Knuuti J. Myocardial blood flow, oxygen consumption, and fatty acid uptake in endurance athletes during insulin stimulation. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 277(40): E585-E590, 1999.

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

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*, Bethesda, 276(39): E628-E634, 1999.

Van Hall G, Shirreffs SM, Calbet JAL. Muscle glycogen resynthesis during recovery from cycle exercise: no effect of additional protein ingestion. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 88(5): 1631-1636, 2000.

---

Van Loon LJC, Saris WHM, Verhagen H, Wagenmakers AJM. 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

Van Loon LJC, Saris WHM, Kruijshoop M, Wagenmakers AJM. Maximizing postexercise muscle glycogen synthesis: carbohydrate supplementation and the application of amino acid or protein hydrolysate mixtures. *American Journal of Clinical Nutrition*, New York, 72: 106-111, 2000. b

Weineck J. *Manual de Treinamento Esportivo*. São Paulo: ed. Manole, 2<sup>a</sup> ed, 1989.

Wojtaszewski JFP, Hansen BF, Gade J, Kiens B, Markuns JF, Goodyear LJ. Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle. *Diabetes*, New York, 49, March 2000.

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.



## EFEITO DO PROTEOLISADO DO SORO LÁCTEO COM GRAU DE HIDRÓLISE MÉDIO COMO FONTE PROTÉICO-ENERGÉTICA PARA O RATO EM ATIVIDADE FÍSICA

Fernanda Motta Veiga Pimenta

### RESUMO

Os carboidratos e gorduras são fontes de energia preferenciais para a atividade física de curta duração. Já a utilização das proteínas como fonte energética ocorre predominantemente durante a realização de exercício físico de longa duração, quando as proteínas são mais rapidamente degradadas. A utilização de suplementos à base de carboidratos para atleta é hoje uma prática comum. Contudo, observa-se também a introdução de fórmulas à base de proteína. Dentre esses suplementos aqueles constituídos de proteínas do soro do leite tem tido grande destaque, uma vez que possuem excelentes propriedades funcionais. O presente estudo teve por objetivo verificar a eficácia metabólica do proteolizado do soro lácteo e do isolado do qual originou, para ratos exercitados. Para o ensaio biológico foram utilizados ratos machos Wistar, de 21 dias, alimentados por 35 dias com dois tipos de dietas, elaboradas conforme AIN-93G, uma delas contendo o proteolizado industrial, e a outra, o isolado como fonte protéica. De acordo com o nível de atividade os ratos foram divididos em grupos treinados (**HT/IT**), treinados com exaustão (**HE/IE**), e sedentários (**HS/IS**). O experimento foi planejado visando comparar o desempenho físico e alguns parâmetros bioquímicos. Ao atingirem aproximadamente 100g os ratos, já submetidos a dieta experimental, passaram por um período de 8 dias de adaptação ao treinamento físico. Em seguida permaneceram em treinamento contínuo por 14 dias em esteira, com exceção do grupo controle (sedentários). Foram avaliados a evolução ponderal, o tempo de exaustão, o lactato sanguíneo, a glicose, albumina, proteínas séricas totais, o glicogênio muscular e proteína muscular. Observou-se que o ponto de exaustão dos animais do grupo **H** foi atingido depois do **I** ( $156 \pm 18$  min vs.  $60 \pm 13$  min). Para os níveis de lactato sanguíneo foi encontrada diferença significativa para quase todas

---

as categorias, sendo sempre o  $p < 0,0001$ , com exceção dos grupos **T** e **S** com  $p > 0,4166$ . Para os níveis de albumina e proteínas totais séricas foram encontradas diferenças significativas entre os grupos **H** e **I** ( $p < 0,001$ ) resultados favoráveis ao grupo **H**, e somente para as proteínas totais foi encontrada diferença também para os grupos **T** e **S** ( $p < 0,0025$ ). Já para o glicogênio muscular foi encontrada diferença significativa somente entre os diferentes níveis de atividade física, sendo  $p < 0,04$ . Não foi encontrada diferença significativa para os níveis de proteína muscular ( $p > 0,2084$ ) e glicemia ( $p > 0,0714$ ) para nenhuma categoria. Os resultados sugerem que a dieta oferecida com o hidrolisado (**H**) foi mais eficaz no seu propósito, proporcionando resultados capazes de promover melhor desempenho físico nos animais treinados com tal dieta.

**Palavras-chave:** dieta, proteína, atividade física, hidrolisado, soro de leite.

## ABSTRACT

Carbohydrates and fat are the main sources of energy for short time physical activity. In contrast, proteins are used as energetic sources predominantly during prolonged activity. After rapid protein degradation, amino acids are used as substrates for energy production. Intake of carbohydrate-based supplements is currently an extensive practice amongst athletes. Nevertheless, protein based formulations are now also being prescribed. Among those, special importance has been given to those based on whey proteins, due to their superior functional properties. This study aims at verifying the metabolic efficacy of the whey protein hydrolysates, as well as that of the isolate from which it originates, when applied to rats undergoing physical activity. For this biological experiment Wistar breed rats were used. Two dietary formulations were adopted, both in accordance to AIN-93G. The first is based on hydrolysates, and the other had isolated protein as the main ingredient. The rats were then divided into several groups, trained (**HT/IT**), trained to exhaustion (**HE/IE**) and sedentary (**HS/IS**). The experiment was made with the objective of trying to establish a clear relationship between physical performance and some key biochemical parameters, characteristic of Wistar rats. When reaching approximately 100g in weight, the animals, already fed with the experimental diet were introduced to physical exercise adaptation for 8 days. Later in the experiment, endurance training was conducted for 14 days with the use of a treadmill, the only exception being the control group (sedentary rats). A thorough evaluation of weight evolution, time to physical exhaustion and blood lactate was conducted. Likewise, monitoring of seric glucose, albumin levels, and total seric proteins was made with the use of specific kits. Through tissue analysis, determination of the muscular glycogen as well as that of muscular protein was conducted. The latter two using the gastrocnemius muscle. A clear observation was made of the longer exhaustion point of the group **H** animals, in contrast to those from group **I** (156±18 min vs. 60±13 min). For blood lactate levels a significant difference was found for almost all groups, always with  $p < 0,0001$ , with the exception of groups **T** and **S** with  $p > 0,4166$ . For Albumin and total seric protein levels, significant differences were found between groups **H** and **I** ( $p < 0,001$ ) in favour of group **H**, and only for total protein contents a difference for groups **T** and **S** was also found ( $p < 0,0025$ ). With muscular glycogen, a

significant difference was found for the various kinds of physical activity, with  $p < 0,04$ . There was no major difference for muscular protein levels ( $p > 0,2084$ ) and glycemic values ( $p > 0,0714$ ), for any of the groups. The results suggest that the hydrolysed based diet (H) was the most efficient, leading to enhanced physical activities for rats under the described training circumstances.

**Key words:** diet, protein, physical activity, hydrolysate, whey protein.

## 1. INTRODUÇÃO

O leite contém componentes os quais fornecem elementos nutritivos importantes, proteção imunológica, substâncias biologicamente ativas, tanto para o neonato como para o indivíduo adulto (Clare & Swaisgood, 2000). Além das excelentes propriedades funcionais nutricionais, o leite apresenta também importantes propriedades funcionais tecnológicas como propriedades emulsificantes, solubilidade, geleificação, formação de espuma e de biofilmes.

O leite bovino possui aproximadamente 3,25% de proteínas. As proteínas do soro do leite contribuem com cerca de 20%, e as caseínas com 80% do total. As proteínas do soro apresentam propriedades fisiológicas importantes, sendo melhor fonte de energia e de aminoácidos quando comparadas às proteínas do ovo, carne, soja ou até à caseína (Sgarbieri, 1996). Qualquer fator que altere a digestibilidade das proteínas poderá afetar seu valor nutricional, e dentre os fatores que determinam a qualidade nutricional das proteínas tem-se a digestibilidade, composição de aminoácidos e a biodisponibilidade. A excelente eficiência nutricional das proteínas do soro do leite é responsável pelo alto valor biológico conferido a estas proteínas (Friedman, 1996).

Sabe-se também que as proteínas do soro do leite são capazes de aumentar a resposta imune, possuem ação antioxidante, e seus aminoácidos sulfurados conferem maior estabilidade ao DNA, evitando rupturas e rearranjos e, conseqüentemente, diminuindo a incidência de carcinogênese. Essas proteínas possuem aminoácidos essenciais capazes de promover uma rápida produção de anticorpos, sendo apontadas como moduladoras do sistema imunológico (Bounous & Gold, 1991; Brink, 1997).

Embora exista pouca fundamentação teórica, o interesse quanto ao uso de proteínas do soro do leite para melhorar a performance do atleta tem sido cada vez maior. Contudo, ainda hoje não se conhece qual a quantidade ideal dessas proteínas a serem ingeridas, ou mesmo a melhor forma de consumo.

Tassi (1996) realizou estudo utilizando um hidrolisado da  $\alpha$ -lactalbumina do soro do leite e constatou que na forma hidrolisada, essa proteína foi mais eficaz do que a

---

proteína inteira, quando oferecida para ratos submetidos ao exercício físico. Entretanto, a autora afirmou ser necessário mais pesquisas a respeito da concentração ideal do hidrolisado na dieta, bem como a determinação de um período mínimo de treinamento para obtenção de resultados satisfatórios.

Ramos (2001), por sua vez, encontrou que para o rato exercitado, a alimentação com proteína do soro de leite hidrolisada com alto grau de hidrólise (~30%) não resultou em diferenças ou vantagens significativas.

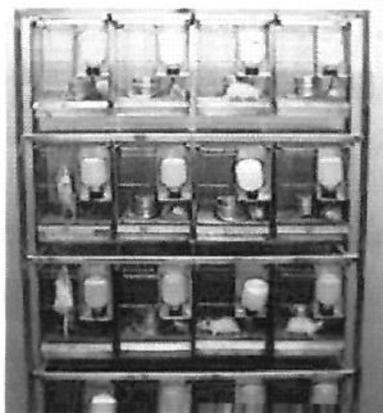
Tendo em vista esses dois últimos estudos, o estudo atual, objetivou investigar a utilização de um hidrolisado protéico com grau de hidrólise médio (7,8%), sendo utilizado como forma de controle o isolado protéico de soro lácteo intacto. Este experimento consistiu em submeter ratos adultos jovens ao treinamento físico em esteira, tendo como grupo controle de atividade física um grupo sedentário. Sabe-se que as proteínas do soro do leite possuem propriedades nutricionais superiores à caseína para o indivíduo em atividade física. O objetivo dessa fase da pesquisa era avaliar as diferenças, se existentes, da utilização das proteínas do soro de leite com grau de hidrólise médio em relação às mesmas intactas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Ensaio Biológico

O ensaio utilizou 60 ratos albinos machos da linhagem Wistar SPF, recém-desmamados (21 dias,  $57g \pm 5,65$ ), procedentes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais, para efeito de operacionalização, foram recebidos em dois lotes escalonados de 30. As condições ambientais do Laboratório foram controladas para proporcionar temperatura e umidade relativa de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e 50-60%, respectivamente, e ciclo de luz invertido de 12 horas. Os animais foram mantidos em gaiolas de crescimento individuais, com dieta não purificada de fórmula fechada (Nuvital para roedores, Curitiba, Brasil) e água com livre acesso, até atingirem aproximadamente 100g. Ao final deste período os ratos foram novamente pesados e submetidos a um período de 35 dias de ensaio, sendo os 8 primeiros dias de adaptação à dieta experimental AIN 93-G modificada. A dieta experimental inicial foi mantida nessa segunda fase.

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.



**Figura 1:** Gaiola individual de crescimento utilizada na primeira fase do ensaio.



**Figura 2:** Gaiola conjunta utilizada na segunda fase do ensaio.

## 2.2 Dietas experimentais

Inicialmente os ratos permaneceram em dieta não purificada de fórmula fechada (Nuvital para roedores, Curitiba, Brasil) por um período de uma semana. Posteriormente foi oferecida 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 o isolado protéico do soro de leite de vaca (ALACEN™ 895) e seu hidrolisado enzimático (ALATAL™ 817), ambos da NZMP™ (Wellington, N.Z.).

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

O consumo individual de dieta foi monitorado durante a primeira fase do experimento. Contudo, o mesmo procedimento não pode ser conduzido durante a segunda

fase, devido ao uso de gaiolas coletivas, para grupos de 5 ratos; este arranjo atendeu às condições de infra-estrutura da fase de treinamento.

### 2.3 Composição das dietas

A composição das dietas experimentais (**Tabela 1**), bem como das misturas minerais (**Tabela 2**) e vitamínicas (**Tabela 3**) encontram-se a seguir.

**Tabela 1-** Composição das dietas (g/kg de dieta) utilizadas no ensaio biológico por um período de 35 dias.

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

**Tabela 2-** Composição da mistura mineral (AIN-93G) utilizada na elaboração das dietas experimentais.

Ingrediente	Quantidade (g/kg de mix)
Carbonato de cálcio, anidro, 40.04% Ca	357,00
Fosfato de potássio, monobásico, 22.76% P; 28.73% K	250,00
Cloreto de sódio, 39.34 % Na; 60.66% Cl	74,00
Sulfato de potássio, 44.87% K; 18.39% S	46,60
Citrato de potássio, tri-potássio, monoidratado, 36.16% K	28,00
Óxido de magnésio, 60.32% Mg	24,00
Citrato férrico, 16.5% Fe	6,06
Carbonato de zinco, 52.14% Zn	1,65
Carbonato de manganês, 47.79% Mn	0,63
Carbonato cúprico, 57.47% Cu	0,30
Iodeto de potássio, 59.3% I	0,01
Selenito de sódio, anidro, 30.03% Se	0,01025
Paramolibdato de amônia, tetraidratado, 54.34% Mo	0,00795
Metasilicato de sódio, nonaidratado, 9.88% Si	1,45
Sulfato de potássio e crômio dodecaidratado, 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
Vanadato de amônia, 43.55%	0,0066
Sacarose em pó	209,806

**Tabela 3-** Composição da mistura vitamínica (AIN-93G) utilizada na elaboração das dietas experimentais.

Ingrediente	Quantidade
	g/kg de mix
Ácido Nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina-HCl	0,700
Tiamina-(1 nitrato)	0,645
Riboflavina (a 80%)	0,750
Ácido fólico	0,200
D-biotina (2% em CaCo <sub>3</sub> )	1,000
Vitamina B-12 (cianocobalamina) (a 1% em maltodextrina)	0,250
Vitamina E (all-rac- $\alpha$ -tocoferil acetato) (500 UI/g)	15,000
Vitamina A (all-trans-retinil palmitato) (500.000 UI/g)	0,800
Vitamina D3 (colecalfiferol) (500.000 UI/g)	0,200
Vitamina K (filoquinona)	0,075
Açúcar refinado (ou dextrina)	975,780

#### 2.4 Controle da evolução ponderal e ingestão alimentar

Durante o período de administração da dieta comercial os animais foram pesados a cada 7 dias em balança eletrônica. Após entrarem em dieta experimental, os ratos foram pesados a cada 2 dias na primeira fase, objetivando o monitoramento minucioso do ganho de peso. Durante o período de treinamento os ratos voltaram a ser pesados a cada 7 dias, inclusive no dia do sacrifício.

Com a finalidade de se determinar o balanço nitrogenado, foi monitorada a quantidade de nitrogênio ingerido, através do controle do consumo de dieta, fezes e urina.

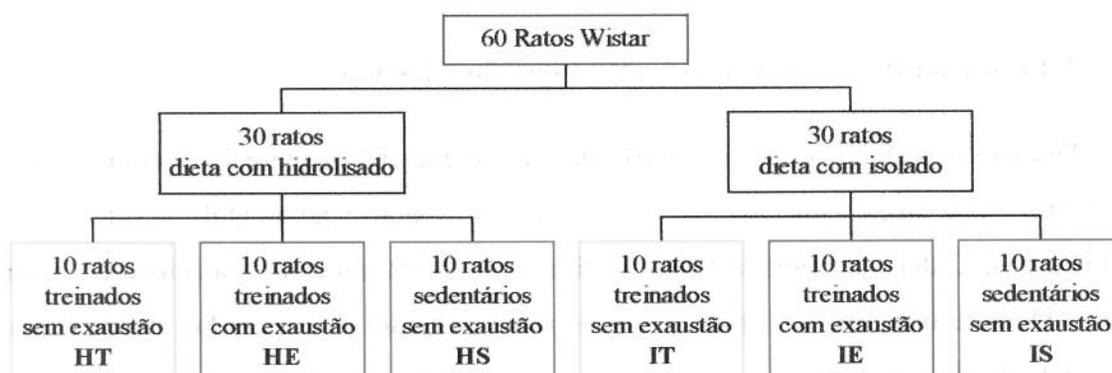
As duas últimas foram coletadas durante 4 dias, calculando-se o nitrogênio excretado, a partir do 4º dia após iniciada a dieta experimental.

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 alimentar foi feito no período em que os ratos estiveram em gaiolas individuais, através da pesagem dos comedouros em dias alternados.

## 2.5 Protocolo de treinamento

Primeiramente, foram definidos os grupos de animais a serem treinados e aqueles sedentários. Os animais foram separados em 6 grupos, dos quais 3 receberam dieta com o lactossoro como única fonte protéica, e os outros 3 grupos receberam dieta com o proteoliso enzimático como única fonte protéica. Dos 6 grupos existentes 4 foram submetidos ao exercício físico objetivando a comparação das características biológicas oferecidas pelas duas fontes protéicas, utilizando 2 grupos de ratos sedentários como forma de controle conforme indicado no **Fluxograma 1**.



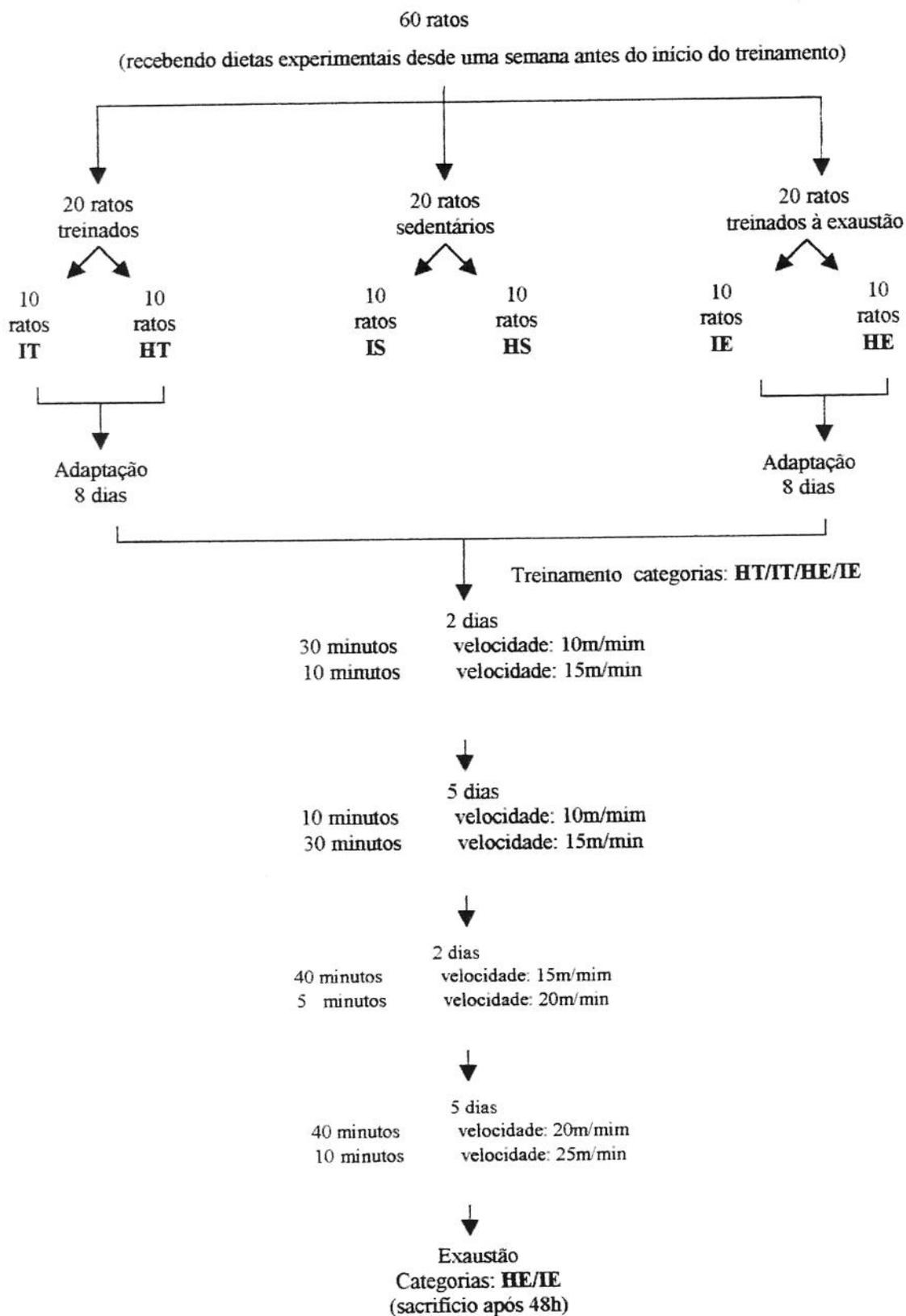
**Fluxograma 1-** Divisão dos grupos experimentais, conforme dieta e atividade física.

Definidos os grupos, os animais em atividade física foram submetidos a um período de 8 dias de adaptação ao exercício. Após a fase de adaptação, os ratos iniciaram um período de treinamento físico por 14 dias, segundo o esquema da **Tabela 4** e **Fluxograma 2**

**Tabela 4-** Protocolo de treinamento, aplicado durante 22 dias contínuos.

Semana	N.º de dias	Tempo (min)	Velocidade (m/min)
1	2*	10	5
		10	10
1-2	6*	30	5
		10	10
2	2	30	10
		10	15
2	5	10	10
		30	15
3	2	40	15
		5	20
3	5	40	20
		10	25

\* período de adaptação ao exercício.



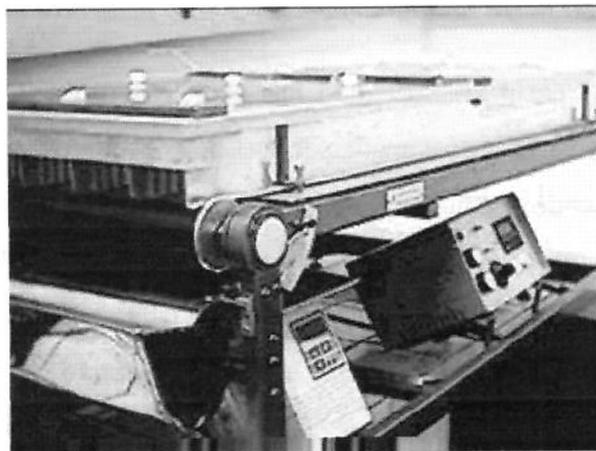
**Fluxograma 2-** Protocolo de treinamento utilizado durante o ensaio biológico.

Dois grupos dos animais previamente treinados, um em dieta com o hidrolisado e outro com isolado, foram submetidos ao treinamento exaustivo, correndo inicialmente a 25m/min, até atingirem a velocidade de 32,5m/min. O tempo necessário para cada rato atingir a exaustão foi devidamente registrado, sendo considerada a exaustão o momento em que o rato não mais conseguia sair da base da esteira, permanecendo em choque constante. Os ratos restantes não foram submetidos a exaustão.

## 2.6 Características do treinamento físico

O treinamento físico ocorreu durante todas as manhãs, de Segunda a Segunda, entre 8:30 e 13:30 horas. Divididos em 6 grupos de 10 ratos cada, 4 grupos eram sempre submetidos ao treinamento físico em esteira rolante (**Figura 3**), enquanto os animais controle permaneciam em suas gaiolas.

Os ratos passaram por um período de adaptação ao exercício, em velocidade mais baixa, conforme indicado na **Tabela 4**. Quando em exaustão na base da esteira, os ratos permaneciam em choque constante. Desta forma, os animais eram estimulados a correr. O monitoramento contínuo era necessário para evitar que ratos menos adaptados permanecessem em choque constante, caso ficassem na base da esteira por muito tempo. Quando isso ocorria, os ratos eram estimulados a retomar o ritmo adequado de treinamento.



**Figura 3.** Esteira rolante utilizada para o treinamento dos animais experimentais.

## 2.7 Esquema experimental para o teste de exaustão

Grupos de cinco animais, aleatoriamente removidos das categorias “Isolado” (IE) e “Hidrolisado” (HE) eram levados para a esteira e submetidos à atividade exaustiva. Mediu-se o lactato sanguíneo em amostras de sangue caudal nestas categorias logo após a exaustão. Os ratos foram sacrificados 48 horas após a exaustão, para a retirada de tecidos e determinação dos outros parâmetros.

## 2.8 Análises das proteínas

*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 amino primários (Adler-Nissen, 1979).

Este método consiste em um ensaio espectrofotométrico que forma um cromóforo pela reação do TNBS com aminas primárias (Anexo 1).

*Determinação do perfil aminoacídico das fontes protéicas utilizadas nas dietas*

Para análise do perfil aminoacídico das proteínas do isolado e de seu hidrolisado foram retiradas amostras de aproximadamente 32mg, submetidas a hidrólise ácida com solução 6N de HCl, sendo a ampola fechada com maçarico e colocada em estufa a 110°C, por 22 horas. Após retiradas da estufa, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente, e retiradas da ampola para filtração. Do material filtrado, 100µL foram para o dessecador ligado a uma bomba de vácuo até a secagem total (3 a 6 horas). Em seguida o conteúdo foi diluído para 300µL com o diluente citrato de sódio (pH 2,2). As amostras foram então congeladas até serem injetadas no analisador de aminoácidos.

A composição qualitativa e quantitativa dos aminoácidos foi feita em cromatógrafo Thermo-Separation Products (Riviera Beach, Fla, U.S.A.) com coluna de troca iônica de resina poliestirênica sulfonada e detecção pós-coluna com niridrina (Pickering, Mountain View, U.S.A.; método de Spackman *et al.*, 1958). Coluna utilizada específica para aminoácidos, número 1193250, 3mm x 250mm, 8 $\mu$ m cation-exchange. O comprimento de onda utilizado para leitura foi de 570nm e 440nm, este último exclusivamente para a prolina.

## 2.9 Métodos e parâmetros bioquímicos

### *Dosagem da concentração de lactato sanguíneo*

Para a dosagem de lactato em amostras de sangue obtidas da cauda dos animais foi utilizado o lactímetro Accusport (Böehringer Mannheim GmbH Biochemica, Alemanha) (Fell *et al.*, 1998). A fita utilizada para a medição do lactato foi a BM-Lactate (Roche Diagnostics, GmbH Mannheim, Germany). Para os animais submetidos ao treinamento de exaustão, a medição foi realizada logo após a última sessão de treinamento. Já para os animais sedentários e os treinados sem exaustão, a coleta do sangue para determinação do lactato foi feita um pouco antes do sacrifício, objetivando-se a comparação entre a obtenção do lactato em repouso e logo após a exaustão.



**Figura 4:** Aparelho utilizado para medição de lactato sanguíneo.

### *Coleta de sangue e tecidos*

Após a anestesia com hidrato de cloral (10%), o sangue de cada animal foi obtido através de punção cardíaca e colocado em tubo de vidro sem anticoagulante. Os tubos contendo sangue dos animais permaneciam no gelo até o momento em que eram centrifugado a 3000rpm por 10-20 minutos. O soro obtido foi imediatamente congelado em biofreezer de N<sub>2</sub> a -195°C. Vale ressaltar que o tempo levado para que o sangue fosse centrifugado foi inferior a 1 hora do momento de sua coleta.

O músculo utilizado no ensaio foi o gastrocnêmio. O músculo foi extraído e colocado em nitrogênio para congelamento, e depois envolvidos em papel alumínio e armazenados em biofreezer de nitrogênio, para posterior análise.

### *Determinação de glicogênio muscular*

Amostras de gastrocnêmio foram retiradas, isolando-se um pedaço de aproximadamente 30mg. As amostras de músculo foram imediatamente transferidas para um prato de pesagem e toda gordura e tecido conectivo foram removidos com pinça e

tesoura cirúrgica. As amostras foram pesadas numa balança de torção de precisão “Roller-Smith” e transferidas com pinça tipo fórceps para o fundo de um tubo onde ficaram imersos em 0,5 mL de KOH a 30% saturado com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Os tubos eram mantidos em gelo até que todos fossem preenchidos e iniciada as análises.

A determinação de glicogênio muscular 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. Para a determinação do teor de glicogênio primeiramente se faz a extração do glicogênio muscular, e posteriormente a colorimetria.

A descrição do método aplicado se encontra no Anexo 2.

#### *Determinação de glicose sérica*

A determinação de glicose foi feita utilizando o kit da Laborlab S/A produtos para laboratórios (Guarulhos, SP), Glicose Liquid Stable, pelo método enzimático. A leitura foi feita em espectrofotômetro em 500nm de comprimento de onda (Henry, 1974).

#### *Determinação de proteínas séricas totais e albuminas séricas*

A determinação de proteínas totais e albuminas séricas foi feita através da utilização do kit PROTAL da Laborlab S/A produtos para laboratórios (Guarulhos, SP), pelo método colorimétrico. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540nm para proteínas totais, e à 625nm de comprimento de onda para albumina (Doumas *et al.*, 1971).

#### *Determinação da proteína muscular*

A determinação da proteína muscular foi realizada através do método colorimétrico empregado por Hartree (1971), em amostras úmidas do músculo gastrocnêmio. Tal método consiste numa variação do método de Lowry.

Para a obtenção da cor final azul da reação que ocorre com a proteína foram necessárias duas etapas distintas: primeiramente a reação da proteína com o cobre em solução alcalina, e depois a redução do reagente de Folin, originado de um complexo azulado. A intensidade da sua coloração é diretamente proporcional ao conteúdo de proteína.

Os procedimentos realizados encontram-se no Anexo 3.

### **2.10 Tratamento estatístico**

Os resultados foram submetidos à análise estatística usando o programa STATISTICA<sup>®</sup> para ambiente Windows<sup>®</sup>, 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.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O treinamento físico provoca estresse nos animais por causa do choque necessário para estimular o rato a permanecer correndo.

A utilização da esteira para o treinamento dos ratos demonstrou-se eficaz no seu propósito, e o choque localizado na base da esteira muito útil na fase inicial de adaptação dos ratos ao exercício físico.

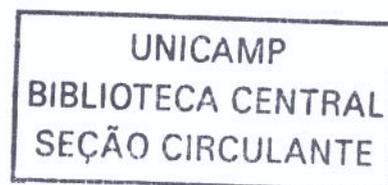
A duração total do ensaio foi de 35 dias. Tal período foi adotado como tempo mínimo para induzir as adaptações esperadas, com a obtenção dos resultados necessários para a realização do ensaio seguinte. Utilizou-se então somente àquela dieta capaz de proporcionar os melhores resultados de desempenho físico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

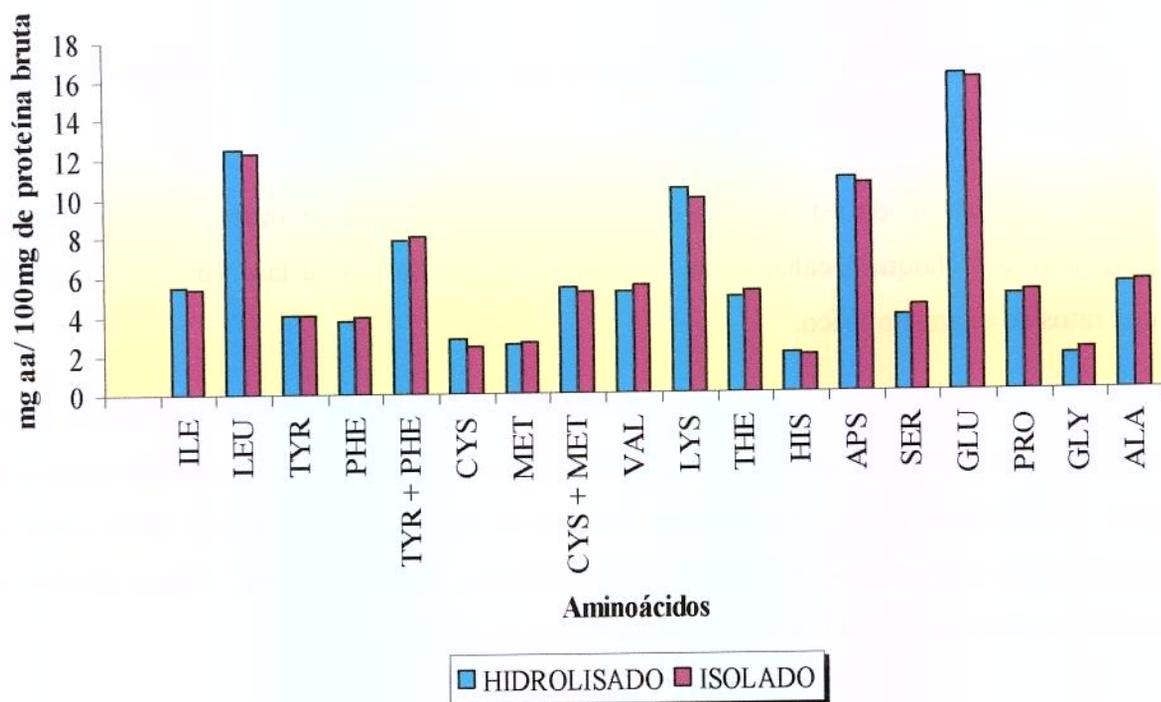
#### *Grau de hidrólise da proteína*

Através da análise por TNBS (Adler-Nissen, 1979), foi verificado o grau de hidrólise do proteólisado utilizado neste estudo, o ALATAL™817. O valor encontrado foi de 7,80%. O valor mencionado pelo fabricante foi de 10,0%.

Estudo realizado por Ramos (2001) trabalhando com proteína com alto grau de hidrólise (~30%) observou efeitos positivos em relação a eficiência e síntese protéica, contudo afirmou que os resultados poderiam ter sido ainda maiores se fosse utilizada uma proteína com menor grau de hidrólise, pois a concentração de aminoácidos livres no produto utilizado pode ter retardado a velocidade de absorção dessa fonte protéica. No estudo atual o desempenho na esteira foi sempre superior para a categoria **H** (hidrolisado).

#### *Perfil aminoacídico da proteína*





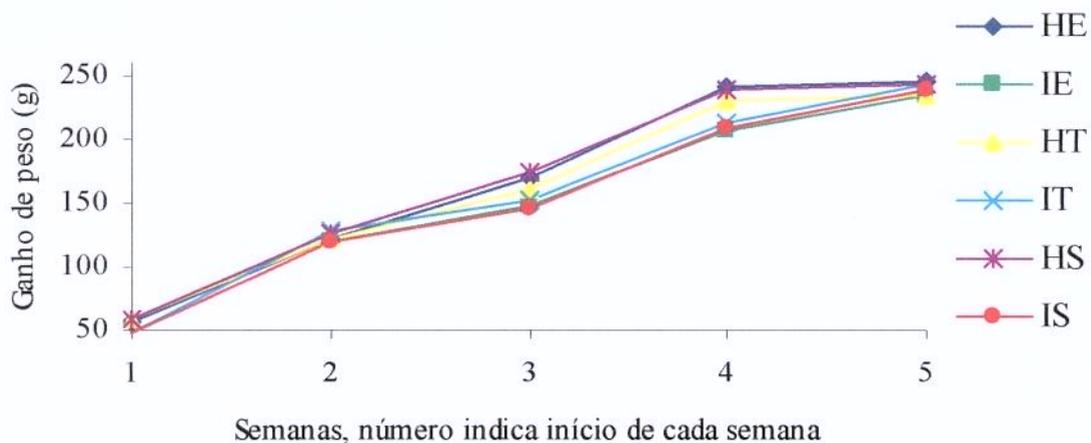
**Figura 5-** Perfil aminoacídico do Hidrolisado e Isolado protéico de soro de leite utilizados na dieta para os ratos em estudo.

A **Figura 5** mostra o perfil aminoacídico das proteínas utilizadas na dieta dos ratos no estudo. Nota-se que não houve grandes variações quanto ao fornecimento de aminoácidos nas diferentes fontes protéicas. As variações foram consistentes com a premissa de que as fontes protéicas oferecidas se diferenciam apenas quanto a forma físico-química nas quais os aminoácidos se encontravam.

### Evolução Ponderal

A utilização do hidrolisado com grau de hidrólise médio não acarretou diferenças em relação a evolução ponderal, quando comparada a proteína intacta. Mas o desempenho na esteira foi sempre superior para a categoria **H**.

Durante o período de dieta experimental (início da 2<sup>a</sup> semana, até fim da 4<sup>a</sup> semana) o crescimento foi considerado suave, contínuo e normal, não sendo verificada diferença significativa na evolução ponderal ( $p>0,05$ ) entre os grupos sedentários e treinados, assim como entre os dois tipos de proteína administrados. Foi possível então constatar que o treinamento físico utilizado não foi o suficientemente intenso (acima do limiar anaeróbio) para causar perturbação do apetite. Contudo, mesmo que sem diferença significativa, o ganho de peso dos grupos alimentados com o isolado mostrou uma pequena desvantagem em relação aos alimentados com o hidrolisado, nas semanas 3 e 4. Tal fato pode ser verificado no gráfico de evolução ponderal (**Figura 6**). Uma possível explicação para esta diferença poderia ser a maior velocidade de absorção, e a mais acelerada síntese de proteínas e de substratos energéticos que o hidrolisado pode promover, como foi observado por Boza *et al.* (2000) em animais submetidos à privação alimentar.



**Figura 6-** Evolução ponderal de Ratos Wistar alimentados com dietas experimentais durante o ensaio de 35 dias. **HT:** hidrolisado treinado, **IT:** isolado treinado, **HS:** hidrolisado sedentário, **IS:** isolado sedentário, **HE:** hidrolisado exaustão, **IE:** isolado exaustão.

O treinamento físico intenso é capaz de provocar diminuição do apetite (Stevenson, 1967; Oscai *et al.*, 1972; Parreira, 1993). Quando executado agudamente, o exercício também pode ser um agente causador de estresse (Azevedo, 1994). Ambos os resultados implicariam em alterações indesejáveis no sistema fisiológico neste caso. Stevenson (1967) sugere que a diminuição da ingestão alimentar ocorre porque o exercício físico intenso é capaz de estimular a quebra de glicogênio hepático, elevando a glicemia plasmática, e dessa forma gerando perda do apetite. O treinamento intermitente muitas vezes é mais intenso, pois consiste em sessões de curta duração, porém com velocidades maiores. Em treinamentos intensos o consumo alimentar, bem como o ganho de peso, são frequentemente inferiores nos grupos de animais treinados, podendo também haver alterações bioquímicas e teciduais indesejáveis.

A despeito disso, neste estudo trabalhou-se com o treinamento contínuo (realizado em velocidades sub-máximas e crescentes) (Molnar, 2000), o que de fato não provoca alterações no apetite (Stevenson, 1967), evitando-se qualquer interferência indesejável no consumo alimentar. Na ausência de interferência entre o exercício e o apetite em todos os grupos, é possível se estabelecer uma comparação mais fidedigna com relação à dieta entre os grupos sedentários e treinados (S e T).

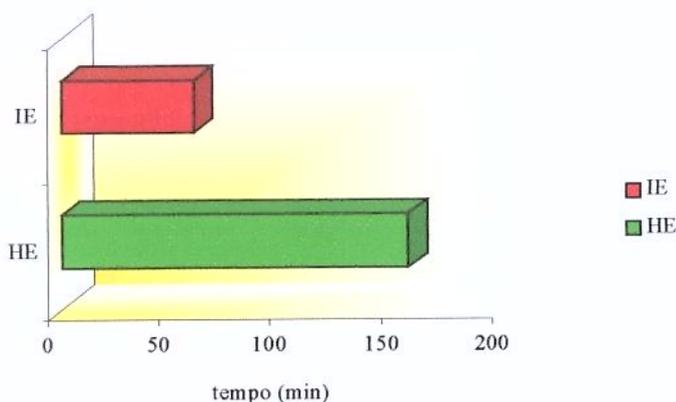
### *Balanço Nitrogenado*

Como esperado, as dietas elaboradas com o isolado e com o hidrolisado mostraram balanços de nitrogênio positivos, sendo de  $19,25g \pm 1,56$  para a dieta com o hidrolisado; e  $10,98g \pm 2,43$  para dieta com o isolado. Esta diferença, significativa ( $p < 0,0002$ ), foi registrada justamente no período em que os animais consumindo o isolado mostraram uma queda temporária no crescimento (semanas 3 e 4). 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 4ª e a 5ª semanas, levando a uma equiparação das duas dietas, a partir do final da 4ª semana.

*Ponto de exaustão e treinamento físico*

Foram levados ao treinamento exaustivo o grupo de ratos treinados consumindo o isolado (**IE**) e o da dieta com o proteolísado (**HE**), com a finalidade de comparar o desempenho físico em função das dietas. Os grupos restantes foram poupados do exercício exaustivo para permanecerem como controle.

O tempo de exaustão, considerado como o momento em que o rato não mais consegue se esquivar do choque constante, foi significativamente maior para os animais que receberam a dieta com o proteolísado ( $156\pm 18$  min), do que para os que receberam o isolado ( $60\pm 13$  min). Embora, não tenha sido observado problema maior na adaptação dos ratos ao treinamento, alguns animais mostraram certa dificuldade em se adaptar ao exercício físico, principalmente os do grupo em dieta com o isolado intacto. Esses ratos foram acompanhados de forma a se evitar a permanência no choque constante pois esse tipo de estresse não era desejado.



**Figura 7-** Os tempos médios de exaustão no teste físico final (**IE**: isolado exaustão, **HE**: hidrolisado exaustão).

Os tempos médios de exaustão no teste físico final mostram a vantagem proporcionada pelo hidrolisado. O fato de o ponto de exaustão para os ratos do grupo **H** ser

2,6× superior ao alcançado pelos ratos da categoria I é um resultado da ação conjunta da dieta e o treinamento. Embora não seja possível diferenciar ou separar os dois efeitos, os dados nos permitem concluir que as proteínas parcialmente hidrolisadas do lactossoro contribuíram para estender a capacidade natural da performance física do animal, independente de se a mesma foi potenciada pelo treinamento ou não.

A maior resistência dos animais que consumiram a dieta com a proteína hidrolisada é um achado até a presente data não encontrado na literatura. Essa diferença pode estar relacionada com a maior taxa de síntese pós-prandial de proteínas que, segundo o tipo e forma dos aminoácidos existentes na fonte protéica, pode ser promovido por uma ingestão-digestão-absorção rápida de aminoácidos (Boirie, 1997, Boza *et al.*, 2000). Se o proteolísado tende a ser digerido e absorvido mais rapidamente, tal associação poderia explicar, ao menos em parte, a maior eficiência dessa dieta quando comparada à dieta com a proteína intacta.

Foi sugerido por Tassi, (1996) em experiência com ratos submetidos à natação e alimentados com dietas contendo  $\alpha$ -lactalbumina e um hidrolísado enzimático, que os proteolísados enzimáticos na alimentação trazem vantagem física ao rato exercitado, em relação às proteínas intactas. Entretanto, experiências semelhantes realizadas posteriormente com o hidrolísado das proteínas conjuntas do lactossoro bovino não confirmaram tais observações (Ramos, 2001). A explicação para tal divergência de resultados aparentemente está no tamanho dos peptídeos que compõem os hidrolísados. As proteínas utilizadas por Ramos (2001) eram de grau de hidrólise elevado (~30%), enquanto que a  $\alpha$ -lactalbumina utilizada por Tassi (1996) tinha um grau de hidrólise de aproximadamente 15%. O proteolísado utilizado no presente experimento possuía 7,8%, bem menor que o grau da proteína adotada por Ramos (2001).

### *Determinações Sanguíneas*

A **Tabela 5** mostra os resultados das determinações sanguíneas de glicose, lactato, albuminas e proteínas séricas totais, para os diferentes grupos trabalhados.

**Tabela 5** – Parâmetros sanguíneos<sup>1</sup> obtidos para os diferentes grupos<sup>2</sup> de ratos.

Atividade Física→ Dieta→	Treinados (T)		Sedentários (S)		Exaustão (E)	
	H	I	H	I	H	I
Glicose (mg/100 mL)	117,90 <sup>ab</sup> (17,56)	113,30 <sup>ab</sup> (16,46)	101,15 <sup>b</sup> (13,10)	118,14 <sup>ab</sup> (28,57)	112,90 <sup>a</sup> (16,78)	126,94 <sup>ab</sup> (14,77)
Lactato <sup>3</sup> (nmol/L)	1,5 <sup>d</sup> (0,2)	2,1 <sup>b</sup> (0,3)	1,23 <sup>d</sup> (0,2)	2,2 <sup>c</sup> (0,6)	4,4 <sup>a</sup> (0,4)	5,1 <sup>c</sup> (0,2)
Albumina (g/dL)	4,42 <sup>a</sup> (0,34)	3,08 <sup>c</sup> (0,22)	3,99 <sup>b</sup> (0,35)	3,07 <sup>c</sup> (0,31)	4,08 <sup>ab</sup> (0,34)	3,22 <sup>c</sup> (0,31)
Proteínas séricas totais (g/dL)	6,77 <sup>a</sup> (0,38)	6,05 <sup>b</sup> (0,46)	6,03 <sup>b</sup> (0,45)	5,72 <sup>b</sup> (0,48)	6,79 <sup>a</sup> (0,54)	5,46 <sup>b</sup> (0,53)

<sup>1</sup> Valores correspondem às médias e desvio padrão (parênteses) de 10 animais por grupo. <sup>a b c d</sup> diferença significativa segundo teste Tukey.

<sup>2</sup> **HT**: hidrolisado treinado, **IT**: isolado treinado, **HS**: hidrolisado sedentário, **IS**: isolado sedentário, **HE**: hidrolisado exaustão, **IE**: isolado exaustão. Apenas os dados de lactato são imediatamente *post mortem*, os demais, após 48 horas de recuperação.

<sup>3</sup> Valores correspondem aos níveis determinados por ocasião do teste de exaustão para os grupos **HE** e **IE**.

Nota-se que os parâmetros dos animais submetidos o exercício exaustivo foram, de um modo geral, mais elevados. Embora as variações observadas entre o grupo **HE** e **IE** não tenham sido significativas, o resultado pode ser considerado favorável ao primeiro, justamente por causa de os animais do grupo **HE** terem se recuperado de um trabalhado 2,6 vezes mais do que os do grupo **IE**, em função do mais prolongado tempo de chegada à exaustão.

### *Glicose sérica*

As diferenças observadas nas glicemias dos ratos em resposta às dietas, segundo a análise de variância, foram pouco significativas ( $p > 0,0714$ ), sendo a glicemia dos ratos em estudo semelhante para os dois tipos de dieta, independente do nível de atividade. Houve apenas uma diferença numérica na glicemia dos ratos sedentários (**Tabela 5**). Tassi (1996), verificou diferença entre os resultados dos ratos que consumiram dieta com o hidrolisado, sendo para esses os níveis de glicose sérica sempre maiores que dos ratos alimentados com a proteína intacta, ou que a caseína. Porém, em seu estudo, essa autora determinou todos 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 resultados não devem ser considerados conflitantes. Ramos (2001) também não verificou diferença significativa para os níveis de glicose (24h após a exaustão), entre os grupos de ratos em treinamento físico submetidos à dieta com concentrado protéico de soro de leite, e seu hidrolisado de grau de hidrólise alto.

### *Lactato Sanguíneo*

A dieta com o hidrolisado protéico de soro de leite proporcionou um menor acúmulo de lactato sanguíneo, quando comparada aos resultados obtidos pela dieta com a proteína intacta  $p=0,0001$ . Para os diferentes níveis de atividade física, foi encontrada diferença significativa em relação aos ratos que foram para o treinamento exaustivo  $p=0,0001$ . Mas não entre os sedentários e treinados sem exaustão ( $p > 0,4166$ ), conforme esperado.

As determinações de lactato sanguíneo evidenciaram níveis mais altos de lactato para aqueles ratos pertencentes à categoria E, confirmando a relação conhecida entre a fadiga e a elevação dos níveis de lactato sanguíneo. (**Tabela 5**).

Com relação aos tipos de dietas oferecidas, nota-se que as concentrações de lactato, independentemente do nível de atividade física eram sempre menores nos ratos alimentados com o hidrolisado. Sabe-se que o treinamento físico submáximo reduz as concentrações de

ácido láctico para uma mesma carga de trabalho. No entanto, tal achado sugere uma adaptação melhor desse grupo, em função da dieta oferecida com o hidrolisado.

A manutenção de níveis baixos de ácido láctico é benéfica para o desempenho do indivíduo no exercício físico. Sumida *et al.* (1983), trabalhando com ratos treinados, observaram uma capacidade aumentada, em torno de 25%, para síntese de glicose a partir de lactato.

Gallani (1995) também verificou elevação significativamente 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.

Os ratos da categoria **I** deste estudo tiveram valores de lactato superiores aos **H**, e no treinamento exaustivo ambos foram submetidos à mesma sobrecarga de exercício, sendo que os animais **I** atingiram a exaustão antes que os do grupo **H**. O nível mais baixo de lactato para os ratos do grupo **HE**, pode ter sido a causa de a exaustão ter ocorrido em tempos mais dilatados neste grupo.

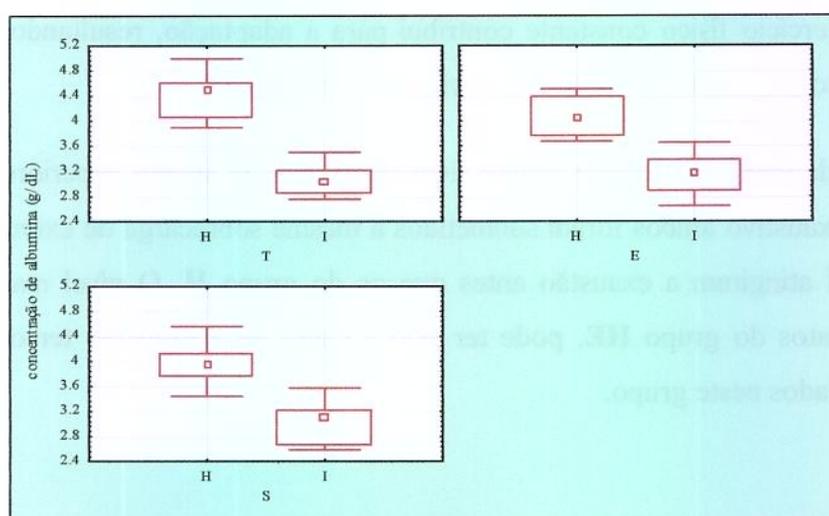
#### *Albumina e proteínas séricas totais*

A realização do teste de Tukey, evidenciou interação sempre significativa entre estas duas variáveis, atividade física e dietas ( $p < 0,042$ ). A dieta com o hidrolisado, porém, foi mais eficaz em manter os níveis de albumina sérica ( $p = 0,001$ , Tukey com relação à dieta). Já a dieta com o isolado não foi capaz de preservar os níveis de albumina, havendo uma diferença significativa dentro de cada uma das categorias (**T**, **S** e **E**). A análise de variância realizada para atividade física não demonstrou diferença significativa entre os diversos níveis ( $p > 0,0949$ ).

Observa-se também que os animais que consumiram a dieta com o hidrolisado acumularam maiores reservas de albumina sérica do que aqueles que consumiram o isolado, independente de serem treinados ou não. Esta afirmação foi verdadeira também

para os animais submetidos ao teste de exaustão, ou seja, o consumo do hidrolisado foi altamente favorável ao desenvolvimento melhores estoques de albumina sérica, mesmo com ausência de treinamento físico.

Tassi (1996), trabalhando com ratos treinados submetidos a dietas com caseína, proteína  $\alpha$ -lactalbumina intacta e hidrolisada, observou valores superiores de albumina sérica para os ratos alimentados com o hidrolisado. O presente estudo também verificou que a dieta com o hidrolisado foi sempre mais eficaz em preservar os níveis de albumina sérica, mesmo depois de um período de recuperação de 48h.



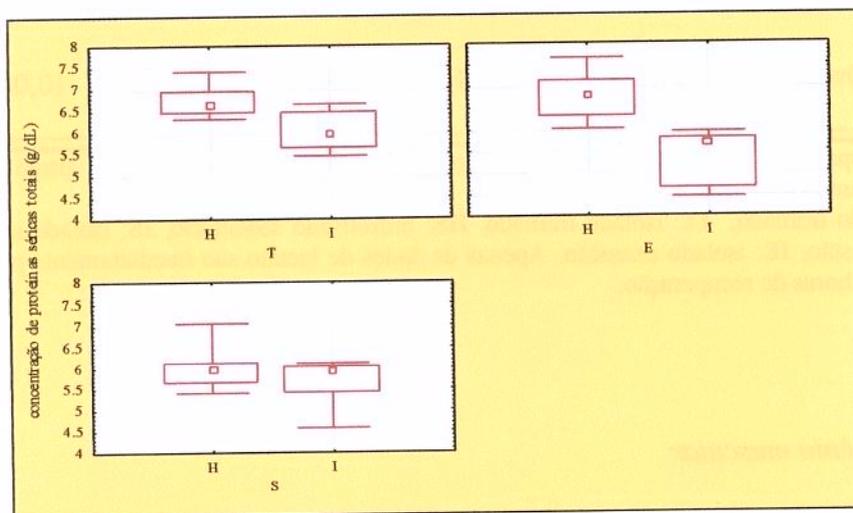
**Figura 8-** Concentração de albumina sérica (g/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas. **HT**: hidrolisado treinado, **IT**: isolado treinado, **HS**: hidrolisado sedentário, **IS**: isolado sedentário, **HE**: hidrolisado exaustão, **IE**: isolado exaustão.

Observação semelhante àquela feita para a albumina, foi feita para as proteínas séricas totais (**Tabela 5, Figura 9**). A dieta com o hidrolisado preservou os níveis de proteína totais, já a dieta com o isolado não atingiu tal benefício, havendo diferença significativa ( $p=0,0001$ ).

Em relação à atividade física só houve diferença significativa entre ratos treinados e sedentários ( $p=0,0025$ ;  $p>0,2492$  para os demais).

O teste de Tukey revelou diferenças entre os grupos em dieta com o hidrolisado e isolado para aqueles em treinamento, e submetidos à exaustão ( $p<0,016$ ), já entre os sedentários não houve diferença significativa para os diferentes tipos de dieta ( $p>0,070$ ).

Parreira (1993), trabalhando com ratos exercitados em dietas com diferentes teores de proteína, apesar de não encontrar diferenças significativas em seu estudo, observou que os ratos em dieta hipoprotéica apresentavam sempre níveis de albumina e proteínas séricas inferiores.



**Figura 9-** Concentração de proteínas séricas totais (mg/dL) nos diferentes grupos de atividade física e dietas. **HT:** hidrolisado treinado, **IT:** isolado treinado, **HS:** hidrolisado sedentário, **IS:** isolado sedentário, **HE:** hidrolisado exaustão, **IE:** isolado exaustão.

### *Determinações teciduais*

Os valores médios dos teores de glicogênio muscular e proteína muscular, obtidos a partir de amostras de tecidos de animais treinados e sedentários, submetidos a dois diferentes tipos de dieta, estão descritos na **Tabela 6**.

**Tabela 6** – Parâmetros musculares<sup>1</sup> obtidos para os diferentes grupos<sup>2</sup> de ratos.

Atividade Física→	Treinados		Sedentários		Exaustão	
	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>H</b>	<b>I</b>
Glicogênio muscular	0,10 <sup>a</sup>	0,10 <sup>ab</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0,08 <sup>ab</sup>
(mg/100mg)	(0,01)	(0,04)	(0,02)	(0,02)	(0,02)	(0,03)
Proteína muscular	1,25 <sup>a</sup>	1,20 <sup>a</sup>	1,23 <sup>a</sup>	1,20 <sup>a</sup>	1,22 <sup>a</sup>	1,20 <sup>a</sup>
(mg/100mg)	(0,07)	(0,08)	(0,10)	(0,13)	(0,08)	(0,11)

<sup>1</sup> Valores correspondem às médias e desvio padrão (parênteses) de 10 animais por grupo. <sup>a b</sup> diferença significativa segundo teste Tukey.

<sup>2</sup> **HT**: hidrolisado treinado, **IT**: isolado treinado, **HS**: hidrolisado sedentário, **IS**: isolado sedentário, **HE**: hidrolisado exaustão, **IE**: isolado exaustão. Apenas os dados de lactato são imediatamente *post mortem*, os demais, após 48 horas de recuperação.

### *Glicogênio muscular*

No que tange aos tipos de dietas oferecidas, após o período de recuperação, não foi verificada diferença estatística entre os grupos, sendo o  $p$  da ANOVA=0,2062 para essa variável. No entanto, para os diferentes níveis de atividade física houve diferença significativa na análise de variância entre **IS**, **HT** e **HE** sendo  $p<0,04$ , segundo o teste Tukey.

A depleção de glicogênio depende da intensidade e duração do exercício imposto. Contudo, o treinamento por longos períodos tende a promover alterações metabólicas clássicas, resultando na formação de maiores estoques de glicogênio muscular em grupos treinados, em relação a animais sedentários (Azevedo, 1994). Os resultados obtidos são consistentes com o fato de que animais treinados tendem a apresentar valores mais elevados

de glicogênio muscular após a exaustão, em comparação com aqueles sedentários (**Tabela 6**).

Após 48h de recuperação, mesmo sem diferença significativa, o estudo atual também verificou que a dieta contendo o hidrolisado foi mais eficaz em preservar os níveis de glicogênio muscular do que aqueles alimentados com o isolado intacto.

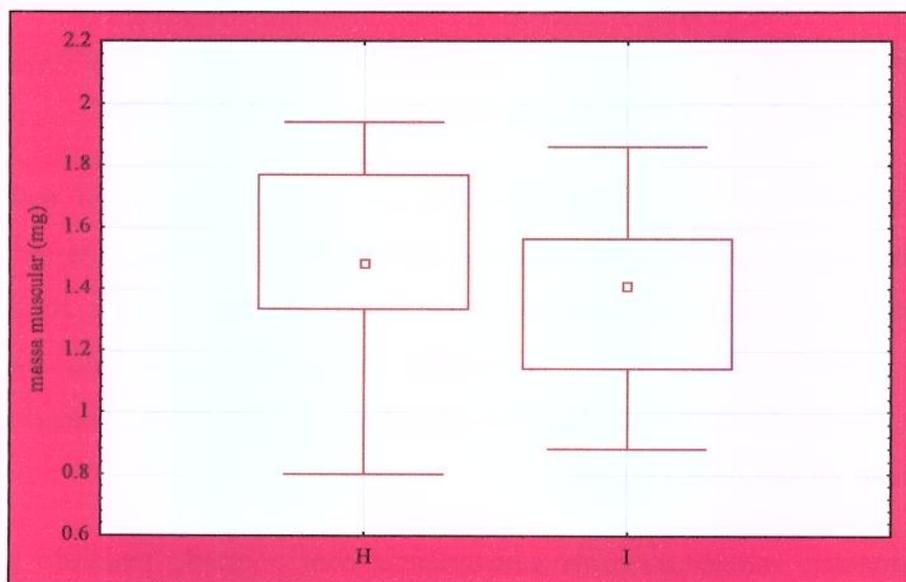
Imediatamente após o teste exaustivo, os níveis de glicogênio muscular estão normalmente baixos, no entanto a existência de uma proteína hidrolisada na alimentação pode amenizar as perdas dos estoques. Tassi (1996) atribuiu a maior concentração de glicogênio muscular pós-exaustão encontrada no grupo consumindo dieta com o hidrolisado, a uma gliconeogênese hepática aumentada, que pouparia o glicogênio muscular e liberaria mais glicose para o plasma.

O presente estudo apresenta concordância com o estudo realizado por Gobatto (1993) e Host *et al.* (1998), no sentido de que as concentrações de glicogênio muscular, foram sempre mais baixas, para as categorias **T** e **E**, em relação a categoria **S**.

### *Proteína muscular*

Após um período de recuperação de 48h, os níveis de proteína muscular, por grama de músculo, não mostraram alteração em função da dieta, assim como tampouco sofreram alteração pela atividade física, sendo sempre  $p > 0,2084$ . Entretanto, os resultados da massa muscular total indicaram que o hidrolisado teve um efeito positivo, quase significativo pelo critério padrão de significância ( $p = 0,0524$ ), como indicado pelas quantidades de proteína do músculo gastrocnêmio inteiro (**Figura 10**). As proteínas do soro lácteo são conhecidas por terem um efeito estimulador do aumento da massa muscular, em relação ao exercício físico. Agin *et al.* (2001), trabalhando com portadores do HIV submetidos a atividade física e em dieta com o soro lácteo, observaram aumento no conteúdo de massa muscular em função da alimentação com o soro lácteo. Com os resultados do estudo atual, é possível afirmar que se as proteínas do soro lácteo são, ao menos em parte, responsáveis pelo efeito

estimulador do desenvolvimento da massa muscular, as parcialmente hidrolisadas são ainda mais efetivas.



**Figura 10-** Conteúdo de massa muscular (total do tecido) para os diferentes tipos de dieta.

Parreira (1993), trabalhando com animais treinados e sedentários, com dietas com diferentes teores de proteína, obteve elevação significativa para proteína muscular somente para os ratos alimentados com dieta hiperprotéica e treinados.

Tassi (1996) e Ramos (2001) não observaram diferenças significativas no conteúdo muscular de proteínas para os diferentes tipos de dietas, nem tampouco para os diferentes níveis de atividade física. O presente estudo também não verificou diferenças significativas do conteúdo de proteína muscular por grama de músculo (teor protéico), apesar de os valores para os ratos em dieta **H** terem sido sempre superiores aos dos ratos em dieta **I**. Tendo em vista que, mesmo em caso de desgaste (*wasting*), a composição do músculo poderia permanecer constante, foi de interesse examinar a possibilidade de alteração da massa muscular total. Neste sentido, as determinações de proteína na peça inteira dos gastrocnêmios evidenciaram diferenças sensíveis. Tal fato indica que o consumo do hidrolisado resultou em aumentos significativos ( $p=0,0524$ ) da massa muscular, em níveis de probabilidade ligeiramente superiores ao do critério padrão.

#### 4. CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho permitem chegar às seguintes conclusões:

1. A dieta com o hidrolisado (**H**) protéico de grau de hidrólise médio foi mais eficaz em promover um melhor desempenho físico em animais treinados, como foi evidenciado pela resistência à exaustão.
2. Foi constatado que a ingestão dos produtos da hidrólise parcial das proteínas do soro lácteo promove alterações metabólicas capazes de reduzir as concentrações de lactato sanguíneo.
3. Após recuperação dos animais por 48 horas, não foram detectadas diferenças significativas nos níveis glicêmicos.
4. Os níveis séricos de albumina e proteínas totais mostraram diferenças altamente favoráveis em função do hidrolisado (**H**). O animal alimentado com o hidrolisado desenvolveu maiores estoques de albumina sérica, os quais se mantiveram sempre mais elevados, mesmo depois da exaustão física. Efeito semelhante foi observado para as proteínas totais, excetuando-se o grupo sedentário.
5. Embora as dietas não tenham apresentado influência no teor de glicogênio, após o período de recuperação, o nível de atividade mostrou claramente que os animais sedentários formaram menores estoques de glicogênio muscular.
6. Não se encontrou diferença qualquer no teor protéico (composição) muscular entre os diversos tratamentos. Entretanto, os teores encontrados no gastrocnêmio inteiro, indicaram que houve um aumento não desprezível na massa muscular do rato alimentado com o hidrolisado.
7. Por outro lado, o consumo do hidrolisado do soro de leite bovino por um período de quatro semanas não parece ter ocasionado alterações desfavoráveis no metabolismo protéico, como testemunhado pelos parâmetros avaliados, a não ser um aumento na capacidade do animal de utilizar a proteína semi-digerida, traduzindo-se numa maior performance física transitória.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6):1256-1262, 1979.
- Agin D, Gallagher D, Wang J, Heymsfield SB, Pierson RN, Kotter DP. Effects of Whey protein and resistance exercise on body cell mass, muscle strength, and quality of life in women with HIV. *AIDS*, Philadelphia, 15:2431-2440, 2001.
- Azevedo JRM. *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.
- Brink W. Fighting cancer with whey. *Life Extension Report*. 13-15, nov., 1997. Acesso em 25/05/2002. Disponível em: <[http://www.lef.org/magazine/mag97/mag97\\_11.html](http://www.lef.org/magazine/mag97/mag97_11.html)>
- Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrere B. Slow and fast dietary proteins differentially modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 94: 14930-14935, 1997.
- Bounous G, Gold P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clinical and investigative medicine*, Berlin, 14(4): 296-309, 1991.
- Boza JJ, Moennoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Galdard de Werk. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *European Journal of Nutrition*, "S.L.", 39(6): 237-243, 2000.
- Clare DA, Swaisgood HE. Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 83: 1187-1195, 2000.
- Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clinical Chimica Acta*. Amsterdam, 31:87-96, 1971.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization ). Amino-acid content of foods and biological data on proteins. FAO Nutritional Studies, Roma, v. 24, 1970.

Fell JW, Rayfield JM, Gulbin JP, Gaffney PT. Evaluation of the Accusport® Lactate analyser. *International Journal of Sports Medicine*, Stuttgart, 19: 199-204, 1998.

Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington DC, 44(1): 6-29, 1996.

Gallani MCBJ. *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.

Gobatto CL. *Alterações metabólicas decorrentes do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados*. Campinas, 1993. 122p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

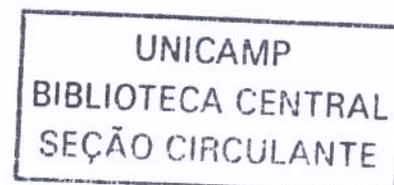
Hartree E F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, New York, 48: 422-427, 1971.

Henry RJ. *Clinical Chemistry Principles and Techniques*, 2ª edição. Hargeston: Harper & Row, 1974.

Horwitz W., ed. *Official methods of analysis*. 12 ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1975, 1094p.

Host H H, Hansen P A, Nolte L A, Chen M M, Holloszy J O. Glycogen supercompensation masks the effect of a training-induced increase in GLUT-4 on muscle glucose transport. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 85(1): 133-138, 1998.

Lo SL, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 28(2): 234-236, 1970.



Molnar AM. *Padronização da técnica de BN-page e coloração histoquímica dos complexos I e IV da cadeia de transporte de elétrons em diferentes músculos de rato*. Campinas, 2000. 76p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

Oscari LB, Spirakis CN, Wolff CA. Effects of exercise and food restriction on adipose tissue cellularity. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, 13: 588, 1972.

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

Pellet PL, Young VR. *Nutritional evaluation of protein foods*. Tokyo: The United Nations University, 1980. 154p.

Ramos AG. *Utilização das proteínas do soro lácteo por ratos jovens*. Campinas, 2001. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, Philadelphia, 123:1939-51, 1993.

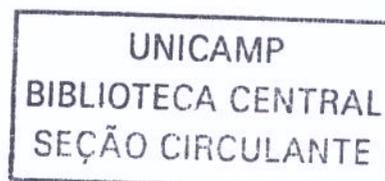
Sgarbieri V. C. Fontes de proteínas na alimentação, In: *Proteínas em alimentos protéicos*. São Paulo, SP. Ed. Livraria Varela, 1996.

Spackman DC Stein WH, Moore S. A recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Biochemistry*, New York, 30: 11190-1206, 1958.

Stevenson JAF. Exercise, food intake and health in experimental animals. *Canadian Medicine Association Journal*, "S.L.", 96: 862-866, 1967.

Sumida KD, Urdiales JH, Donovan CM. Enhanced gluconeogenesis from lactate in perfused livers after endurance training. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 74: 782-787, 1983.

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





---

**CAPACIDADE DE RECUPERAÇÃO DO RATO FISICAMENTE  
EXAURIDO QUANDO ALIMENTADO COM O PROTEOLISADO DO SORO  
LÁCTEO COM GRAU DE HIDRÓLISE MÉDIO**

Fernanda Motta Veiga Pimenta

**RESUMO**

As proteínas do soro do leite são tidas como proteínas de rápida absorção e metabolismo, o que justifica a sua possível utilização como suplemento para a alimentação de atletas. O presente estudo teve por objetivo verificar a eficácia metabólica do proteolisado do soro lácteo na otimização do desempenho físico, determinada pela capacidade de recuperação do animal exaurido. Sabe-se que as proteínas do soro de leite vêm recentemente sendo amplamente utilizadas por atletas, em função de seu alto valor biológico. Contudo, não se sabe ainda o melhor grau de hidrólise dessas proteínas capaz de proporcionar resultados benéficos ao exercício físico. Para este ensaio biológico foram utilizados ratos Wistar, a dieta foi elaborada de acordo com as normas da AIN-93G modificada. O Experimento foi planejado visando comparar o desempenho físico e alguns parâmetros bioquímicos de grupos de ratos Wistar. Ao atingirem aproximadamente 100g, os ratos foram submetidos a dieta experimental, e permaneceram durante um período de 9 semanas em treinamento contínuo (*endurance*) em esteira, sendo o grupo controle constituído de ratos sedentários. Após período de treinamento os ratos foram submetidos a exaustão e a capacidade de recuperação do animal exaurido foi avaliada. Para análise foram monitorados a evolução ponderal, o tempo de exaustão, lactato sanguíneo, e através de kits laboratoriais, a glicose sérica, albumina e proteínas séricas totais. Em análise tecidual foi medido o glicogênio muscular (gastrocnêmio e sóleo) e proteína muscular (gastrocnêmio). Observou-se que o ponto de exaustão dos animais da categoria treinados (T) foi atingido bem depois da categoria sedentários (S) ( $79 \pm 16$  vs.  $42 \pm 14$  min, respectivamente). Em relação aos níveis de glicose, não houve variação significativa entre categorias ( $p > 0,1784$ ). Quanto aos níveis de lactato sanguíneo foi encontrada diferença significativa para as categorias não submetidas ao treinamento exaustivo ( $p < 0,0002$ ), quando comparadas

---

àquelas levadas ao treinamento exaustivo, com valores bastante próximos ( $p > 0,1192$ ). Para os níveis de albumina e proteínas séricas totais, não foram encontradas diferenças significativas entre as categorias **TM** e **TER48** ( $p=1$ ;  $p=0,356$  respectivamente). Para o glicogênio muscular houve diferenças entre os dados obtidos no gastrocnêmio e sóleo, em função das diferentes fibras musculares e funções. Para o gastrocnêmio as médias variaram muito entre diferentes tratamentos, sendo sempre  $p \leq 0,0008$ , os resultados tendem a favorecer o grupo em dieta com o hidrolisado. Quanto ao sóleo, após 24 horas do exercício exaustivo os ratos possuíam valores médios de glicogênio muscular próximos aos daqueles não exauridos ( $p=0,125$ ). Não foram encontradas diferenças significativas para os níveis de proteína muscular ( $p \geq 0,7421$ ). Os resultados sugerem que a dieta com o proteolizado de grau de hidrólise médio foi capaz de promover uma recuperação 48 horas após exercício exaustivo e que o treinamento físico foi suficientemente intenso para produzir alterações metabólicas referentes à utilização de substratos energéticos.

**Paravras-chave:** performance física, proteína do soro, hidrolisado, ratos, recuperação.

**ABSTRACT**

Whey proteins are known to have rapid absorption and metabolism, which in itself is a good reason for its use as a food supplement for athletes. The present study is aimed at verifying the metabolic efficiency of the whey protein hydrolysates in order to optimise physical performance, determined by the recovery capacity of exhausted experimental animals. It is known that these milk proteins have already been used by athletes because of their high biological value. Nevertheless the optimum hydrolysis level of these proteins to maximise their benefits, during physical exercise is not yet known. For this biological experiment Wistar rats were used, fed with a modified diet in accordance to the AIN-93G norm. The study was planned with the aim of comparing the physical performance and some biochemical parameters of segregated groups of Wistar rats. When achieving approximately 100g, the animals were submitted to the experimental diet and continuous training (endurance) in a treadmill for 9 weeks, with a control group consisting of sedentary rats. After the training period, they were then taken to exhaustion in order to evaluate their capacity to recover. For such evaluation a series of key analysis were carried out, such as the weight evolution, time to reach exhaustion, blood lactate, seric glucose and total seric proteins and albumin. Muscular glycogen and protein were determined through the analysis of collected tissues from the Soleum and Gastrocnemius muscles. A positive observation was made on the longer time to exhaustion reached by the trained group (T), as opposed to a shorter period displayed by the sedentary rats (S) ( $79\pm 16$  vs.  $42\pm 14$  min, respectively). In relation to glucose levels, there was no expressive difference between the groups ( $p > 0,1784$ ). As for blood lactate levels, a significant difference was found for the groups not exposed to exhaustive training ( $p < 0,0002$ ), with similar levels between those exposed to such training ( $p > 0,1192$ ). Total seric albumin and Protein levels, did not differ between groups TM and TER48 ( $p = 1$ ;  $p = 0,356$  respectively). For muscular glycogen there were differences between data analysed from Soleum and Gastrocnemius muscles, because of the distinct fibres and muscular functions. In Gastrocnemius tissues the averages had great dispersions between the different treatments, with  $p \leq 0,0008$  always. As far as the Soleum muscle was concerned, after 24 hours exhausting treatment the animals had average levels of muscular glycogen very similar to those of the rats not submitted to such

training ( $p=0,125$ ). No significant difference was found for muscular proteins ( $p>0,7421$ ). These results suggest that the diet based on the whey protein with a medium hydrolysis level was able to promote a full recovery after 48 hours from exhaustive training. Furthermore the physical training was sufficiently intense to produce metabolic alterations relating to the use of energetic substrates.

**Key words:** physical performance, whey protein, hydrolysate, rats, recovery.

## 1. INTRODUÇÃO

O papel das proteínas, como fonte energética para atletas, por muito tempo foi relegado a um segundo plano, e em contrapartida muito se estudava sobre o efeito dos carboidratos e lipídeos no exercício físico. Contudo, com o passar dos anos, o interesse pelas proteínas foi aumentando, e hoje, o papel das proteínas já é amplamente reconhecido. Mais recentemente, as proteínas do soro do leite tem sido bastante estudadas, e não mais têm sido consideradas como produto para descarte (Lemom, 1995; McIntosh *et al.*, 1998).

O treinamento físico contínuo em animais de laboratório promove adaptações musculares. Desta forma, os músculos dos animais exercitados se tornam mais resistentes ao estresse causado pelo exercício, do que músculos de animais sedentários (Hermano & Manso, 1997).

O consumo da proteína de soro de leite hidrolisada tem sido associado à melhor capacidade de preservar o glicogênio muscular, glicose e albumina sérica, para ratos em atividade física (Tassi, 1996). Uma provável explicação para tal fato seria a velocidade com que essas proteínas são digeridas e absorvidas pelo intestino.

Van Loon *et al.* (2000) verificaram que a ingestão de proteína hidrolisada do soro de leite e carboidrato proporcionaram um aumento nos níveis de insulina, em comparação com o grupo controle, suplementado somente com carboidrato.

A eficácia das proteínas do soro do leite em relação à outras fontes protéicas para a atividade física já foi devidamente comprovada. As dúvidas ainda existentes tangem a melhor forma de se oferecer tais proteínas. No artigo 1 deste mesmo estudo, foi realizada uma pesquisa comparando a utilização das proteínas do soro intactas e hidrolisadas, durante o exercício físico. A partir dos resultados obtidos foi elaborado um segundo ensaio biológico, descrito no atual capítulo, utilizando-se somente a proteína hidrolisada, uma vez comprovada sua superioridade frente à sua forma intacta.

O exercício intenso proporciona um aumento na síntese de proteína muscular, bem como a degradação desta mesma proteína no pós exercício. Estudos recentes têm

---

demonstrado no entanto que a suplementação de proteínas acarreta em um aumento ainda melhor no balanço entre síntese e degradação de proteínas musculares pós exercício (Tipton *et al.*, 1999).

Um fator importante quando se estuda a influência da dieta no desempenho físico é o tempo necessário para que tal resultado seja obtido. Ramos (2001) trabalhando com as proteínas do soro de leite com alto grau de hidrólise e atividade física por um curto período, não encontrou resultados significativos que pudessem relacionar o benefício do segundo parâmetro em relação ao primeiro. O autor sugeriu que pesquisas por períodos mais prolongados fossem realizadas.

Partindo dessa premissa, o estudo atual utilizou um protocolo de treinamento mais longo, adotado anteriormente por Zoppi (1999).

Este experimento consistiu em submeter ratos ao treinamento esportivo em esteira, tendo como controle de atividade física o grupo sedentário. Ao final do período de treinamento os ratos foram submetidos ao exercício exaustivo. A recuperação foi avaliada após 24 e 48 horas em resposta à utilização do hidrolisado protéico do soro lácteo com grau de hidrólise médio, como única fonte de proteína da dieta.

---

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Ensaio Biológico

O ensaio utilizou 60 ratos albinos machos da linhagem Wistar SPF, recém-desmamados (28 dias,  $78,5g \pm 16$ ), procedentes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As condições ambientais do Laboratório foram controladas para proporcionar temperatura e umidade relativa de  $22 \pm 2^{\circ}C$  e 50-60%, respectivamente, e ciclo de luz invertido de 12 horas. Os animais foram mantidos em gaiolas de crescimento individuais, com dieta não purificada de fórmula fechada (Nuvital para roedores, Curitiba, Brasil) e água com livre acesso, até atingirem aproximadamente 100g. Até este período os ratos permaneceram no biotério do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição (DEPAN/ UNICAMP) e durante as 9 semanas seguintes os ratos permaneceram no biotério do laboratório de bioquímica do exercício (5 ratos por gaiola, Instituto de Biologia, UNICAMP), para o treinamento e testes de atividade física. Ao serem transferidos para o Instituto de Biologia os ratos foram novamente pesados e submetidos a um período de 9 semanas de ensaio, sendo os 7 primeiros dias para adaptação à dieta experimental AIN 93-G modificada.. O período total de ensaio biológico foi de 10 semanas. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP.



**Figura 1:** Gaiola individual de crescimento utilizada na primeira fase do ensaio.



**Figuras 2 e 3:** Gaiolas conjuntas, nas quais os ratos permaneceram na segunda fase do ensaio.

## 2.2 Dietas experimentais

Foi oferecida 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 o proteólisado do soro de leite de vaca (ALATAL™ 817), da NZMP™, fornecedor global de ingredientes lácteos (Wellington, N.Z.), contendo um grau de hidrólise de 7,8% (GH médio).

A escolha por se trabalhar com esse proteolísado originou de trabalho anterior, com a mesma proteína, e que constatou que a dieta com o hidrolísado foi mais eficaz em promover um melhor desempenho físico nos animais treinados com tal dieta, como evidenciado pela resistência à exaustão, bem como pelas desejáveis alterações metabólicas obtidas. Assim sendo, esse segundo ensaio foi realizado somente com a proteína capaz de proporcionar melhores resultados ao animal treinado.

### 2.3 Composição das dietas

A composição da dieta experimental (**Tabela 1**), bem como da mistura mineral (**Tabela 2**) e vitamínica (**Tabela 3**) encontram-se a seguir.

**Tabela 1-** Composição das dietas (g/kg de dieta) utilizada no ensaio biológico por um período de 10 semanas.

Ingredientes	
	g
Amido de milho	475,24
Amido dextrinizado	151,57
Sacarose	97,89
Hidrolísado protéico	139,68
Óleo vegetal	39,82
Fibra	48,89
Mistura mineral	34,16
Mistura vitamínica	9,95
Bitartarato de colina	2,44
Tert-butilhidroquinona	0,0078

**Tabela 2-** Composição da mistura mineral (AIN-93G) utilizada na elaboração da dieta experimental.

Ingredientes	Quantidade
	(g/kg de mix)
Carbonato de cálcio, anidro, 40.04% Ca	357,00
Fosfato de potássio, monobásico, 22.76% P; 28.73% K	250,00
Cloreto de sódio, 39.34 % Na; 60.66% Cl	74,00
Sulfato de potássio, 44.87% K; 18.39% S	46,60
Citrato de potássio, tri-potássio, monoidratado, 36.16% K	28,00
Óxido de magnésio, 60.32% Mg	24,00
Citrato férrico, 16.5% Fe	6,06
Carbonato de zinco, 52.14% Zn	1,65
Carbonato de manganês, 47.79% Mn	0,63
Carbonato cúprico, 57.47% Cu	0,30
Iodeto de potássio, 59.3% I	0,01
Selenito de sódio, anidro, 30.03% Se	0,01025
Paramolibdato de amônia, tetraidratado, 54.34% Mo	0,00795
Metasilicato de sódio, nonaidratado, 9.88% Si	1,45
Sulfato de potássio e crômio dodecaidratado, 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
Vanadato de amônia, 43.55%	0,0066
Sacarose em pó	209,806

**Tabela 3-** Composição da mistura vitamínica (AIN-93G) utilizada na elaboração da dieta experimental.

Ingredientes	Quantidade
	g/kg de mix
Ácido Nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina-HCl	0,700
Tiamina-(1 nitrato)	0,645
Riboflavina (a 80%)	0,750
Ácido fólico	0,200
D-biotina (2% em CaCo3)	1,000
Vitamina B-12 (cianocobalamina) (a 1% em maltodextrina)	0,250
Vitamina E (all-rac- $\alpha$ -tocoferil acetato) (500 UI/g)	15,000
Vitamina A (all-trans-retinil palmitato) (500.000 UI/g)	0,800
Vitamina D3 (colecalfiferol) (500.000 UI/g)	0,200
Vitamina K (filoquinona)	0,075
Açúcar refinado (ou dextrina)	975,780

A dieta experimental, elaborada para fornecer uma concentração de proteína de 12% foi introduzida no início da segunda semana de ensaio, e mantida até o final, perfazendo um total de 10 semanas. A composição centesimal obtida da dieta, após análises laboratoriais, é mostrada na **Tabela 4**. As análises foram feitas com as determinações em triplicata.

**Tabela 4-** Composição centesimal da dieta experimental utilizada no ensaio de recuperação com o proteolísado.

Dieta %	Proteína	Lípídeo	Carboidrato	Sólidos totais	Umidade	Cinzas
Hidrolísado	11,76	7,06	68,84	73,13	8,03	4,31

A determinação de nitrogênio e proteína bruta foi feita pelo método semi-micro de Kjeldahl, descrito pela AOAC (1990). Sólidos totais e umidade, e cinzas também pelos métodos descritos pela AOAC (1990). Lipídeos totais foram determinados pelo método de Bligh & Dyer (1959). Quanto aos carboidratos, sua determinação foi feita através de cálculos matemáticos, a partir da determinação das porcentagens de umidade, cinzas, proteína bruta e lipídeos.

## 2.4 Separação de grupos e controle da evolução ponderal

Ao serem recebidos os ratos foram pesados, numerados e separados em 6 grupos diferentes.

A divisão dos ratos em diferentes grupos pode ser vista pelo **Fluxograma 1**.



**Fluxograma 1-** Divisão dos grupos experimentais, conforme dieta e atividade física.

---

Durante o período de treinamento os ratos foram pesados em balança eletrônica a cada 7 dias, inclusive no dia do sacrifício.

Neste segundo ensaio não foi realizado o balanço nitrogenado, já obtido no primeiro ensaio para a mesma dieta experimental com o proteolísado. Neste experimento também não foi acompanhada a ingestão alimentar dos ratos, pois os mesmos somente permaneceram em gaiolas de crescimento individuais por uma semana.

### **2.5 Protocolo de treinamento**

Primeiramente, foram definidos os grupos de animais a serem treinados e aqueles sedentários. Os animais foram separados em 6 grupos, conforme descrito anteriormente. Dos 6 grupos existentes 4 foram submetidos ao exercício físico objetivando a avaliação do desempenho em resposta à dieta oferecida, utilizando-se 2 grupos de ratos sedentários como forma de controle.

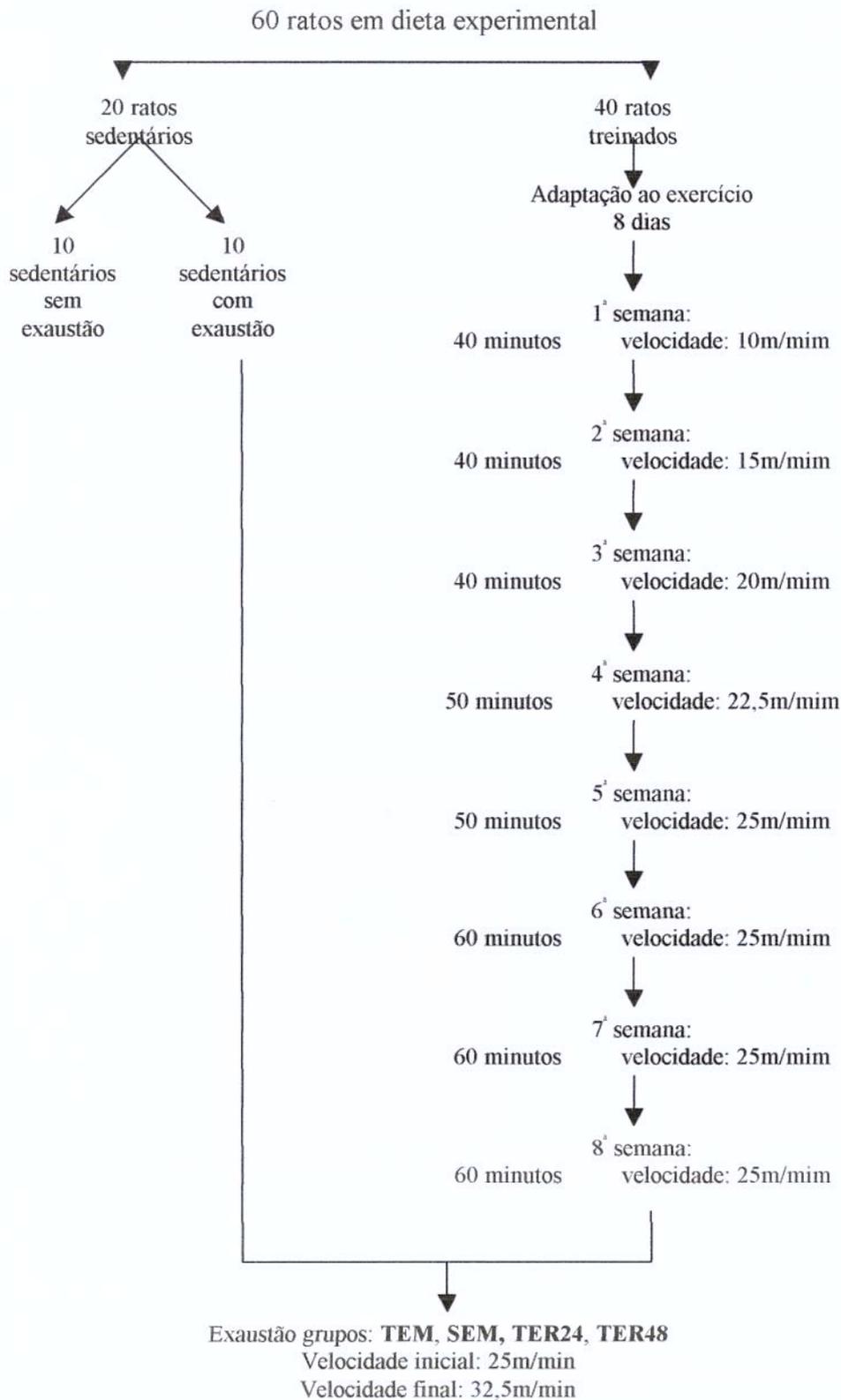
Os animais em atividade física foram submetidos a um período de 9 semanas de treinamento, sendo a primeira semana para a adaptação ao exercício, segundo a recomendação de Zoppi (1999) e como mostrado no esquema da **Tabela 5**.

**Tabela 5-** Protocolo de treinamento, aplicado durante 9 semanas.

Semana	Tempo (min)	Velocidade (m/min)
1* (2 dias)	10	5m/min
	10	10m/min
1* (5 dias)	10	5m/min
	30	10m/min
2	40	10m/min
3	40	15m/min
4	40	20m/min
5	50	22,5m/min
6	50	25m/min
7	60	25m/min
8	60	25m/min
9	60	25m/min

\*período de adaptação ao exercício físico.

Finalizadas as 9 semanas de treinamento contínuo os ratos foram submetidos ao exercício exaustivo. Os grupos de animais submetidos a exaustão correram inicialmente a 25m/min, até atingirem a velocidade de 32,5m/min. O tempo necessário para cada rato atingir a exaustão foi devidamente registrado, sendo considerada a exaustão o momento em que o rato não mais conseguia sair da base da esteira, permanecendo em choque constante. Após a exaustão alguns grupos de ratos passaram por um período de recuperação de até no máximo 48 horas, para a avaliação do processo de recuperação. Somente não foram submetidos à atividade exaustiva os ratos das categorias **TM** e **SM**.



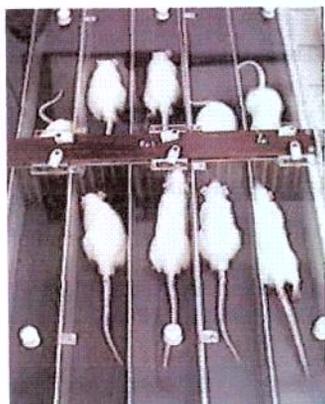
**Fluxograma 2-** Protocolo de treinamento em esteira utilizado durante o ensaio.

Os parâmetros bioquímicos foram determinados em 0, 24 e 48h, com exceção do lactato que foi somente em 0h.

## 2.6 Características do treinamento físico

Todas as manhãs, de Segunda à Sexta-feira, entre 8:30 e 13:30 horas, os ratos eram submetidos ao treinamento físico. Divididos em 6 grupos de 10 ratos cada, 4 grupos eram sempre submetidos ao treinamento, enquanto os animais controle permaneciam em suas gaiolas.

Os ratos passaram por um período de adaptação ao exercício, em velocidades mais baixas, conforme indicado na **Tabela 5**. Alguns ratos apresentaram dificuldades em se adaptar ao exercício físico. Esses ratos foram sempre monitorados, até que retomassem o ritmo adequado de treinamento evitando-se que ficassem constantemente na base da esteira, em choque contínuo.



**Figuras 4 e 5:** Animais experimentais durante o período de treinamento em esteira rolante.

## 2.7 Esquema experimental para o teste de exaustão

Para facilitar o acompanhamento do teste exaustivo, grupos de cinco animais (peso

médio 326,4g), foram aleatoriamente removidos de suas gaiolas para o exercício exaustivo. Não foram submetidos à atividade exaustiva os grupos **TM** e **SM**, por serem estes grupos controle de atividade física. Apesar da esteira rolante ter capacidade para 12 ratos, no momento da atividade exaustiva, os ratos eram colocados para correr em grupos de 5, de forma a possibilitar maior controle do ponto de exaustão. O lactato sanguíneo foi medido por amostras de sangue caudal nas categorias em exaustão logo após atividade física, bem como a retirada de tecidos e determinação dos outros parâmetros para àqueles grupos sacrificados imediatamente após a exaustão (**TEM** e **SEM**). Quanto aos grupos sacrificados 24 e 48 horas após a exaustão (**TER24** e **TER48**), somente os níveis de lactato foram medidos logo em seguida da atividade física exaustiva. Para os ratos não submetidos ao treinamento exaustivo (**TM** e **SM**), o lactato sanguíneo foi medido momentos antes do sacrifício para retirada de tecidos e determinação dos outros parâmetros.

## **2.8 Métodos e parâmetros bioquímicos**

### *Dosagem da concentração de lactato sanguíneo*

Para a dosagem de concentração do lactato sanguíneo foi utilizado o lactímetro Accusport (Böehringer Mannheim GmbH Biochemica, Alemanha) (Fell *et al.*, 1998). A fita utilizada para a medição do lactato foi a BM-Lactate (Roche Diagnostics, GmbH Mannheim, Germany). A coleta de sangue foi feita cortando-se a ponta da cauda do animal. Para os animais submetidos ao treinamento de exaustão, a medição foi logo após a última sessão de treinamento. Já para os animais sedentários e os treinados sem exaustão, a coleta do sangue para determinação do lactato foi feita um pouco antes do sacrifício, objetivando a obtenção de dados de lactato em repouso e na exaustão.



**Figura 6:** Procedimento experimental para coleta de sangue para análise de lactato sanguíneo.

#### *Coleta de sangue e tecidos*

O sangue de cada animal foi obtido através de punção cardíaca e colocado em tubo de vidro sem anticoagulante. Em menos de uma hora após a punção o sangue era centrifugado a 3000rpm por 10-20 minutos para obtenção do soro. O soro obtido foi imediatamente congelado em biofreezer de  $N_2$  a  $-195^{\circ}C$ .

Os músculos utilizados no ensaio foram o gastrocnêmio (porções vermelha e branca) e sóleo. Após a anestesia dos animais com hidrato de cloral (10%), os músculos foram extraídos e colocados em nitrogênio para congelamento, em seguida foram envoltos em papel alumínio e armazenados em biofreezer de nitrogênio, para posterior análise.

#### *Determinação de glicogênio muscular*

A determinação de glicogênio muscular foi realizada com base no método empregado por Lo *et al.* (1970).

A descrição do método aplicado se encontra no Anexo 2.

#### *Determinação de glicose sérica*

A determinação de glicose foi feita utilizando o kit da Laborlab S/A produtos para laboratórios (Guarulhos, SP), Glicose Liquid Stable, pelo método enzimático. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 500nm de comprimento de onda (Henry, 1974).

#### *Determinação de proteínas totais séricas e albuminas séricas*

As determinações de proteína total e albumina sérica foram realizadas com a utilização do kit PROTAL, da Laborlab S/A produtos para laboratórios (Guarulhos, SP), pelo método colorimétrico. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540nm para proteínas totais, e à 625nm de comprimento de onda para albumina (Doumas *et al.*, 1971).

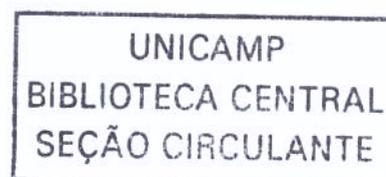
#### *Determinação da proteína muscular*

A determinação da proteína muscular foi realizada através do método colorimétrico empregado por Hartree (1971), em amostras úmidas do músculo gastrocnêmio. Tal método consiste numa variação do método de Lowry.

Para a obtenção da cor final azul da reação que ocorre com a proteína foram necessárias duas etapas distintas: a primeira de reação da proteína com o cobre em solução alcalina, e em seguida a redução do reagente de Folin, originado de um complexo azulado. A intensidade da sua coloração é diretamente proporcional ao conteúdo de proteína.

O procedimento adotado se encontra no Anexo 3.

## **2.9 Tratamento estatístico**



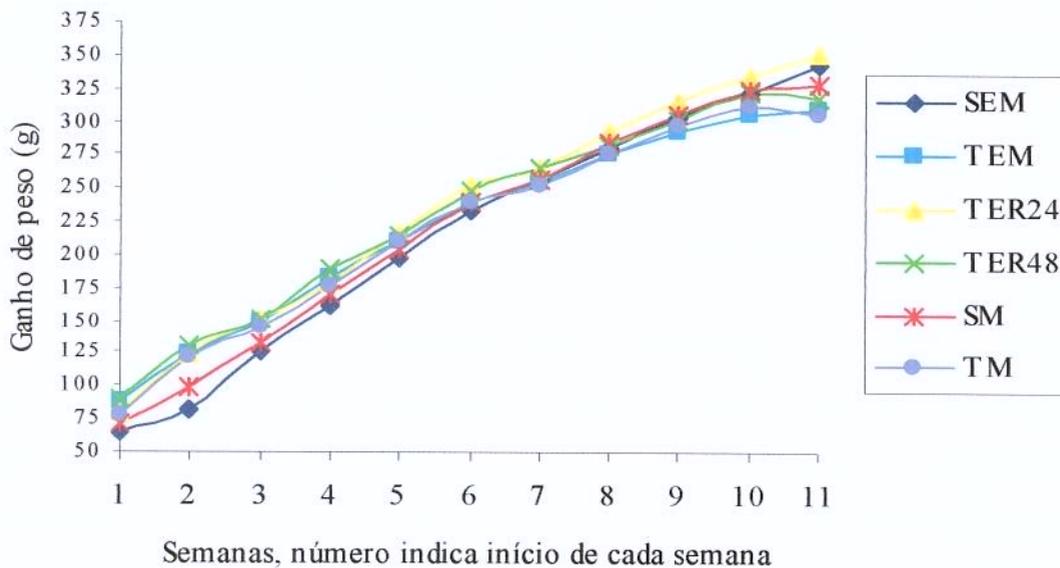
---

Os resultados foram submetidos à análise estatística usando o programa STATISTICA<sup>®</sup> para ambiente Windows<sup>®</sup>. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e para a análise das diferenças entre médias, quando necessário, foi aplicado teste de Tukey, considerando  $p < 0,05$  como critério de significância.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### *Evolução Ponderal*

As curvas de crescimento mostraram uma evolução ponderal progressivamente crescente e suave até o final do período experimental, conforme pode ser visualizado na **Figura 7**. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) entre tratamentos.



**Figura 7-** Evolução ponderal de Ratos Wistar alimentados com dietas experimentais durante as 10 semanas de ensaio. **SEM** (sedentário, exaustão e morte), **TEM** (treinado, exaustão, seguido de morte), **TM** (treinado sem exaustão), **SM** (sedentário sem exaustão), **TER24** (treinado, exaustão e morte após 24h), **TER48** (treinado, exaustão e morte após 48h).

---

*Ponto de exaustão e treinamento físico*

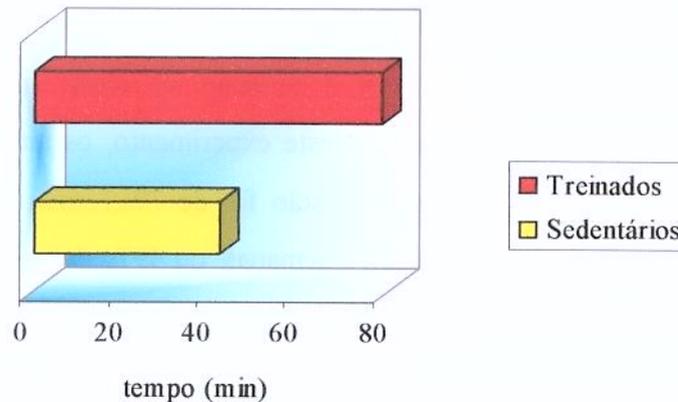
Foram levados ao treinamento exaustivo os grupos de ratos previamente programados, com a finalidade de comparar o tempo médio necessário até a exaustão. Dois grupos foram poupados do treinamento exaustivo, permanecendo na condição de “sedentários” e “treinados” para obtenção dos parâmetros basais.

O ponto de exaustão, considerado como o momento em que o rato não mais saía da base da esteira, variou entre as diferentes categorias, conforme esperado. 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.

O presente estudo, teve como ponto de partida os resultados obtidos por Tassi (1996). Em tal estudo, ratos com aproximadamente o mesmo peso dos usados neste estudo, foram submetidos a treinamento de natação por um período de 5 semanas e levados à exaustão. Desse trabalho surgiu a idéia de realizar outros estudos com diferentes períodos de treinamento, diversos graus de hidrólise e diversas proteínas, na tentativa de se explorar mais a fundo as condições para a obtenção dos benefícios indicados. Ramos (2000), continuando o trabalho de Tassi (1996), realizou um estudo com um curto período de treinamento, 10 dias, no qual não foram verificadas vantagens decorrentes do uso do hidrolisado em função do treinamento físico. Essa falta de efeitos positivos do hidrolisado pode ter decorrido de vários fatores, tais como o grau de hidrólise do proteolísado e o curto período de treinamento.

Zoppi (1999), estudando as adaptações induzidas pelo treinamento físico e objetivando padronizar as características do treinamento ideal em ratos, observou que depois de 4 semanas de treinamento os níveis médios de lactato sanguíneo, pós-exercício, tenderam a diminuir e se estabilizar. O autor explica que esse resultado seria uma resposta adaptativa ao treinamento.

Entre as categorias de ratos treinados (T) e sedentários (S) a diferença entre as médias de tempo de exaustão foi significativa ( $79\pm 16$  e  $42\pm 14$ min, respectivamente) conforme mostra a **Figura 8**.



**Figura 8-** Tempo medio de exaustão no teste fisico de exaustão para os ratos Treinados (T) e Sedentários (S).

Submeter ratos sedentários ao treinamento exaustivo teve como objetivo avaliar o efeito do treinamento físico em ratos de peso corporal de aproximadamente 327g, em contraposição aos do primeiro experimento (239g). O treinamento físico promove alterações metabólicas adaptativas ao exercício, proporcionando uma utilização mais eficiente dos nutrientes e melhor desempenho no treinamento exaustivo, quando comparado ao grupo controle, sem treinamento.

A média dos tempos de exaustão deste experimento, entretanto, foram inferiores, por larga margem, ao tempo médio encontrado para os animais do experimento 1. De certa forma, este resultado dificulta um pouco a interpretação dos dados de recuperação. A única explicação encontrada é a influência da idade e peso dos animais no tempo de exaustão. Enquanto que no segundo experimento os animais estavam com 18 semanas ( $\pm 327$ g), os do primeiro se encontravam com 11 semanas ( $\pm 239$ g **Tabela 6**). Referência a este fator como determinante da performance física do rato não foi encontrada na literatura. Contudo, a

comparação deste com outros trabalhos desenvolvidos pelo grupo, indica que o tempo de exaustão do rato tende a diminuir drasticamente com a idade. O tempo médio relatado por Tassi (1996), em estudo semelhante, foi de  $152\pm 8$ min, para animais de 11 semanas de idade, treinados e alimentados com uma dieta padrão. O tempo médio de exaustão dos animais do primeiro experimento desta Dissertação foi de  $156\pm 18$ min para o hidrolisado, e  $60\pm 13$  min para o isolado, ambos com 7 semanas de idade (juntando-se as médias hidrolisado e isolado tem-se  $108\pm 16$ min). Neste experimento, os animais estavam com 14 semanas e o tempo médio na primeira exaustão foi de  $79\pm 16$ min. No trabalho de Diniz (2000), os animais controle estavam com 77 semanas, ou 497g de peso e o tempo médio de exaustão dos animais controle foi de  $39\pm 6$ min.

A **Tabela 6** apresenta em resumo as informações do primeiro e segundo experimento deste trabalho, e de dois outros estudos, Tassi (1996) e Diniz (2000), os quais utilizaram metodologias de trabalho semelhantes às desta dissertação. A comparação estabelecida entre tais estudos, sugere haver relação entre o tempo de exaustão e a idade do animal.

**Tabela 6-** Dados de idade, peso final e tempo de exaustão desta dissertação, Tassi (1996) e Diniz (2000).

<b>Fonte</b>	<b>Idade (semanas)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>Tempo de exaustão (min)</b>
1° experimento	7	239	$108\pm 16$
Tassi, 1996	11	300	$152\pm 8$
2° experimento	18	327	$79\pm 16$
Diniz, 2000	77	497	$39\pm 6$

### *Determinações Sanguíneas*

A **Tabela 7** mostra os resultados das determinações sanguíneas de glicose, lactato, albuminas e proteínas séricas totais, para as diferentes categorias.

**Tabela 7** – Parâmetros sanguíneos<sup>1</sup> obtidos para os diferentes grupos<sup>2</sup> de ratos (327g) alimentados com hidrolisado durante 10 semanas.

<b>Categoria</b>	<b>SEM</b>	<b>TEM</b>	<b>TM</b>	<b>SM</b>	<b>TER24</b>	<b>TER48</b>
Glicose (mg/100 mL)	118,05 <sup>a</sup> (15,7)	118,51 <sup>a</sup> (17,7)	107,3 <sup>a</sup> (17,26)	117,83 <sup>a</sup> (10,85)	104,93 <sup>a</sup> (15,7)	116,61 <sup>a</sup> (13,27)
Lactato <sup>3</sup> (nmol/L)	6,18 <sup>a</sup> (0,55)	5,68 <sup>a</sup> (0,28)	2,52 <sup>b</sup> (0,35)	1,23 <sup>b</sup> (0,43)	5,84 <sup>a</sup> (0,68)	5,95 <sup>a</sup> (0,33)
Albumina (g/dL)	2,88 <sup>ab</sup> (0,32)	2,48 <sup>b</sup> (0,58)	3,44 <sup>a</sup> (0,34)	3,04 <sup>ab</sup> (0,48)	2,81 <sup>b</sup> (0,55)	3,44 <sup>a</sup> (0,51)
Prot. séricas totais (g/dL)	6,03 <sup>c</sup> (0,60)	6,06 <sup>c</sup> (0,42)	7,53 <sup>a</sup> (0,24)	6,24 <sup>c</sup> (0,36)	6,89 <sup>b</sup> (0,53)	7,14 <sup>ab</sup> (0,37)

<sup>1</sup> Valores correspondem às médias e desvio padrão (parênteses) de 10 animais por grupo. <sup>a b c</sup> diferença significativa segundo teste Tukey.

<sup>2</sup> **SEM** (sedentário, seguido de exaustão e morte), **TEM** (treinado, seguido de exaustão e morte), **TM** (treinado sem exaustão), **SM** (sedentário sem exaustão), **TER24** (treinado, exaustão, morte após 24h), **TER48** (treinado, exaustão, morte após 48h).

<sup>3</sup> Valores correspondem aos níveis determinados por ocasião do teste de exaustão.

### *Glicose sérica*

Os níveis glicêmicos dos grupos poderiam ser considerados normais ou ligeiramente elevados, com exceção dos treinados. Não foram observadas, entretanto, diferenças estatísticas na glicemia dos ratos, independente do tempo transcorrido após a exaustão (0,

24 e 48h), sendo o  $p > 0,1784$  em todos os casos. A conclusão é que, em nenhum dos casos, a causa da fadiga incluiu a hipoglicemia. Além disso, o consumo da dieta contendo o hidrolisado por um período de nove semanas não impediu os ratos sedentários de terminarem o teste de exaustão com níveis glicêmicos iguais aos dos animais treinados (**Tabela 7**).

Ramos (2001), trabalhando com dieta experimental de hidrolisado com alto grau de hidrólise, para ratos em atividade física, obteve valores médios de glicose sérica superior ( $144 \pm 20$ ) dos encontrados no estudo atual, não observando da mesma forma, diferença significativa entre grupos.

Os valores glicêmicos de indivíduos treinados costumam ser superiores aos de indivíduos de vida sedentária quando submetidos ao exercício físico. Kristiansen *et al.* (2000) encontrou que atletas têm níveis glicêmicos mais elevados, em comparação com indivíduos não treinados. Contudo, no trabalho atual não se encontraram diferenças significativas entre as categorias **S** e **T**, em nenhum tratamento.

### *Lactato Sanguíneo*

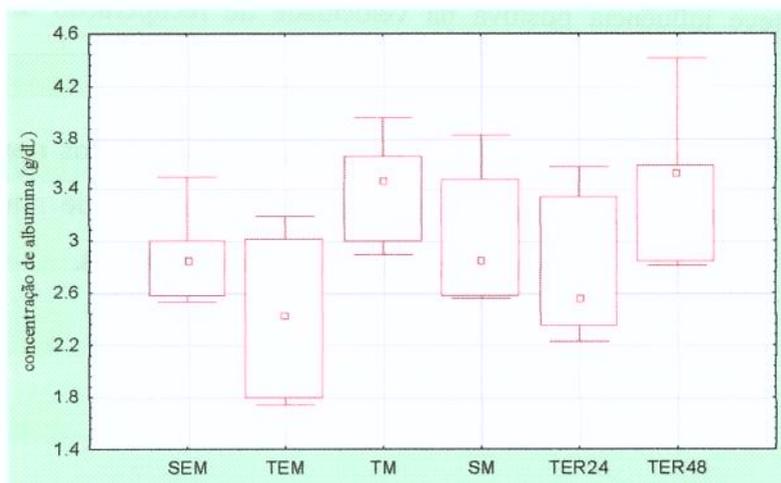
As concentrações de lactato sanguíneo, medidas somente logo após o exercício físico exaustivo, marcaram claramente o efeito da atividade intensa no metabolismo do animal. Conforme esperado, o lactato dos ratos não submetidos ao teste exaustivo foi sempre inferior ao dos animais levados à exaustão ( $p < 0,0002$ ). Pôde-se observar que os ratos sedentários submetidos ao treinamento exaustivo tiveram suas médias um pouco mais altas, sendo menos capazes de remanejar o lactato sanguíneo, em comparação com aqueles submetidos ao treinamento físico.

Assim sendo, avaliação da concentração de lactato sanguíneo, realizada com o objetivo de indicar a intensidade de exercício imposta aos animais, comprovou que a atividade física efetuada pelos animais, foi adequada, e capaz de produzir alterações metabólicas referentes à 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 físico prolongado seja capaz de diminuir o acúmulo de ácido láctico, permitindo que ratos treinados demorem mais tempo para atingir a exaustão.

### *Albumina sérica e Proteínas séricas totais*

Em geral, os animais treinados foram mais capazes de preservar os níveis de albumina sérica após o teste de exaustão, quando comparados à categoria dos sedentários. Foi encontrada diferença significativa nas concentrações de albumina entre as categorias **TM** e **TEM** ( $p < 0,0492$ ), assim como entre **TER24** e **TER48** ( $p < 0,0458$ ), mas não entre os grupos **SM** e **SEM** ( $p > 0,97$ ) nem entre **TM** e **TER48** ( $p = 1$ ).

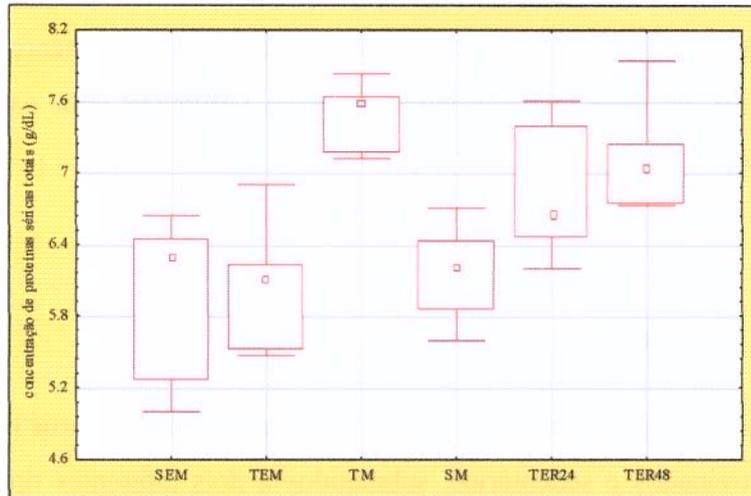


**Figura 9-** Concentração de albumina sérica (g/dL) nas diferentes categorias. **SEM** (sedentário, exaustão e morte), **TEM** (treinado, exaustão e morte), **TM** (treinado sem exaustão), **SM** (sedentário sem exaustão), **TER24** (treinado, exaustão morte após 24h), **TER48** (treinado, exaustão morte após 48h).

As diferenças observadas com o teste estatístico significam que os animais sedentários que foram levados para exaustão, desenvolveram seu trabalho com perdas variadas de albumina sérica, embora sem haver modificação significativa da média, como mostra a **Figura 9**. Note-se que os valores encontrados nestes animais foram semelhantes aos relatados para os animais sedentários que consumiram o isolado no Experimento 1 (desta Dissertação).

A diminuição média nos níveis de albumina sérica com o exercício exaustivo foi de 0,96g/dL. Um achado importante foi a observação do baixo nível de albumina encontrado no animal 24 horas depois da exaustão, não havendo diferença significativa com a média encontrada logo após a exaustão. A queda dos níveis séricos de albumina foi somente restabelecida 48h após a exaustão. No estudo de Tassi (1996), observou-se que o hidrolisado de  $\alpha$ -lactalbumina, mas não a  $\alpha$ -lactalbumina inteira, foi eficaz em manter os níveis de albumina sérica após o exercício exaustivo. Comparando os resultados do Experimento 2 com os obtidos no Experimento 1 desta Dissertação, é possível se afirmar que o hidrolisado teve influência positiva na velocidade de recuperação dos níveis de albumina.

Quanto ao efeito do treinamento, pode ser afirmado ainda que os resultados aqui apresentados são consistentes com a noção geral de que os grupos de ratos treinados preservam os níveis de albumina com mais eficiência do que os sedentários.



**Figura 10-** Concentração de proteínas séricas totais (mg/dL) nas diferentes categorias. **SEM** (sedentário, exaustão e morte), **TEM** (treinado, exaustão e morte), **TM** (treinado sem exaustão), **SM** (sedentário sem exaustão), **TER24** (treinado, exaustão morte após 24h), **TER48** (treinado, exaustão morte após 48h).

Houve um comportamento diferenciado na evolução após a exaustão entre os níveis de albumina e proteínas séricas totais, indicando que o metabolismo da proteína não-albumínica segue um processo de “turn-over” diferente e determinante de forma global. A principal observação feita quanto às proteínas totais foi relativa a seu lento processo de recuperação. A perda média de proteína com o exercício exaustivo foi de 1,47g/dL (**TM – TEM**,  $p=0,0001$ ). Após 48h de repouso, este nível não foi alcançado, embora não tenha havido diferença significativa entre as duas médias (**TM – TER48**,  $p=0,356$ ).

Embora os níveis de proteínas totais tenham tido uma recuperação lenta, o consumo do hidrolisado beneficiou o animal no sentido de proporcionar uma recuperação mais rápida, em comparação ao isolado. Este resultado, entretanto, pode ter sido devido à grande contribuição na recuperação encontrada para a albumina sérica (3,5 – 5,5g/dL), em relação à proteína total (6 a 8g/dL; Murray *et al.*, 1996).

Os valores aqui encontrados para albumina e proteínas séricas totais foram próximos aos relatados por Gobatto (1993), que trabalhou com treinamento físico e a concentração de proteína na dieta. Concordância também verificada com os resultados obtidos por Tassi (1996).

### *Determinações teciduais*

Os valores médios de glicogênio e proteína muscular, obtidos a partir de amostras de tecidos de animais treinados e sedentários, submetidos a dois diferentes tipos de dieta estão descritos na **Tabela 8**.

**Tabela 8** – Parâmetros musculares<sup>1</sup> obtidos para os diferentes grupos<sup>2</sup> de ratos.

<b>Categoria</b>	<b>SEM</b>	<b>TEM</b>	<b>TM</b>	<b>SM</b>	<b>TER24</b>	<b>TER48</b>
Glicogênio gastrocnêmio (mg/100mg)	0,13 <sup>cd</sup> (0,04)	0,14 <sup>c</sup> (0,04)	0,21 <sup>a</sup> (0,05)	0,21 <sup>a</sup> (0,05)	0,17 <sup>c</sup> (0,03)	0,23 <sup>b</sup> (0,05)
Glicogênio sóleo (mg/100mg)	0,08 <sup>b</sup> (0,01)	0,10 <sup>b</sup> (0,02)	0,23 <sup>a</sup> (0,05)	0,28 <sup>a</sup> (0,05)	0,22 <sup>a</sup> (0,07)	0,28 <sup>a</sup> (0,06)
Proteína muscular (mg/100mg)	1,25 <sup>a</sup> (0,10)	1,28 <sup>a</sup> (0,10)	1,24 <sup>a</sup> (0,15)	1,25 <sup>a</sup> (0,15)	1,28 <sup>a</sup> (0,06)	1,31 <sup>a</sup> (0,06)

<sup>1</sup>Valores correspondem às médias e desvio padrão (parênteses) de 10 animais por grupo. <sup>a b c</sup> diferença significativa segundo teste Tukey.

<sup>2</sup>**SEM** (sedentário, exaustão e morte), **TEM** (treinado, exaustão e morte), **TM** (treinado sem exaustão), **SM** (sedentário sem exaustão), **TER24** (treinado, exaustão morte após 24h), **TER48** (treinado, exaustão morte após 48h).

### *Glicogênio muscular*

As médias de glicogênio do músculo gastrocnêmio variaram bastante entre tratamentos, havendo segundo a análise de variância, diferença geral significativa ( $p < 0,05$ ). No momento da exaustão, principalmente para a categoria de sedentários (**SEM**) os valores médios foram os mais baixos, representando uma queda de 85,6%. É importante ressaltar o fato de que o treinamento não teve influência na capacidade do rato formar seus estoques de glicogênio, como visualizado pela diferença entre os grupos **TM** e **SM**.

A recuperação da capacidade de refazer os estoques de glicogênio foi um processo lento, tanto que, após 24h, os níveis não eram diferenciáveis daqueles logo após a exaustão ( $p = 0,7$ ). Após 48h, os estoques mostravam recuperação parcial, mas ainda não se encontravam completamente restabelecidos. Com relação ao isolado, o hidrolisado não mostrou vantagens, como foi também relatado por Tassi (1996), para a  $\alpha$ -lactalbumina.

Segundo o teste de Tukey, 48 horas após o teste exaustivo, os ratos ainda não estavam recuperados. Tal fato pode ser visto pela diferença estatística encontrada entre as categorias **TM** e **TER48** ( $p = 0,0008$ ). Contudo, o processo de recuperação pode ser evidenciado pela diferença encontrada 24 horas após o teste exaustivo ( $p = 0,0001$ ).

A depleção de glicogênio depende da intensidade e duração do exercício imposto. Azevedo (1995) estudou 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.

Quanto ao glicogênio do músculo sóleo, diferente do gastrocnêmio, o grau de recuperação após 24 horas foi maior (próxima de 50%;  $p = 0,125$ ), conforme pode ser visto no gráfico no Anexo 4.

As diferenças encontradas nos parâmetros determinados para os músculos gastrocnêmio e sóleo podem ser explicadas pelas diferenças estruturais e fisiológicas características desses músculos. O músculo gastrocnêmio é predominantemente composto

de fibras de contração rápida, com fenótipo branco; ou seja, de movimentos rápidos mas pouco repetitivos, com produção de energia anaeróbica. As fibras predominantes são do tipo II, com baixa defesa antioxidante, que utiliza como fonte de energia os carboidratos. O sóleo por sua vez, é predominantemente um músculo de contração lenta, fenótipo vermelho, de movimentos lentos e repetitivos e não, com produção de energia aeróbica, fibras predominantes tipo I, com alta defesa antioxidante, e utiliza como fontes de energia carboidratos e lipídeos (Guyton, 1988; Goldspink, *et al.*, 1996; Dugaard & Richter, 2001).

Smolka (1999) trabalhando com o treinamento intermitente, e contínuo, verificou que o músculo sóleo, no caso do treinamento contínuo, estaria mais adaptado ao exercício realizado, e conseqüentemente, sofreria menor estresse que um músculo com predominância de fibras tipo II. No estudo atual, utilizando-se o treinamento contínuo verificou-se que a recuperação após o exercício exaustivo foi mais rápida no músculo sóleo, do que no gastrocnêmio. A mais provável explicação para esse fato seria o processo adaptativo ocorrido no músculo sóleo, decorrente do treinamento contínuo.

Vale salientar que Musi *et al.* (2001) detectaram que, contrações musculares ocorridas nas fibras musculares do sóleo, durante o exercício, aumentam a absorção de glicose, o mesmo não sendo observado no gastrocnêmio. Tal fato pode ser considerado uma das possíveis explicações da recuperação mais rápida em tal músculo.

### *Proteína muscular*

Os níveis de proteína muscular por grama de músculo não foram alterados com a atividade física, sendo sempre  $p > 0,7421$ , segundo análise de variância.

Assim como no presente estudo, Parreira (1993) e Tassi (1996), trabalhando com atividade física e dieta experimental, não encontraram diferenças significativas entre categorias para concentração de proteína muscular.

Contudo, a categoria de ratos sedentários teve alguns valores individuais consideravelmente mais baixos, mesmo que a média não fosse tão baixa. Esses valores podem coincidir com os achados por Parreira (1993), que também, mesmo sem haver diferença significativa entre grupos, observou uma tendência dos animais treinados, a apresentarem maior concentração de proteína muscular, em relação aos respectivos controles.

Mesmo que sem significância estatística, foi observado também que os valores médios nos momentos 0, 24, e 48 horas após o exercício exaustivo, foram progressivamente aumentando. Essa perda de proteína muscular no momento da exaustão pode ser atribuída ao fornecimento de aminoácidos para suprir o gasto energético aumentado durante o exercício físico. Dohm *et al.* (1987) acreditavam que três mecanismos poderiam estar envolvidos nessa menor concentração de proteína muscular, durante o exercício: a diminuição da síntese protéica, o aumento da degradação protéica, além da saída de enzimas solúveis desprendidas do músculo, como resultado do exercício exaustivo.

Com relação aos dados de proteína muscular total (massa muscular), a ANOVA geral indicou não existir diferença significativa ( $p=0,457$ ), o que mostra não ter havido nem perda de massa muscular durante a exaustão, e nem influência do tempo de recuperação (até 48h) na massa.

---

## 4. CONCLUSÕES

Mediante a apreciação geral destes resultados, foi possível concluir que:

1. O uso do hidrolisado das proteínas isoladas do soro lácteo bovino pelo rato adulto jovem, durante dez semanas, mostrou ser vantajoso, em relação ao consumo do isolado protéico.
2. Glicose sérica: em nenhum caso, a exaustão implicou a instalação da hipoglicemia.
3. Comparações com o Experimento 1, mostraram que as perdas de albumina sérica durante o processo de exaustão foram menores e a recuperação mais rápida quando o animal ingeriu o hidrolisado, em lugar do isolado. somente a recuperação por 48h foi capaz de restaurar os níveis normais de albumina.
4. O metabolismo protéico do rato durante a recuperação mostrou que a restauração das proteínas séricas totais seguiu um processo semelhante ao da albumina sérica, exceto que mais lento.
5. O efeito do hidrolisado nos níveis de glicogênio no gastrocnêmio, foi pouco visível, embora tenha se mostrado existir uma ligeira superioridade para o hidrolisado, quando comparados aos dados do Experimento 1. Enquanto a recuperação do gastrocnêmio não foi completa em 48h, para o sóleo, a recuperação foi completa.
6. Não foi encontrada influência do treinamento na composição protéica do músculo (%), nem mesmo para o tempo de recuperação. A massa muscular, que no Experimento 1 mostrou ser influenciada pela dieta, no Experimento 2, manteve-se constante, indicando a falta de influência do exercício ou o tempo de recuperação.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – *Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists*, 15<sup>th</sup> Ed., 1990, Washington D C, 1141 p.

Azevedo JRM. *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.

Daugaard JR, Richter EA. Relationship between muscle fibre composition, glucose transporter protein 4 and exercise training: possible consequences in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Physiologica Scandinavian*, Stockholm, 171:267-276, 2001.

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 (Doutor em Ciências da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Dohm GL, Tapscott EB, Kasperek GJ. Protein degradation during endurance exercise and recovery. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, Madison, 19(5): S166-s171, 1987.

Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurements of serum albumin with bromocresol green. *Clinical Chimica Acta*. Amsterdam, 31:87-96, 1971.

Fell JW, Rayfield JM, Gulbin JP, Gaffney PT. Evaluation of the Accusport® Lactate analyser. *International Journal of Sports Medicine*, Stuttgart, 19: 199-204, 1998.

Gobatto CL. *Alterações metabólicas decorrentes do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados*. . Campinas, 1993. 122p. Dissertação (Mestre em Biologia) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

Goldspink G, Scutt A, Loughna PT, Wells DJ, Jaenicke T, Gerlanch GF. Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 262:R356-363, 1996.

Guyton AC. *Fisiologia humana*. 6ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.

Hartree E F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, New York, 48: 422-427, 1971.

Henry RJ. *Clinical Chemistry Principles and Techniques*, 2ª edição. Hargeston: Harper & Row, 1974.

Hermano R, Manso R. Muscle fiber stress in response to exercise. *European Journal of Biochemistry*, Belfast, 243:460-467, 1997.

Kristiansen S, Gade J, Wojtaszewski JFP, Kiens B, Richter EA. Glucose uptake is increased in trained vs. Untrained muscle during heavy exercise. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 89: 1151-1158, 2000.

Lemon PWR. Do athletes need more dietary protein amino acids? *International Journal of Sports Nutrition*, Champaign, 5:S39-61, 1995.

Lo SL, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, 28(2): 234-236, 1970.

McIntosh GH, Royale PJ, Leu RKL, Regester GO, Johnson MA, Grinsted RL, Kenward RS, Smithers GW. Whey proteins as functional food ingredients? *International Dairy Journal*, Barking, 8: 425-434, 1998.

Musi N, Hayashi T, Fujii N, Hirshman MF, Witters LA, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 280: E677-E684, 2001.

Murray RK, Granner DK, Mayers PA, Rodwell VW. Harper's biochemistry, 24<sup>th</sup> edition, Appleton & Lange, Stamford, CN, USA, 1996. p.830.

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

Pellet PL, Young VR. *Nutritional evaluation of protein foods*. Tokyo: The United Nations University, 1980. 154p.

Ramos AG. *Utilização das proteínas do soro lácteo por ratos jovens*. Campinas, 2001. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, Philadelphia, 1993; 123:1939-51.

Smolka BM. *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 EMM. *Desenvolvimento de dietas para o desempenho físico. Comparação de oligopeptídeos de  $\alpha$ -lactoalbumina com a proteína intacta como fonte protéico-energética no rato*. Campinas, 1996. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

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*, Bethesda, 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.

Van Loon LJC, Kruijshoop M, Verhagen H, Saris WH, Wagenmakers AJ. Ingestion of protein hydrolysate and amino acid-carbohydrate mixtures increases postexercise plasma insulin responses in men. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 130: 2508-2513, 2000.

## Anexo 1

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

Os reagentes utilizados:

- 1) HCl 0,1M
- 2) TNBS – ácido trinitrobenzenosulfônico diidratado p.a. (0,1%)
- 3) SDS – dodecil sulfato de sódio p.a. (1%)
- 4) Padrão Leucina ( $1,500 \times 10^{-3}$  M de L-leucina, Merck)
- 5) Tampão fosfato 0,2125M

Condições durante a reação:

- 1) Concentração do tampão = 0,10M
- 2) Concentração do TNBS =  $1,43 \times 10^{-3}$ M
- 3) Concentração da leucina =  $0,088 \times 10^{-3}$ M
- 4) pH = 8,2
- 5) Temperatura = 50°C
- 6) pH após adição de HCl (0,1N) = 3,7-3,9

Reação:

- 1) Misturar em tubo de ensaio 0,250mL de amostra contendo entre  $0,25 \times 10^{-3}$  e  $25 \times 10^{-3}$  amino equiv/L a 2mL de tampão fosfato a pH 8,2.
- 2) Adicionar 2mL de solução TNBS 0,10% e agitar. Manter o tubo envolvido com

papel alumínio para evitar exposição a luz.

- 3) Colocar em banho maria a  $50^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos.
- 4) Acrescentar 4mL de HCl 0,1N.
- 5) Resfriar em temperatura ambiente por 30 minutos
- 6) Leitura a 340nm, utilizando água como branco.

## Anexo 2

Procedimento utilizado para obter os teores de glicogênio muscular. Referência Lo *et al.*, 1970.

Reagentes utilizados:

- 1) 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 destilada e saturada com sulfato de sódio (Fisher S-421 anidro, certificado ACS).
- 2) Álcool etílico 95%
- 3) Fenol 5%. Cristais de fenol (250g, Mallincrodt 9928, grau reagente) dissolvidos em água destilada até completar 5 litros.
- 4) Ácido sulfúrico 96-98% (Fisher A-300, grau p.a.)
- 5) Soluções de glicogênio padrão. Pó de glicogênio (substituído por glicose, 25mg), dissolvido 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.

Procedimentos:

- 1) amostras de músculo foram retiradas, isolando-se um pedaço de músculo de aproximadamente 30mg. Todas as amostras de músculo foram imediatamente transferidas para um prato de pesagem e toda gordura, tecido conectivo, e sangue foram removidos com pinça e tesoura cirúrgica. As amostras foram pesadas numa balança de torção de precisão “Roller-Smith” e transferidas com pinça tipo fórceps para o fundo de um tubo contendo 0,5 mL de KOH a 30% saturado com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .
- 2) Os tubos eram mantidos em gelo até que todos fossem preenchidos. O tecido permanecia completamente imerso na solução.

- 3) Os tubos com tampa fechada eram colocados em banho com água fervente por 30-60 minutos, até que uma suspensão homogênea fosse obtida.
- 4) Os tubos eram então removidos do banho quente e resfriados em gelo.
- 5) 0,6 mL de etanol a 95% era adicionado para precipitar o glicogênio do digerido alcalino.
- 6) As amostras permaneciam em gelo por 30 min, após o qual eram centrifugadas a  $840\times g$  por 20-30 min. Os sobrenadantes eram cuidadosamente aspirados.
- 7) Os precipitados de glicogênio eram dissolvidos em 3mL de água destilada.
- 8) Uma alíquota apropriada da solução de glicogênio acima era pipetada para um tubo de ensaio de 150x20mm e completada até um volume de 1mL pela adição de água destilada.
- 9) 0,5mL de fenol a 5% era adicionada a solução.
- 10) 2,5mL de  $H_2SO_4$  a 96-98% eram adicionados rapidamente (em 10-20s), o ácido sendo adicionado diretamente à superfície do líquido ao invés de na parede do tubo, para garantir melhor mistura.
- 11) Os tubos eram deixados em repouso por 10 min. Depois os tubos eram agitados e deixados em um banho de água de 25-30°C, antes que as leituras fossem realizadas.
- 12) Controles eram preparados utilizando-se 1mL de água destilada ao invés de solução de glicogênio.
- 13) A absorbância foi medida num espectrofotômetro Beckman DU-70 à 490nm.
- 14) Todos os testes foram realizados em duplicata.

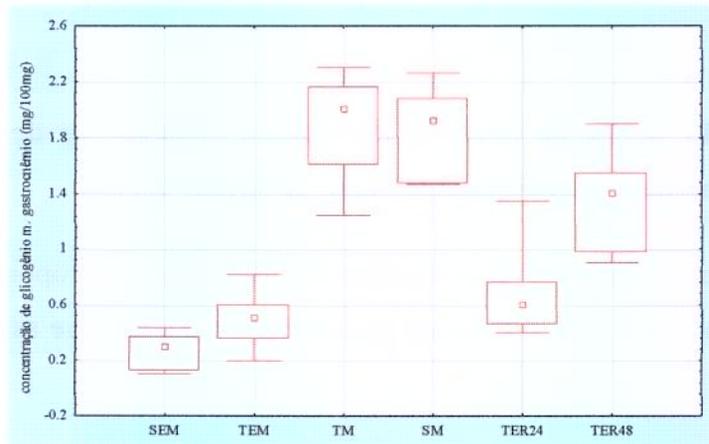
### Anexo 3

Procedimentos para determinação da proteína muscular. Referência Hartree, 1971.

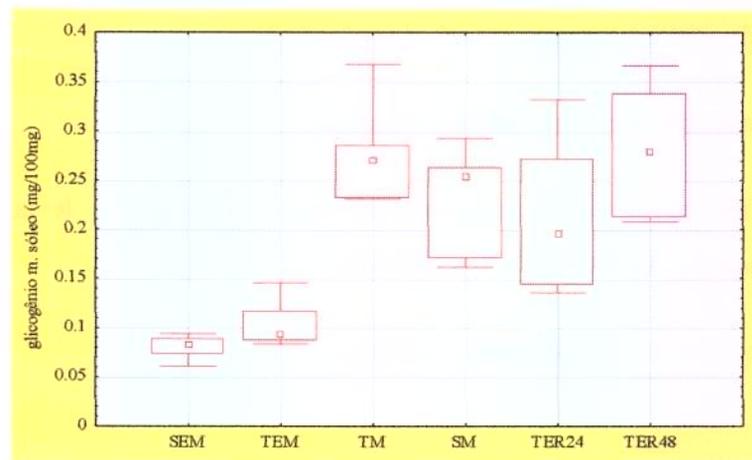
- 1) Preparo da solução A: 2g de tartarato de potássio e sódio com 100g de  $\text{NaCO}_3$  dissolvidos em 500mL de NaOH 1N. Completou-se o volume para 1L, com água desionizada.
- 2) Preparo da solução B: 2g de tartarato de sódio e potássio, 1g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , dissolvidos em 90mL de água, adicionando 10mL de NaOH 1N.
- 3) Preparo da solução C: Reagente de Folin (Merck) mais água na proporção 1:15. Vale ressaltar que as soluções A B e C foram preparadas no dia em que as análises foram realizadas.
- 4) 20 a 22 $\mu\text{g}$  de músculo, com 0,9mL da solução A e 1mL de água desionizada eram colocados em um tubo de ensaio e digeridos em banho-maria a 75°C por 15 minutos.
- 5) Em seguida, 0,1mL da solução digerida era retirada e adicionada a 1mL de água desionizada e 0,9mL de solução A.
- 6) À esse conteúdo, era adicionado 0,1mL da solução B.
- 7) O passo seguinte era adicionar 3mL da solução C .
- 8) Finalizada a sétima etapa, o conteúdo obtido era agitado e levado à leitura em espectrofotômetro Beckman DU-70 à 650 nm.
- 9) Todos os testes foram realizados em triplicata.

## Anexo 4

Concentrações de glicogênio muscular no músculo gastrocnêmio e no sóleo para os diferentes grupos de ratos. Capítulo 2.



Concentração de glicogênio no gastrocnêmio (mg/100mg) nas diferentes categorias. **SEM** (sedentário, exaustão e morte), **TEM** (treinado, exaustão e morte), **TM** (treinado sem exaustão), **SM** (sedentário sem exaustão), **TER24** (treinado, exaustão morte após 24h), **TER48** (treinado, exaustão morte após 48h).



Concentração de glicogênio no sóleo (mg/100mg) nas diferentes categorias. **SEM** (sedentário, exaustão e morte), **TEM** (treinado, exaustão e morte), **TM** (treinado sem exaustão), **SM** (sedentário sem exaustão), **TER24** (treinado, exaustão morte após 24h), **TER48** (treinado, exaustão morte após 48h).



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE