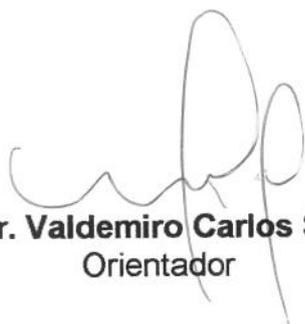


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

**“AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE CONCENTRADOS PROTÉICOS OBTIDOS
DO LEITE BOVINO”**

Patricia Zinsly Borges

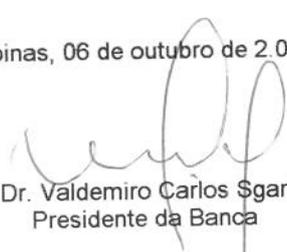


Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Patricia Zinsly Borges, aprovada pela Comissão Julgadora em 06 de outubro de 2000.

Campinas, 06 de outubro de 2000



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Presidente da Banca

Tese apresentada à Universidade Estadual de Campinas, como parte das exigências do Curso de Ciência da Nutrição, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Campinas
São Paulo - Brasil
Setembro - 2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE



985610000

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
1 Unicom
B644a
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/ 43326
PROC. 278/2000
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 30/12/2000
N.º CPD _____

CM-00153432-5

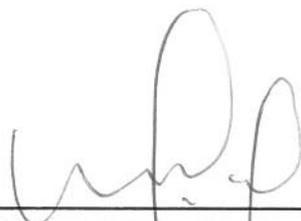
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

B644a Borges, Patricia Zinsly
Avaliação nutricional de concentrados protéicos obtidos do
leite bovino / Patricia Zinsly Borges. – Campinas, SP: [s.n.],
2000.

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

1. Soro do leite. 2. Caseína. 3. Ultrafiltração. 4. Digestão.
I. Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

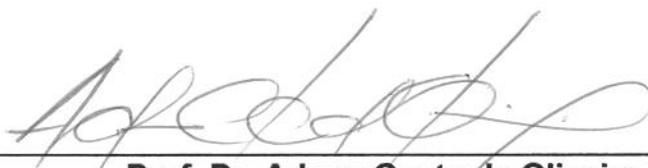
COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Orientador



Profa. Dra. Walkiria Viotto
Membro



Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
Membro

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan
Membro Suplente

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao orientador e amigo Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri pelo apoio, incentivo e confiança e por proporcionar-me oportunidade de crescimento profissional.

À CAPES pelo auxílio-bolsa concedido e à FAPESP pela enorme ajuda financeira necessária para realização deste projeto.

Às minhas queridas amigas: Eloísa, Helaine, Nádia, Izabela, Tereza, Beth Gomes, Beth Lima, Kátia, Vanilda, Erica Tassi, Renatinha e Miriam.

Aos colegas do Centro de Química do ITAL: Sandra, Renato e Ercília e ao pessoal da Unicamp, Eliete, Soeli e Liana, pelo auxílio.

À pesquisadora e amiga Dra. Vera Lúcia Baldini, pelo incentivo e ajuda na realização deste trabalho.

Ao pessoal do TECNOLAT em especial, aos funcionários Zé Rubens, Sr. Cido, Betina e Regina; à pesquisadora Izildinha Moreno e Dr. José Leonardo pela coordenação e permissão do uso da planta piloto.

À amiga Cristina Tanikawa pela imprescindível ajuda nos trabalhos experimentais.

À Liotécnica pela liofilização do concentrado protéico de soro doce; à Roche Química e Farmacêutica pela doação da mistura vitamínica utilizada no ensaio experimental com animais.

Aos meus queridos e amados pais, Toninho e Pitida que contribuíram a vida toda para que hoje eu pudesse estar realizando este trabalho; aos meus irmãos, avós, tios e tias.

Ao Marcelo, meu marido, pela paciência, amor e compreensão.

Ao meus sogros, Dr. Hamilton e Dra. Laura pela enorme demonstração de carinho.

Ao Senhor Jesus, autor da vida, que sempre esteve guiando e guardando meus passos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANT

“Ainda que eu fale a língua dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o címbalo que retine. Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.... O amor é paciente, é benigno;... tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta... o amor jamais acaba. Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três; porém o maior destes é o amor.”

I Corintios 13

*Ao meu marido Marcelo, com
muito amor.*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANT

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
Resumo Geral	xi
General Summary	xiii
CAPÍTULO 1: “Proteínas do Leite Bovino: Estado Atual do Conhecimento”.	1
1. Introdução	1
2. Propriedades tecnológicas	2
3. Características nutricionais das proteínas de leite	5
4. Propriedades funcionais fisiológicas	8
4.1 Proteínas do soro	8
4.2 Peptídios bioativos	12
5. Métodos de obtenção de concentrado protéico de soro de leite	14
6. Referências Bibliográficas	16
CAPÍTULO 2: “Avaliação Nutricional de Concentrado Protéico de Soro Doce, Caseinato de Sódio e Coágulo de Caseína, Comparados à Caseína Comercial”.	21
RESUMO	21
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1 Matéria-prima	26
2.2 Obtenção dos concentrados protéicos de soro e caseínas	26
2.2.1 Obtenção do soro doce	29
2.2.2 Obtenção do concentrado protéico de soro doce	29
2.2.3 Obtenção do coágulo de caseína	29
2.2.4 Obtenção do concentrado protéico de soro ácido	30
2.2.5 Obtenção do caseinato de sódio	30
2.3 Controle da qualidade dos produtos	31

2.4 Determinação de solubilidade	31
2.5 Controle Microbiológico	32
2.6 Métodos Analíticos	32
2.6.1 Composição Centesimal	32
• Nitrogênio Total	32
• Umidade	32
• Cinza	32
• Lipídios Totais	32
• Lactose	32
2.6.2 Determinação de aminoácidos	33
2.6.3 Escore Químico	33
2.7 Ensaio Biológico	33
2.7.1 Avaliação Nutricional <i>in vivo</i>	33
2.7.2 Protocolo Experimental	35
• Composição e Preparo das dietas	35
• Determinação do valor nutritivo da proteína	38
2.8 Escore Químico Corrigido pela Digestibilidade <i>in vivo</i> (PDCAAS)	39
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Composição química do concentrado protéico de soro doce (CSD), caseinato de sódio (CasNa) e do coágulo de caseína (Co-Cas).	40
4.2 Composição em aminoácidos	42
4.3 Escore químico e PDCAAS	43
4.4 Avaliação Microbiológica	48
4.5 Resultados obtidos no ensaio biológico com ratos	49
5. CONCLUSÕES	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

CAPÍTULO 3: “Estudo Comparativo da Digestão e Absorção de Aminoácidos do Concentrado Protéico de Soro de Leite Bovino e do Caseinato de Sódio”.	58
RESUMO	58
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1 Matéria – prima	64
2.2 Obtenção dos concentrados protéicos de soros e caseínas	64
2.3 Metodologia	64
2.3.1 Estudo comparativo da digestão e absorção do concentrado protéico de soro doce (CSD) e do caseinato de sódio (Cas-Na), em experimentos com ratos	64
2.3.2 Avaliação da absorção de aminoácidos pela determinação no soro sanguíneo (veia porta) de animais previamente intubados.	67
• Dosagem de proteína no soro sanguíneo.	67
• Determinação de aminoácidos livres no soro sanguíneo.	67
• Preparação da amostra para determinação de proteínas totais no conteúdo intestinal de animais previamente intubados.	67
• Determinação de proteínas totais.	68
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	69
5. CONCLUSÕES	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

Lista de Figuras

1. Fluxograma do processo de obtenção do concentrado protéico de soro doce e do coágulo de caseína	27
2. Fluxograma do processo de obtenção do concentrado protéico de soro ácido e do caseinato de sódio	28
3. Evolução Ponderal de ratos Wistar alimentados com dietas de concentrado protéico de soro doce (CSD), coágulo de caseína (Co-Cas), caseinato de sódio (CasNa) e caseína comercial (CC).	51
4. Procedimento experimental para intubação gástrica da suspensão de proteína, coleta de sangue (veia porta) e preparo do soro para determinação de aminoácidos, e coleta de material do intestino delgado.	66
5. Concentração de proteína no soro sangüíneo para duas fontes protéicas, em função do tempo após intubação: concentrado protéico de soro doce (CSD) ou caseinato de sódio (CasNa).	69
6. 3a. Acúmulo seguido de desaparecimento de aminoácidos no soro sangüíneo da veia porta de ratos intubados com quantidade idêntica de proteínas CSD ou CasNa (mg de aminoácido/100mL de soro, nos tempos T10 e T20 min após gavagem).	76
7. 3b. Acúmulo seguido de desaparecimento de aminoácidos no soro sangüíneo da veia porta de ratos intubados com quantidade idêntica de proteínas CSD ou CasNa (mg de aminoácido/100mL de soro, nos tempos T40 e T60 min após gavagem).	77
8. Concentração de proteína solúvel no conteúdo intestinal de ratos intubados com duas fontes protéicas: concentrado protéico de soro doce (CSD) ou caseinato de sódio (CasNa), após vários tempos de intubação	78

•

Lista de Tabelas

1. Composição e funções biológicas das proteínas de soro de leite bovino.	10
2. Valores médios de peso inicial (média \pm desvio padrão) dos animais de experimentação	35
3. Composição básica da dieta, segundo AIN-93 G (Reeves, <i>et al.</i> , 1993) para ratos em crescimento	36
4. Mistura mineral AIN-93 G MX	37
5. Formulação da mistura vitamínica AIN-93 VX.	38
6. Composição centesimal aproximada e valor de solubilidade encontrados para: concentrado protéico de soro doce (CSD), coágulo de caseína (Co-Cas) e caseinato de sódio (CasNa), em base seca.	40
7. Perfil de aminoácidos dos produtos: concentrado protéico de soro doce (CSD), caseinato de sódio (CasNa), coágulo de caseína (Co-Cas) e caseína comercial (CC).	44
8. Perfil de aminoácidos dos produtos: concentrado protéico de soro doce (CSD), caseinato de sódio (CasNa), coágulo de caseína (Co-Cas) e caseína comercial (CC), FAO/WHO.	45
9. Valores obtidos (média \pm desvio padrão) para dieta ingerida (DI), proteína ingerida (PI), ganho de peso (GP) e quociente de eficiência protéica (PER) para ratos Wistar recém-desmamados mantidos em experimento por 28 dias.	49
10. Valores obtidos para NPR (quociente de eficiência líquida da proteína) e Dv (digestibilidade verdadeira) encontrados para ratos Wistar recém-desmamados, pelos diferentes tratamentos.	52
11. Valores encontrados para análise de aminoácidos no soro de animais previamente intubados com concentrado protéico de soro doce (CSD) ou caseinato de sódio (CasNa)	74
12. Valores encontrados para análise de aminoácidos no soro de animais previamente intubados com concentrado protéico de soro doce (CSD) ou caseinato de sódio (CasNa)	75

Resumo Geral

O presente trabalho constitui parte de um projeto mais amplo que visa a obtenção de ingredientes funcionais a partir do leite bovino. Nesta pesquisa os principais objetivos foram: a) produzir derivados protéicos do leite nas formas de concentrado protéico de soro doce liofilizado (CSD), coágulo de caseína (Co-Cas), caseinato de sódio (CasNa); b) caracterização física e química das frações protéicas obtidas; c) determinação de índices de avaliação protéica (PER, NPR, EQ, Dv, PDCAAS) para os três concentrados protéicos obtidos em planta piloto, comparativamente a uma caseína comercial (CC); d) estudo comparativo entre CSD e CasNa, da digestibilidade e absorção de aminoácidos, utilizando ratos Wistar adultos e a técnica de gavagem estomacal e retirada do sangue da veia porta para análise nos tempos de 10, 20, 40 e 60 minutos (T10, T20, T40, T60) após gavagem. O intestino delgado também foi removido para determinação de proteínas totais no conteúdo intestinal.

A composição centesimal em base seca, dos três concentrados protéicos revelou o seguinte: para CSD, proteína 83,84%, cinza 2,77%, lactose 8,88%, lipídios totais 4,48% e 96,37% de sólidos totais; Co-Cas, proteína 80,78%, cinza 5,08%, lactose 12,51%, lipídios totais 1,61% e sólidos totais 92,71%; CasNa, proteína 76,82%, cinza 9,01%, lactose 19,91%, lipídios totais 1,66% e sólidos totais 93,85%. A porcentagem de solubilidade foi de 93,09% para o CSD (tampão citrato-fosfato 0,01M, pH 4,6), para Co-Cas e para o CasNa foi de 35,12% e 98,02%, respectivamente, determinadas em água destilada à temperatura ambiente e com o pH ajustado para 7,0.

Os valores dos índices de avaliação protéica foram os seguintes: escore químico de aminoácidos essenciais (EQ) 1,02, 0,79, 0,84 e 0,87, respectivamente para o CSD, Co-Cas, CasNa e CC, sendo estatisticamente inferior para o Co-Cas em relação aos outros três concentrados, que não difeririam estatisticamente entre si. O PDCAAS (EQ × Dv%) foi de 96,8, 72,4, 79,6 e 81,4, respectivamente para o CSD, Co-Cas, CasNa e CC. O PER variou entre 3,65 para o Co-Cas e 3,15 para o CasNa, sendo estatisticamente inferior ($p < 0,05$) para o CasNa, não apresentando

diferença estatística para os demais concentrados. O índice NPR apresentou valores de 3,82 a 3,62, sem diferença estatística entre os tratamentos.

O estudo da digestibilidade e absorção de aminoácidos entre o CSD e CasNa mostrou os seguintes resultados: aos 10 minutos após gavagem (T10), os aminoácidos prolina, alanina, cisteína, metionina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina e lisina apareceram em concentrações significativamente mais elevadas ($p < 0,05$) para a intubação com CSD do que com CasNa. Aos 20 minutos da intubação (T20) passaram a predominar de maneira significativa vários aminoácidos no tratamento com CasNa. O tratamento com CSD promoveu maior concentração de proteína sérica aos 10, 20 e 40 minutos após gavagem, tendo alcançado um pico de concentração após 20 minutos (T20).

Pode-se concluir que, embora o CSD não tenha diferido dos demais concentrados e da caseína comercial quanto aos índices relacionados ao crescimento (PER, NPR), apresentou-se superior quanto ao EQ, Dv e PDCAAS. Quanto à digestão da proteína e absorção de aminoácidos, o CSD apresentou mais alta digestibilidade e absorção de aminoácidos que se refletiu em uma maior concentração de proteína no soro sanguíneo.

General Summary

The present work represent a part of a larger project aiming at the production of functional ingredients from bovine milk. For this particular research the main objectives were: a) production of milk derivatives in the forms of lyophilized sweet whey protein concentrate (WPC), casein coagulum in a dehydrated form (Cas-Co) and sodium caseinate (NaCas); b) physical and chemical characterization of the concentrates obtained; c) determination of the protein nutritive values by the PER, NPR, CS, Dv, PDCAAS indices for all three protein concentrates obtained at pilot plant, comparatively to a commercial casein (CC), by the use of weanling rats of the Wistar strain; d) a comparative study between WPC and NaCas as to degree of protein digestibility and amino acid absorption, using adult rats of the Wistar strain and the stomach intubation technique with subsequent withdrawn of blood from portal vein after 10, 20, 40 and 60 minutes of intubation (T10, T20, T40, T60). The small intestine was also removed and the content was used for total protein.

The percent composition (on a dry basis) of the three protein concentrates was as follow: WPC, protein 83,84%, ash 2,77%, lactose 8,88%, total lipids 4,48% and total solids 96,37%; Cas-Co, protein 80,78%, ash 5,08%, lactose 12,51%, total lipids 1,61% and total solids 92,71%; NaCas, protein 76,88%, ash 9,01%, lactose 19,91%, total lipids 1,66% and total solids 93,82%. Solubility (%) was 93,09 for WPC (citrate phosphate buffer 0,01M, pH 4,6, room temperature), for Cas-Co and NaCas solubility (%) was 35,12 and 98,20, respectively (in water, pH 7,0, room temperature).

The protein nutritive value indices were as follow: essential amino acid chemical scores (CS) 1,02, 0,79, 0,84 and 0,87, respectively, for WPC, Cas-Co, NaCas and CC (commercial casein). The true digestibility (Dv %) was 94,92, 91,97, 94,81 and 93,57, respectively for WPC, Cas-Co, NaCas and CC, being the value for the Cas-Co statistically inferior ($p < 0,05$) to the other three concentrates which were statistically identical among themselves. The PDCAAS (CS \times Dv %) was 96,8, 72,4, 79,6 and 81,4, respectively for WPC, Cas-Co, NaCas and CC. The

PER values were in the range 3.65 to 3.15 for the Cas-Co and NaCas, respectively, being statistically inferior ($p < 0,05$) for NaCas, with no statistical differences among the other three concentrates. The NPR presented values in the range 3.83 and 3.62 with no statistical differences among the treatments.

The protein digestibility and amino acid absorption study for WPC and NaCas showed the following results: after 10 minutes of intubation (T10) the amino acid proline, alanine, cysteine, methionine, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine and lysine were at significantly higher concentrations ($p < 0,05$) for the intubation with WPC compared with NaCas. After 20 minutes of intubation (T20), several amino acids predominated in the NaCas treatment. The WPC treatment promoted higher serum protein concentrations at 10, 20 and 40 minutes of the intubation, reaching a peak of concentration at T20.

The results permit to conclude that, although WPC had not differed from the other protein concentrates as to the growth promoting indices (PER, NPR), it was superior as to the CS, Dv and PDCAAS. Regarding protein digestion and amino acid absorption, the WPC revealed higher digestibility and absorption of amino acids leading to higher blood serum protein concentration.

CAPÍTULO 1

“PROTEÍNAS DO LEITE BOVINO: ESTADO ATUAL DO CONHECIMENTO”

1. Introdução

Soro de leite é um subproduto do leite obtido durante a produção de queijo ou de caseína. Com o surgimento de novas tecnologias, o soro e suas frações se tornaram ingredientes alimentares muito versáteis e valorizados hoje em dia. O soro é uma fonte econômica de proteínas que oferece uma série de benefícios funcionais em suas aplicações alimentícias. Produtos de soro incluindo a lactose, melhoram a textura, realçam sabor e cor, emulsificam e estabilizam os sistemas emulsificados, melhoram a dispersabilidade em misturas secas, ampliam a vida de prateleira e possuem uma série de outras propriedades que aumentam a qualidade final dos produtos alimentícios (Smithers *et al.*, 1996).

Proteínas de soro podem se tornar ingredientes chave para o desenvolvimento de produtos inovativos, como: bebidas para esportistas, contendo alto teor protéico e baixas quantidades de lipídios e lactose; substitutos de dietas enterais, produtos médicos nutricionais, também com baixa concentração lipídica e de lactose (efeito indesejado em alimentos pela possível ocorrência da reação de Maillard e pela intolerância de certos indivíduos à lactose); podem ainda ser utilizados na elaboração de filmes protéicos ou agentes flavorizantes, entre outras propriedades funcionais de interesse para a indústria alimentícia em geral (Huffman, 1996).

Com a urbanização acelerada e a globalização da economia, os alimentos processados e os formulados adquirem importância cada vez maior na vida das populações, pela sua conservabilidade e maior conveniência. Além destas características, existe uma preocupação mundial em se oferecer à população, alimentos que contenham em sua composição um ou mais componentes

classificados como fisiológico-funcionais, isto é, compostos que atuam no organismo, no sentido de prevenir e/ou retardar determinadas doenças ou estados patológicos (Huffman *et al.*, 1996).

Algumas patologias tendem a se estabelecer na vida de uma pessoa e, por se agravarem a partir da meia idade, são conhecidas como doenças crônicas e/ou degenerativas, como a aterosclerose, o diabetes, a hipertensão, a osteoporose, alergias, além dos males de Alzheimer e Parkinson (Brink, 1996).

Na década de 90, muitos países se mobilizaram para desenvolver alimentos que além de promoverem efeitos especiais sobre a saúde, fornecem nutrientes especiais e calorias que o organismo humano necessita. Estes alimentos receberam a denominação de nutracêuticos ou alimentos funcionais pelos pesquisadores (Frokjaer, 1994).

2. Propriedades tecnológicas

O leite e seus componentes protéicos apresentam importantes propriedades funcionais, tanto sob o aspecto tecnológico como sob o fisiológico. As propriedades funcionais das proteínas de interesse tecnológico, dependem fundamentalmente de sua composição, estrutura e suas propriedades físico-químicas.

As propriedades funcionais importantes são aquelas que melhoram o comportamento tecnológico da proteína, melhorando as características de aparência e sensoriais do produto que as contém e, portanto, aumentando sua aceitação pelo consumidor. Dentre essas propriedades as de maior interesse são: propriedades emulsificantes, formação de biofilmes e de micropartículas, solubilidade, capacidade de geleificação e capacidade de formação de espuma (Morr & Foegedind, 1990).

A solubilidade é uma propriedade funcional importante das proteínas de soro, sendo solúvel a várias faixas de pH, quando não sofreram desnaturação durante sua obtenção. No entanto, aquecimento a temperaturas acima de 70°C, causam perda da solubilidade no pH de 3,0 a 5,0, devido à precipitação de algumas das proteínas do soro no seu ponto isoelétrico (pI 4,5 - 5,3). Sob condições apropriadas de aquecimento, as proteínas do soro formam géis irreversíveis quando dissolvidas em água na concentração de 7% e aquecidas em torno de 65°C, formando uma rede tridimensional, capaz de reter água, formando géis (Huffman, 1996).

As proteínas do soro apresentam diferentes sensibilidades para temperaturas acima de 50°C. O grau de desnaturação da proteína durante o processamento depende da concentração total de sólidos e de proteína, tempo de exposição, pH e força iônica (Marshall & Harper, 1988).

Existem diferenças estruturais e funcionais entre os vários tipos de caseínas e as proteínas do soro. As caseínas são organizadas em micelas (0,1-0,2 μm de diâmetro), formadas principalmente por α , β e κ -caseínas e fosfato de cálcio coloidal. As caseínas apresentam estruturas mais abertas e flexíveis, e portanto exibem alta estabilidade térmica e elevada capacidade emulsificante, e de formação de filmes. Já as proteínas do soro apresentam estrutura tipicamente globular, as quais são estabilizadas pelo elevado número de pontes dissulfeto. Essas proteínas são mais susceptíveis à desnaturação térmica e com isso podem ter suas propriedades funcionais alteradas (Sgarbieri, 1996).

As caseínas e as proteínas de soro têm sido utilizadas como substitutos de gordura em produtos de baixa caloria, pelas suas propriedades geleificantes e emulsificantes e também pela possibilidade de sua transformação em micropartículas. Proteínas microparticuladas funcionam como gotículas de gordura em emulsões do tipo óleo/água, conferindo estabilidade ao sistema, além da sensação gustativa muito semelhante à gordura (Yost & Kinsella, 1992).

As principais proteínas do leite de vaca são as caseínas, representando aproximadamente 80% das proteínas totais, e as proteínas do soro, compondo aproximadamente 20%. As caseínas podem ser separadas das proteínas do soro por dois processos principais: precipitação no pH isoelétrico (pH 4,6 a 20°C) e através da coagulação pela ação da enzima quimosina (renina), utilizada no processo industrial de fabricação de queijos (Sgarbieri, 1996).

Quando a caseína do leite é removida, seja durante o processamento do queijo, ou a simples precipitação da caseína pela adição de ácido, até o ponto isoelétrico (pH 4,6) permanecem no soro do leite, as proteínas e os peptídios resultantes da ação enzimática ou da precipitação ácida da caseína e ainda uma pequena e variável quantidade de β -caseína (Marshall & Harper, 1988).

As proteínas do soro incluem β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactoalbumina (α -La), imunoglobulinas (Ig), albumina de soro bovino (BSA), lactoferrina, lactoperoxidase e polipeptídios de baixo peso molecular, derivados da proteólise de algumas caseínas. A β -Lg e a α -La representam as principais proteínas do soro, contando com 80%, sendo que 55% é representado pela β -Lg e 25% pela α -La (Horne, 1990).

A β -Lg é a proteína que se encontra em maior quantidade, aproximadamente 50% das proteínas do soro de leite bovino. A estrutura desta proteína depende do pH. Em pHs entre 5,2 e 7,5, a β -Lg se encontra na forma de um dímero; a pHs abaixo de 3,5 e acima de 7,5, se encontra sob a forma de monômero; e entre os pHs de 3,5 e 5,2, sob a forma de um octâmero. A β -Lg apresenta em sua cadeia protéica 5 resíduos de cistina, dispostos como ligações dissulfídicas intramoleculares e um grupamento SH, não reativo. A presença destes resíduos de aminoácidos sulfurados na molécula, com grupos -SH livre, facilita a polimerização, pela formação de ligações dissulfídicas covalentes intermoleculares durante processamento a altas temperaturas e estocagem da proteína. Por apresentar em sua estrutura 15% de α -hélice, 43% de folhas- β e

43% de estrutura desordenada, é sensível ao pH e à temperatura, dependendo do tempo de exposição à temperaturas acima de 65°C. É resistente à digestão enzimática devido à sua conformação estável. Por ser uma proteína termolábil, à temperaturas utilizadas durante os processamentos pode ter sua digestibilidade alterada, com reflexo na disponibilidade biológica (Morr & Há, 1993).

A α -La é a segunda proteína presente em maior quantidade, representando 20% do total das proteínas do soro. Possui estrutura globular compacta contendo 4 ligações dissulfídicas intramoleculares. Morr & Ha (1993), mostraram que a α -La foi desnaturada a 65,2°C e pH 6,7, e que 80 a 90% da desnaturação se reverteu com o congelamento. Morr & Ha (1993), reportaram também que a α -La desnaturou a 62-63°C e que 90% da estrutura original foi recuperada no pH 6,5. Este alto grau de renaturação é provavelmente responsável pela aparente resistência desta proteína ao calor. A presença de íons Ca^{+2} , fortemente interligados nos resíduos de ácido aspártico da α -La, garante sua estabilidade conformacional.

3. Características nutricionais das proteínas de leite

As proteínas de soro de leite possuem propriedades nutritivas e funcionais bem superiores às outras proteínas de origem animal e às de origem vegetal. Essas proteínas têm sido utilizadas cada vez mais em nutrição humana pelo seu elevado valor nutritivo, superior às do ovo integral e às do leite humano, além de apresentarem várias propriedades fisiológicas especiais (Renner, 1988). O perfil de aminoácidos das proteínas do soro de leite de vaca é muito semelhante ao das proteínas do leite humano, prestando-se muito bem para formulação de produtos que substituam, com vantagens, o leite de vaca na alimentação infantil (Hambraeus, 1982).

As atividades biológicas e nutricionais das proteínas de soro parecem estar relacionadas com seu perfil aminoacídico e com o tipo de processamento

envolvido para sua obtenção. Estudos realizados por Bounous & Gold (1991), demonstraram que a atividade biológica das proteínas de soro só foram mantidas, quando estas não sofreram qualquer tipo de desnaturação, seja durante o processamento ou por adição de substâncias ou agentes desnaturantes.

As caseínas e as proteínas do soro contêm quantidades variáveis e proporção correta de aminoácidos que o organismo necessita. As proteínas do soro se destacam, também pela sua excelente digestibilidade e por serem completamente biodisponíveis. Muitos produtos do soro vêm sendo desenvolvidos e utilizados devido às suas vantagens nutricionais, uma vez que constituem uma fonte de proteínas, carboidratos e minerais tais como o cálcio, com uma relação custo-benefício extremamente eficiente. Avaliada segundo o método Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scoring, descrito por Henley & Kuster (1994), as proteínas do soro alcançam o valor igual ou superior a 1,0, em função de sua excelente digestibilidade e pelo fato de fornecer ou superar a quantidade recomendada de cada aminoácido essencial. Também quando são usados outros métodos de determinação de qualidade protéica, como o PER (quociente de eficiência protéica), o soro de leite obtém excelente pontuação na escala, uma vez que a caseína, considerada proteína de referência apresenta valores próximos de 2,5 para o PER, enquanto as proteínas de soro alcançam valores acima de 3,0, demonstrando seu alto valor nutritivo (U.S. Dairy Export Council, 1997).

Um ensaio biológico com ratos, descrito por Guzmán (1995), comparou o valor biológico, PER e NPU (utilização líquida da proteína) entre as proteínas de soro e a caseína. Como resultado deste experimento, as proteínas do soro foram consideradas nutricionalmente superiores em relação à caseína, para os índices determinados.

Em uma avaliação realizada segundo o método de PDCAAS (Henley & Kuster (1994), as proteínas de soro alcançaram valores igual ou superiores a 1,0 em função de sua excelente digestibilidade e também pelo fato de superar a quantidade recomendada de cada aminoácido essencial.

Várias características da composição de aminoácidos das proteínas do soro são altamente desejadas, especialmente para produtos destinados à alimentação infantil, como por exemplo, a relação ideal igual a 1,0 para cisteína/metionina, baixos teores de aminoácidos aromáticos, particularmente fenilalanina e tirosina, favorecendo crianças com fenilcetonúria (Hambraeus, 1982).

Heine *et al* (1991), estudaram a substituição de leite materno por fórmulas infantis à base de leite bovino e demonstraram o cuidado que se deve ter com este tipo de formulação. Apesar da concentração protéica do leite humano ser inferior à concentração protéica do leite bovino, no leite humano, encontram-se quantidades adequadas de aminoácidos essenciais e outros fatores para a maturação dos órgãos do bebê e não apenas para o crescimento.

Em relação às deficiências de aminoácidos, a mais surpreendente diferença entre o leite bovino e o humano são as concentrações mais baixas de triptofano e cisteína, presentes no leite bovino. Ambos aminoácidos são vitais para o desempenho de importantes vias fisiológicas. O triptofano, por exemplo é um precursor da serotonina (responsável pela regulação do sono); a cisteína é um componente da glutathione, a qual está envolvida com a proteção do organismo contra a peroxidação lipídica e estímulos à produção de linfócitos (Heine *et al.*, 1991).

A α -La é uma das proteínas presentes no soro de leite, tanto bovino, quanto humano. Em ambas as espécies, essa proteína apresenta função importante na síntese da lactose. Suas propriedades estruturais ajudam a minimizar efeitos antigênicos indesejáveis do leite bovino, quando este for utilizado para alimentação infantil. A α -La apresenta um significado nutricional marcante. Em relação à composição aminoacídica, é considerada singular; apresenta escore químico elevado e os aminoácidos essenciais estão em elevada proporção, 63,2%

dos aminoácidos totais. São eles: triptofano, fenilalanina+tirosina, leucina, isoleucina, treonina, metionina+cisteína, lisina e valina (Heine *et al.*, 1991).

Além das diferenças na concentração de proteínas totais e de caseínas, por serem bem menores no leite humano em relação ao leite bovino, outra diferença é a ausência de β -Lg no leite humano. Por esse motivo, há uma tendência de certas crianças apresentarem reações alérgicas ao leite de vaca. Nestes casos, o leite de vaca deverá ser substituído por outro produto isento ou com baixo teor de β -Lg.

4. Propriedades funcionais fisiológicas

4.1 Proteínas do soro

As proteínas do soro apresentam propriedades fisiológicas importantes. Segundo Brink (1996), as proteínas do soro parecem ser as únicas capazes de aumentar a resposta imune, os níveis de glutathione celular e prolongar a vida de animais de experimentação. A glutathione é um tripeptídeo composto por 3 aminoácidos: cisteína, ácido glutâmico e glicina, e é encontrada em quase todas as células animais. Possui ação antioxidante, neutralizando radicais livres; protege contra clivagem do DNA causada por raios X e radiações ultravioleta do sol ajudando a manter a capacidade carreadora de oxigênio celular e sanguíneo. Bounous & Gold (1991), demonstraram que uma resposta imune deficiente pode estar associada a baixos níveis de glutathione, uma vez que a glutathione tecidual está relacionada com a capacidade dos linfócitos em responder a um estímulo mitogênico.

A resposta imune humoral, envolvendo a rápida produção de anticorpos também está associada com a capacidade do organismo em sintetizar rapidamente as proteínas e com o tipo de dieta envolvida para esta síntese. As proteínas de soro de leite bovino parecem possuir os aminoácidos essenciais ideais para uma rápida produção de anticorpos (Bounous & Gold, 1991). As proteínas de soro tem sido apontadas como importantes moduladores do sistema

imunológico, tanto o sistema celular como o humoral, estimulando particularmente a formação de células plaquetárias no baço (Bounous *et al.*, 1983), o que parece causar o aumento da longevidade em animais de laboratório (Bounous *et al.*, 1985).

Trabalhos desenvolvidos por Birt *et al.* (1982) mostraram que a mistura de proteínas de soro e de proteína de soja, na proporção de 50%, aumentou a resposta imune em quatro vezes, em relação à dieta com proteína de soja apenas.

Dietas contendo 20% de proteína de soro inibiu e/ou retardou a incidência de câncer de cólon induzido pela dimetilhidrazina (DMH) em camundongos, quando comparado com animais em dieta não purificada de fórmula fechada da Purina e dieta de caseína, todas contendo 20% de proteína (Constantino *et al.*, 1989).

Função biológica e estrutura relacionada às proteínas refletem uma importante fonte de informação sobre as características físico-químicas e propriedades funcionais fisiológicas das proteínas de soro. Muito já se sabe a respeito do tamanho e forma das principais proteínas do soro, sendo interessante avaliar sua relação com as funções biológicas. A composição e as principais funções biológicas das frações protéicas de soro no leite estão descritas na Tabela 1 (de Wit, 1998).

Tabela 1. Composição e funções biológicas das proteínas de soro de leite bovino

Proteínas de soro	Quantidade (g/L de soro)	Função Biológica
β -Lactoglobulina (β -Lg)	3,2	Transporte de pro-vitamina A
α -Lactalbumina (α -La)	1,2	Síntese de lactose nas glândulas mamárias
Albumina de Soro Bovino (BSA)	0,4	Transporte de ácidos graxos
Imunoglobulina G (IgG)	0,8	Imunidade passiva no recém-nascido
Lactoferrina	0,2	Agente bacteriostático
Lactoperoxidase	0,03	Agente bactericida
Enzimas	0,03	Indicador de saúde
Proteose-peptonas	≥ 1	Atividade opióide

A estrutura globular da β -Lg é estável contra a ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago. A β -Lg é fonte importante de cisteína, aminoácido que, na forma de peptidilcistina, parece estimular a síntese de glutatona, um importante tripeptídeo para o metabolismo (de Wit, 1998).

A função biológica da α -La é atuar como um cofator na síntese da lactose, considerada importante fonte de energia para o recém-nascido. Em $\text{pH} \leq 4,0$ essa proteína se desnatura, ficando susceptível à digestão estomacal pela pepsina (de Wit, 1998).

A BSA (albumina de soro bovino) liga-se a ácidos graxos livres, transportando-os através do sangue e é provavelmente uma importante fonte de produção de glutatona no fígado, que também está associado à atividade de imunoregulação, determinada em testes individuais com humanos portadores de HIV (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (Bounous *et al.*, 1993).

Bounous e colaboradores (1993), demonstraram em seus estudos que a atividade imunomoduladora das proteínas de soro estão relacionadas à ocorrência de grupos gama-glutamilcistina, presentes nas proteínas do soro e responsáveis pela promoção da síntese de glutathione celular. Os grupos glutamilcistina são encontrados na fração de albumina sérica (6 grupos/molécula) e em algumas proteínas do soro de leite, como a β -Lg, a lactoferrina e a albumina sérica, que também se encontra no soro de leite.

A IgG é conhecida como um carreador de imunidade passiva para o recém-nascido. As imunoglobulinas presentes no sangue bovino são idênticas às encontradas no sangue humano.

A lactoferrina, conhecida como proteína bioativa, apresenta algumas importantes funções biológicas, entre elas a atividade bacteriostática, a qual parece influenciar o crescimento de microorganismos por dois mecanismos. O primeiro, envolve a capacidade da lactoferrina em se ligar à íons ferro, e então impedir o crescimento bacteriano por sua privação. O segundo, parece estar relacionado com a interação da proteína à parede celular do microorganismo, comprometendo a sua integridade, afetando a permeabilidade e estrutura (Ellison, 1990). A lactoferrina pode ser secretada no leite (protegendo os recém-nascidos), saliva, lágrimas, secreções nasais e intestinais, suco pancreático e fluido seminal. Possui também, atividade nutricional, facilitando a absorção de minerais, entre eles o ferro, tornando-o mais disponível no organismo (de Wit, 1998).

As condições de processamento das proteínas do soro parecem influenciar sua funcionalidade fisiológica. Alguns estudos realizados por Smithers *et al.* (1996), revelaram que a porcentagem de solubilidade e a atividade da enzima lactoperoxidase e a presença de lactoferrina estão relacionadas com as atividades biológicas das proteínas do soro. Chegou-se à conclusão que um produto com baixa atividade biológica havia recebido tratamento térmico drástico com conseqüente desnaturação de suas proteínas e perda da função biológica.

4.2 Peptídios bioativos

Nos últimos anos, tem-se estudado o papel fisiológico de um grupo de substâncias chamadas de peptídios bioativos, derivados das proteínas do leite. Estes peptídios são produzidos através da proteólise da caseína ou proteínas de soro, tanto humana como bovina (Tirelli *et al.*, 1997).

Os peptídios bioativos derivados do leite são inativos dentro da seqüência de aminoácidos da proteína, e podem ser liberados por proteólise enzimática durante a digestão gastrointestinal, ou durante o processamento do alimento. Uma vez liberados no organismo, esses peptídios podem agir como compostos reguladores, com atividade hormonal, ou ainda exercer duas ou mais atividades biológicas diferentes (Meisel, 1998).

Para se levar em consideração o valor protéico de determinado alimento, é necessário considerar a relação entre a estrutura da proteína e a composição de peptídios liberados durante digestão no trato gastrointestinal. A identificação de algumas seqüências bioativas em alimentos protéicos, introduzem um novo critério de avaliação nutricional ou funcional da proteína: peptídios encontrados no estado inativo dentro da seqüência da proteína podem ser liberados por processo proteolítico *in vivo* e podem agir, por exemplo, como moduladores fisiológicos de funções gastrointestinais durante digestão dos precursores da síntese de proteína (Meisel *et al.*, 1989).

Para o recém-nascido, o colostro materno e o leite, não possuem apenas fonte de nutrientes, mas também substâncias biologicamente ativas, como: agentes anti-inflamatórios, peptídios indutores do sono, fatores de crescimento, fator de crescimento epidérmico, peptídios imunoestimuladores e hormônios (Arioshi, 1993).

As bioatividades do leite incluem: regulação da digestão e das funções gastrointestinais e hemodinâmicas, hormônios e fatores de crescimento potencialmente capazes de influenciar no desenvolvimento e crescimento do trato gastrointestinal no recém-nascido, imunoregulação e regulação da microflora intestinal (Schanbacher *et al.*, 1998).

Alguns peptídios derivados da digestão da caseína apresentam efeito anti-hipertensivo. Esses peptídios são chamados casocininas, correspondentes a fragmentos de α_{s1} - caseínas e β - caseínas. As casocininas são inibidoras da enzima conversora de angiotensina (ACE). Esta enzima hidrolisa a angiotensina I a angiotensina II, esta última com a propriedade de aumentar a pressão nos vasos sanguíneos. A liberação de angiotensina II, aumenta a produção de aldosterona, diminuindo assim a excreção renal de água e sais e aumentando a retenção de água e o volume de fluidos extra celulares. Há também a presença de peptídios anti-hipertensivo nas proteínas do soro, localizados na sequência primária da β -lactoglobulina e liberados após a digestão da mesma (Tirelli *et al.*, 1997).

Alguns dos maiores agentes bioativos do leite incluem os peptídios opióides, compostos por uma cadeia de 5 a 10 aminoácidos. São chamados casomorfina ou exorfina por sua capacidade de se ligar a receptores opióides no epitélio intestinal ou em outras células. As casomorfina afetam a função gastrointestinal, inibindo o grau de esvaziamento gástrico e a motilidade intestinal, retardando a passagem da dieta pelo intestino e ao mesmo tempo interferindo na absorção de aminoácidos e eletrólitos, pelo intestino (Schanbacher *et al.*, 1998).

Os peptídios opióides endógenos também estão envolvidos na regulação da ingestão de certos tipos de alimentos, tanto em humanos, quanto em ratos. Esses peptídios podem influenciar mediando a resposta no centro do prazer, em relação a determinados alimentos. A preferência de paladar doce parece estar associada ao controle opióide. Alguns estudos demonstraram que drogas

antagonistas opióides diminuem a preferência à glicose ou sacarose em animais de laboratório (Drewnowski, 1992).

5. Métodos de obtenção de concentrado protéico de soro de leite

O soro de leite é considerado um subproduto na indústria de laticínios. A produção mundial de soro é estimada em 145 milhões de toneladas por ano, onde apenas 60% é recuperado (Perea *et al.*, 1993). A análise do soro revela dois aspectos que tornam importante o seu controle antes do descarte. Primeiro, no soro se encontra quase 100% do carboidrato do leite, a lactose e segundo, o soro contém 20% do total das proteínas presentes no leite. Estes dois componentes são responsáveis pela alta putrescibilidade e alta demanda de oxigênio biológico, devendo o soro não ser descartado sem tratamento prévio. Deste modo, vem se notando claramente uma expansão da utilização das proteínas do soro como um todo ou em suas frações (Perea *et al.*, 1993).

A indústria de laticínios têm investido em tecnologias para obtenção de métodos de concentração e fracionamento dos componentes do soro. Os principais e os mais utilizados métodos são os baseados na tecnologia de membranas. Dentre eles se destacam como principais, a osmose reversa, a nanofiltração, a ultrafiltração e a microfiltração. A escolha de um sistema é ditado principalmente pela sua aplicação, devendo sempre se levar em consideração a porosidade da membrana e o coeficiente de rejeição. A importância da escolha do diâmetro do poro deve ser analisada através do peso molecular da partícula que se deseja reter ou descartar (Bird, 1996).

Para se obter concentrados protéicos de soro de leite, são necessários processos específicos, de acordo com a concentração de proteína que se deseja obter. Para obtenção de um concentrado protéico de soro contendo 80% de proteína, é necessário utilizar um processo à base de membranas, a ultrafiltração, seguida de diafiltração. A ultrafiltração (UF), consiste na separação física de

macromoléculas, como proteínas e lipídios, de moléculas menores como lactose, água e minerais. A membrana que é feita de materiais diversos, é projetada para reter moléculas de alto peso molecular, em geral acima de 10 KDa (chamado retentado), e deixar escoar livremente, a água, a lactose e os minerais (chamado permeado). Porém, há necessidade da diafiltração (DF), para aumentar a concentração de proteínas de soro. A DF é feita com as mesmas membranas da UF para aumentar a concentração de proteínas no soro, através da adição contínua de água ao retentado, retirando mais lactose e minerais e concentrando ainda mais as proteínas. O processo de DF aumenta a pureza da proteína no concentrado, aumentando sua utilização como ingrediente nutritivo e funcional (Huffman, 1996). A diafiltração pode ainda ser utilizada para melhorar várias tecnologias de membrana, como a osmose reversa, a nanofiltração e a microfiltração.

A ultrafiltração é o processo mais utilizado para fabricação de concentrado protéico de soro com $\geq 50\%$ de proteína (Morr & Foegeding, 1990).

A ultrafiltração apresenta vantagens em relação a outros processos de separação, como o não envolvimento de mudanças de fase; o processo pode ser conduzido a baixas temperaturas e pressão hidrostática, evitando desnaturação de substâncias termosensíveis e não necessita de agentes químicos (Porter & Michaels, 1970).

Pode-se ainda produzir um concentrado protéico de soro de leite com baixa concentração de lipídios, utilizando um pré-tratamento com membranas de microfiltração. Este processo retém glóbulos de gordura e outras partículas como microorganismos, deixando passar as proteínas e os constituintes de baixo peso molecular do leite (Huffman, 1996).

6. Referências Bibliográficas

- ARIOSHI, Y. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, n.5, p. 139-144, 1993.
- BIRD, J. The application of membrane systems in the dairy industry. **Journal of the Society of Dairy Technology**, London, v.49, n.1, p.16-23, 1996.
- BIRT, D.F.; BAKER, P.Y.; HIRUZA, D.S. Nutritional evaluations of three dietary levels of lactalbumin throughout the lifespan of two generations of Syrian hamsters. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 112, n.11, p.2151-2160, 1982.
- BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J; GOLD, P. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. **Clinical and Investigative Medicine**, Berlin, v.16, n.3, p.204-209, 1993.
- BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Berlin, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.
- BOUNOUS, G.; LETOURNEAU, L.; KONGSHAVN, P.A.L. Influence of dietary protein type on immune system of mice. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.113, n. 7, p. 1415-1421, 1983.
- BOUNOUS, G.; SHENOUDA, N.; KONGSHAVN, P.A.L.; OSMOND, D.G. Mechanism of altered B-cell response induced by changes in dietary protein type in mice. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.115, n. 11, p. 1409-1417, 1985.
- BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. **Life Extension Report**, Life Extension Foundation, Chicago, n. 1, p. 21-28, 1996.

-
- CONSTANTINO, A. M.; BALZOLA, F.; BOUNOUS, G. Modificazioni sulle immunoglobuline A biliari de tipo secretorio on topi nutritive com proteine del siero di latte. **Minerva Dietologia e Gastroenterologia**, Torino, v.35, n.2, p.241-245, 1989.
- de Wit, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science** v.81, n.3, p.597-608, 1998.
- DREWNOWSKI, A. Food preferences and the opioid system, **Trends in Food Science & Technology**, Michigan, v. 3, p. 97-99, 1992.
- ELLISON, R.T.; LAFORCE, F.M.; GIEHL, T.J.; BOOSE, D.S.; DUNN, B.E. Lactoferrin and transferrin damage of gram-negative outer membrane is modulated by Ca⁺² and Mg⁺². **Journal of General Microbiology**, v. 1437, p. 136, 1990.
- FROKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.10, p.86-88, 1994.
- GUZMÁN, G.J. Whey protein concentrate (80%): its importance in human nutrition. **Simpósio Latinoamericano de Ciência de Alimentos**, FEA/UNICAMP, Campinas, Brazil, novembro 13 -16 , p.1-6, 1995.
- HAMBRAEUS, L. Nutritional aspects of milk proteins: In: FOX, P.F. (Ed). **Development of Dairy Chemistry**. London: Applied Sciences, 1982. p. 289-313.
- HEINE, W.E.; KLEIN, P.D.; REEDS, P.J. The importance of α -lactalbumin in infant nutrition; critical review, **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.121, n. 3 p.277-283, 1991.

-
- HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 4, p. 74 – 77, 1994.
- HORNE, D.S. Whey proteins. **Journal of the Society of Dairy Technology**, London, v.53, n.2 p.3-4, 1990.
- HUFFMAN, L.M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Chicago, v.50, n.2, p.49-52, 1996.
- MARSHALL, K.R.; HARPER, W.J. Whey protein concentrates. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Philadelphia, n.233, p.21-23, 1988.
- MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, Germany, v. 8, n. 5/6, p. 363-373, 1998.
- MEISEL, H.; FRISTER, H.; SCHLIMME, E. Biologically active peptides in milk proteins, **Zeitschrift Fur Ernährungswissenschaft**, Germany, v. 28, n. 4, p. 267-278, 1989.
- MORR, C.V.; HA, E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Orlando, v.33, n.6, p.431-473, 1993.
- MORR, C.V.; FOEGEDIND, E.A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. **Food Technology**, Chicago, v. 44, n. 4, p. 100-112, 1990.

-
- PEREA, A.; UGALDE, U.; RODRIGUEZ, I.; SERRA, J.L. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes. **Enzyme Microbiology Technology**, Spain, v. 15, n. 5, p. 418-423, 1993.
- PORTER, M.C.; MICHAELS, A. S. Applications of membrane ultrafiltration to food processing. **Proceedings of the Third International Congress of Food Science and Technology**, Chicago, 1970, p. 462-473.
- RENNER, E. Effect of agricultural practices on milk and dairy products. In: **Nutritional Evaluation of Food Processing**. 3rd Edition, Eds.: Karmas & Harris, Van Nostrand Reinhold, NY, 1988, p.203-224.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. 1^a ed. São Paulo: Varela, 1996. 517p.
- SCHANBACHER, F.L.; TALHOUK, R.S.; MURRAY, F.A.; GHERMAN L.I.; WILLETT, L.B. Milk-borne bioactive peptides. **International Dairy Journal**, Ohio, v. 8, n. 5/6, p. 393-403, 1998.
- SMITHERS, G.W.; BALLARD, F.J.; ADAM, D.C.; SILVA, K.J.; DIONYSIUS, D.A.; FRANCIS, G.L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P.A.; McINTOSH, G.H.; MITCHELL, I.R.; PEARCE, R.J.; REGESTER, G.O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. In: Symposium: Advances in Dairy Foods Processing and Engineering, **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.79, p. 1454-1459, 1996.
- TIRELLI, A.; DE NONI, I.; RESMINI, P. Bioactive peptides in milk products, **Italian Journal Food Science**, Milão, v. 9, n. 2, p. 91-98, 1997.

U.S. DAIRY EXPORT COUNCIL. Manual de referência para produtos de soro dos EUA. 1997, 8 p.

YOST, R.A.; KINSELLA, J.E. Microstruture of whey protein isolate gels contained emulsified butterfat droplets. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 57, n. 4, p. 892-897, 1992.

CAPÍTULO 2

“AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO DOCE, CASEINATO DE SÓDIO E COÁGULO DE CASEÍNA, COMPARADOS À CASEÍNA COMERCIAL.”

RESUMO

O soro representa a fração líquida do leite após eliminação das caseínas. Suas proteínas, embora em quantidades reduzidas (0,6 a 0,9%), apresentam elevado valor nutritivo.

As frações protéicas, produzidas na planta piloto do TECNOLAT – ITAL, Campinas, foram o concentrado protéico de soro doce (CSD), caseinato de sódio (CasNa) e coágulo de caseína (Co-Cas). Suas propriedades nutricionais foram avaliadas comparativamente à caseína comercial (CC). Paralelamente, os produtos foram caracterizados quanto à composição centesimal, solubilidade e perfil de aminoácidos. O CSD apresentou a seguinte composição (em base seca): 83,84% de proteína, 4,48% de lipídios totais, 2,77% de cinzas, 8,88% de lactose e 96,37% de sólidos totais; o Co-Cas continha 80,78% de proteína, 1,61% de lipídios totais, 5,08% de cinzas, 12,51% de lactose e 92,71% de sólidos totais; o CasNa, apresentou 76,88% de proteína, 1,66% de lipídios, 9,01% de cinzas, 19,91% de lactose e 93,85% de sólidos totais. A porcentagem de solubilidade encontrada para o CSD foi de 93,09% em tampão citrato-fosfato, pH 4,6; para o Co-Cas e CasNa, a solubilidade em água, pH ajustado para 7, foi de 35,12% e 98,20%, respectivamente. No ensaio biológico foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar com 21 dias de idade, divididos em 5 grupos de 8 animais por tratamento. A dieta foi a preconizada pelo AIN (American Institute of Nutrition) para ratos em crescimento, variando-se apenas a fonte de proteína, concentração de 10% ao invés de 17% (p/p). Foram determinados os seguintes índices no ensaio biológico com ratos: PER,

NPR e Dv. Os valores de PER variaram de 3,15 (CasNa) a 3,65 (Co-Cas) e os de NPR de 3,62 (Co-Cas) a 3,82 (CSD), não tendo havido diferença estatística entre os tratamentos. A digestibilidade verdadeira (Dv) variou de 91,70% (Co-Cas) a 94,92% (CSD), tendo sido estatisticamente inferior ($p \leq 0,05$) apenas para o Co-Cas. O PDCAAS (Escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade verdadeira - $EQ \times Dv$) variou de 1,02 (CSD) a 0,72 (CAS). Os aminogramas revelaram que o concentrado protéico de soro doce, possui quantidades superiores dos aminoácidos sulfurados, lisina, histidina, leucina e isoleucina em relação ao padrão recomendado pela FAO/WHO/UNU.

1. INTRODUÇÃO

O leite é um produto de secreção das glândulas mamárias dos mamíferos e constitui uma das principais fontes de proteína na alimentação de animais jovens e humanos de todas as idades (Sgarbieri, 1996). O leite bovino, apesar de conter todos os nutrientes necessários para sustentar a vida dos indivíduos jovens de sua espécie, não os contém em níveis ideais e balanceados para humanos e outros mamíferos (Guzmán, 1995).

As proteínas do leite bovino se dividem em dois grandes grupos: as caseínas, que constituem aproximadamente 80% do total de proteína do leite e as proteínas do soro, que correspondem à aproximadamente 20%. As caseínas podem ser separadas das proteínas do soro por dois processos principais: coagulação através da ação de enzimas proteolíticas - coalho (processo de fabricação de queijos) ou precipitação no pH isoeletrico da caseína (pH 4,6 à 20°C) (Wong *et al.*, 1996). O soro é a porção líquida que permanece solúvel após a precipitação da caseína, seja pela adição de coalho ou pela adição de ácido (Guzmán, 1995). Se a remoção da caseína é feita pela ação do coalho, o soro recebe a denominação de "soro doce", se for feita pela adição de ácido (pH 4,6), recebe o nome de "soro ácido". O soro derivado da ação do coalho apresenta maior quantidade de peptídios e aminoácidos livres, pela ação das proteases sobre as caseínas (Wong *et al.*, 1996).

As principais proteínas do soro de leite bovino são a β -lactoglobulina (β -Lg) e a α -lactoalbumina (α -La) e representam 70% a 80% do total das proteínas do soro. As demais proteínas existentes, em menor quantidade, incluem os glicomacropéptidos (fragmentos de caseína que se encontram solúveis após a hidrólise da caseína pelo coalho), albumina de soro bovino (com a função idêntica à proteína do sangue, atuando no transporte, principalmente de ácidos graxos livres), lactoferrina (inibe atividade microbológica), imunoglobulinas (atuam como agentes imunizantes), fosfolipoproteínas, alguns fatores bioativos como fator de

crescimento, peptídios biologicamente ativos e enzimas (Harper & Mangino, 1997). Também estão presentes vitaminas e minerais solúveis no soro de leite.

Tanto as proteínas quanto as vitaminas associadas às proteínas e outros compostos de alto peso molecular, como os lipídios, podem ser concentrados no processo de ultrafiltração, onde são retidos em membranas com determinada porosidade (retentado), enquanto que a lactose e outros compostos de menor peso molecular, como certos peptídios, passam pela membrana (permeado) (Horton, 1996; Huffman, 1996). A ultrafiltração é um processo industrial de fracionamento do soro, com o objetivo de se obter alta concentração de proteína, onde uma solução é passada sob pressão por uma membrana de porosidade conhecida (Morr & Ha, 1993). Trata-se de um processo que permite a separação seletiva de diversos componentes de uma mesma solução através da retenção de partículas de alto peso molecular, chamado retentado (proteínas, glóbulos de gordura, microorganismos) e a permeação de substâncias de baixo peso molecular, chamado permeado (água, lactose e minerais).

A qualidade de uma proteína, também conhecida como valor nutritivo ou nutricional, depende do conteúdo de aminoácidos e da utilização destes aminoácidos após digestão e absorção. A disponibilidade de aminoácidos varia de acordo com a fonte protéica, o processamento para sua obtenção e a interação com outros componentes da dieta. Qualquer fator que altere a digestibilidade das proteínas pode afetar seu valor nutricional, pois acarreta em uma oferta menor de aminoácidos, di e tri-peptídios (Friedman, 1996). Dentre os fatores que determinam a qualidade nutricional de uma proteína têm-se a digestibilidade, composição de aminoácidos e sua biodisponibilidade.

As proteínas de soro são excelentes fontes de aminoácidos essenciais de fácil digestão. Possuem altas quantidades de aminoácidos de cadeia ramificada, como a leucina, isoleucina, valina, além de elevada concentração de lisina; podem

ser utilizadas na produção de fórmulas infantis e para formulação de alimentos com finalidade de ganho e/ou perda de peso (Huffman, 1996).

No presente trabalho objetivou-se realizar a caracterização química e avaliação nutricional dos seguintes produtos obtidos em planta piloto: concentrado protéico de soro de leite liofilizado, caseinato de sódio e coágulo de caseína desidratados, em comparação a uma caseína comercial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

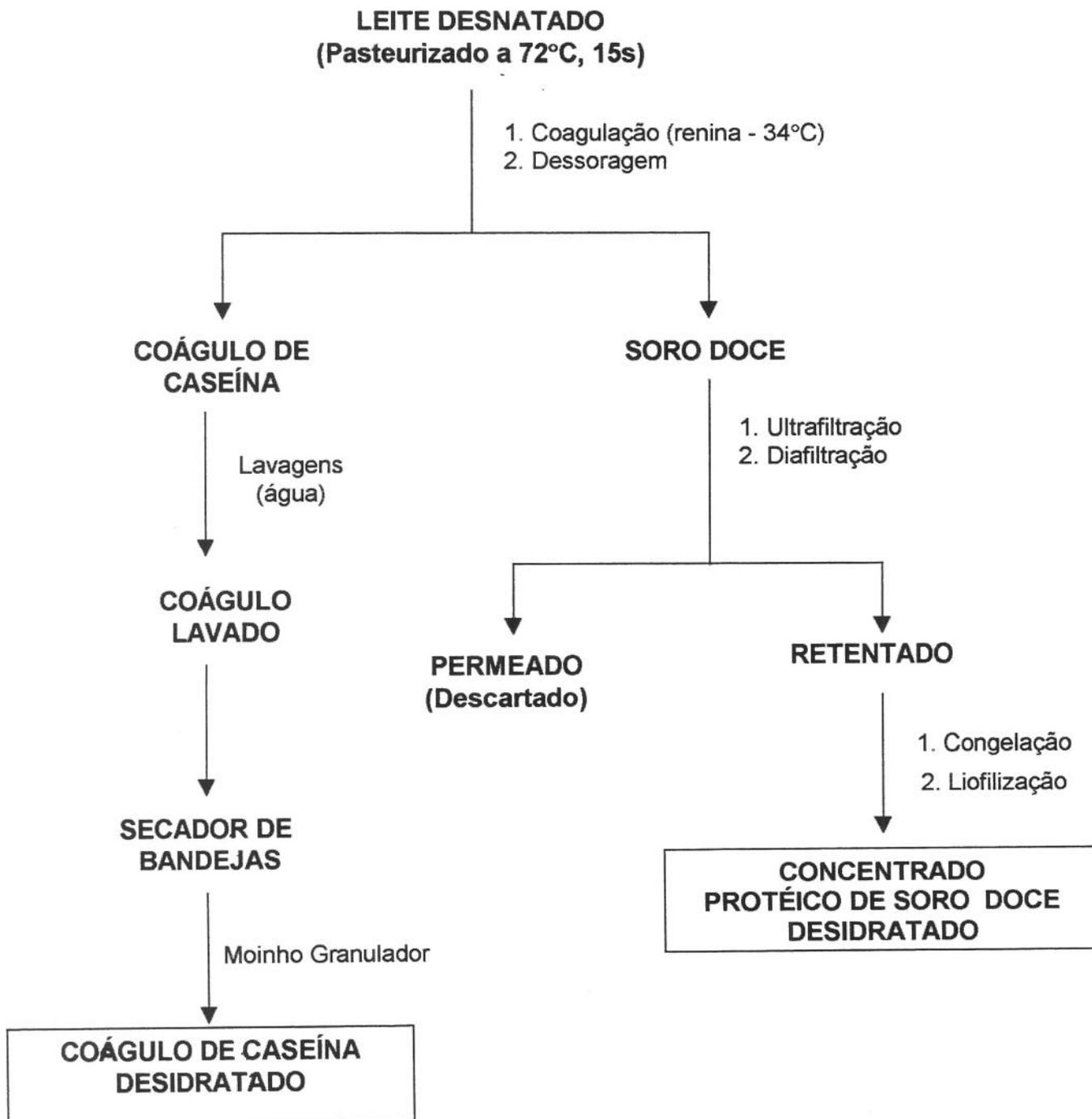
2.1 Matéria - prima

Leite tipo B desnatado e pasteurizado (72°C, 15s) foi fornecido pela Cooperativa dos Produtores de Leite de Campinas, município de Jaguariúna (S.P.). O processamento foi realizado na planta piloto do Centro de Tecnologia de Laticínios (TECNOLAT), do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL).

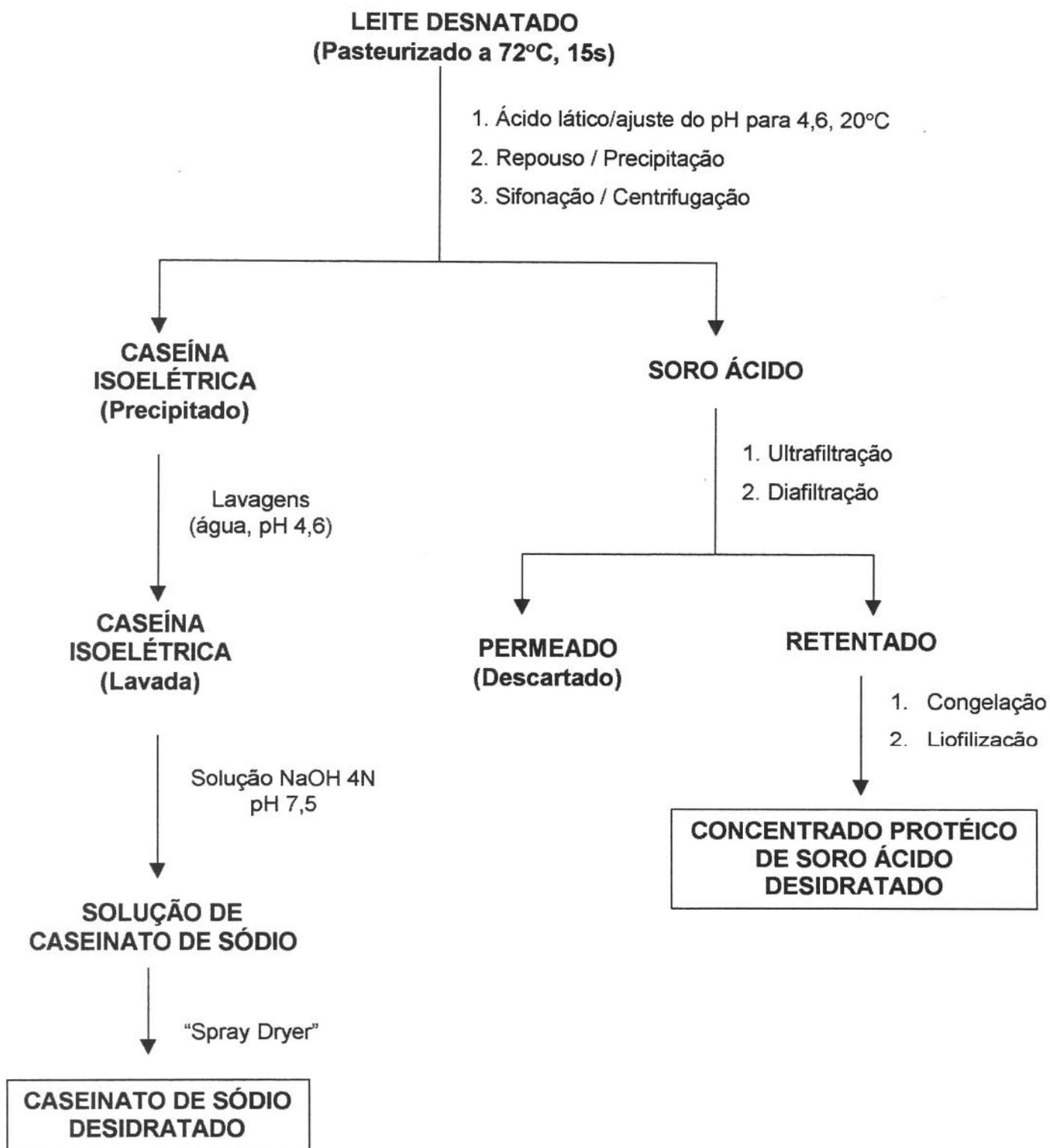
2.2 Obtenção dos concentrados protéicos de soro e caseínas

O procedimento para obtenção dos concentrados protéicos de soro e das caseínas, apresentados nos Fluxogramas 1 e 2, foi semelhante ao proposto por Bounous & Gold (1991), procurando preservar as propriedades biológicas e nutricionais destas proteínas, através da minimização do tratamento térmico, durante o processamento da matéria-prima.

Os fluxogramas seguidos para a obtenção de concentrado protéico de soro doce (CSD), de coágulo de caseína desidratado (Co-Cas), de concentrado protéico de soro ácido (CSA) e de caseinato de sódio (CasNa) são ilustrados nos Fluxogramas 1 e 2.



Fluxograma 1. Processo de obtenção do concentrado protéico de soro doce e do coágulo de caseína.



Fluxograma 2. Processo de obtenção do concentrado protéico de soro ácido e do caseinato de sódio.

2.2.1 Obtenção do soro doce

Imediatamente após recebimento, o leite foi colocado em tanques com camisa de vapor e aquecido a 34°C para adição de solução de CaCl_2 50% (25mL de solução/ 100L de leite) e coalho - renina (30mL/ 100L de leite). Após o repouso de aproximadamente 40 minutos efetuou-se o corte da massa de caseína para a dessoragem.

A pasteurização do leite foi aplicada à 72°C por 15 segundos (HTST) para que fosse preservada a integridade das proteínas e a estabilização microbiológica do produto.

2.2.2 Obtenção do concentrado protéico de soro doce

O soro foi coletado em tambores de 50L e transferidos para tanques de inox (marca TQ-BIASINOX) com capacidade para 500L para concentração pelo sistema de ultrafiltração e diafiltração, utilizando membrana de 10 KDa de corte de peso molecular. O equipamento de ultrafiltração utilizado foi da marca WGM Equipamentos/KOCH Membrane Systems.

O permeado, contendo a lactose, sais minerais e vitaminas foi descartado e o retentado foi desidratado pelo processo de liofilização. O processo de secagem foi realizado em São Paulo com a colaboração da empresa LIOTÉCNICA, Embú - S.P. Obteve-se assim, o "Concentrado Protéico de Soro Doce" desidratado (CSD).

2.2.3 Obtenção do coágulo de caseína

O coágulo de caseína foi obtido após a separação do soro e em seguida submetido a diversas lavagens com água, para que todo soro residual presente, pudesse ser removido. O material lavado foi acondicionado em bandejas e desidratado a 60°C por 4 horas, em secador de circulação de ar quente (marca

Proctor & Schwartz; INC, Philadelphia . PA. USA). O coágulo foi homogeneizado em Moinho Granulador, (marca TREU). Obteve-se assim o “Coágulo de Caseína” (Co-Cas) desidratado e moído.

2.2.4 Obtenção do concentrado protéico de soro ácido

O leite desnatado e pasteurizado foi aquecido em tanque com camisa de vapor até a temperatura de 20°C. Procedeu-se acidificação até o ponto isoelétrico da caseína (pH4,6) pela adição de ácido láctico, e após repouso de aproximadamente 40 minutos, houve completa precipitação da caseína.

O soro foi coletado por sifonação (parte superior) e a parte inferior centrifugada em centrífuga de cesto para remoção de resíduos de caseína. Após a centrifugação, o soro foi concentrado por processo de ultrafiltração seguido de diafiltração em membrana de 10 KDa de corte. O permeado foi descartado e o retentado foi desidratado por liofilização, obtendo o “Concentrado Protéico de Soro Ácido” desidratado (CSA).

2.2.5 Obtenção do caseinato de sódio

A caseína isoelétrica foi submetida a várias lavagens com água em pH 4,6 e ressuspensa em água destilada. O pH da dispersão foi elevado para 7,5 com solução de NaOH 4N, seguido de homogeneização até solubilização. Esta solução foi desidratada em secador atomizador (spray dryer), com temperaturas de entrada e saída de 180 e 95°C, respectivamente. Obteve-se assim o “Caseinato de Sódio” desidratado (CasNa).

2.3. Controle da qualidade dos produtos

Dois controles foram utilizados para avaliar a qualidade dos produtos obtidos, a desnaturação da proteína por perda da solubilidade e a contaminação microbiológica.

Para avaliar o efeito das condições operacionais na desnaturação protéica dos concentrados e caseínas, foi feita análise da porcentagem de solubilidade protéica, segundo a metodologia descrita por Morr *et al.* (1985). A porcentagem de solubilidade protéica foi um dos índices utilizados por pesquisadores canadenses (Bounous *et al.*, 1989) para controlar o grau de desnaturação da proteína.

2.4 Determinação de solubilidade

Foi determinada pela metodologia descrita por Morr *et al.* (1985). Este método consiste em uma modificação do método de determinação do índice de nitrogênio solúvel. As caseínas na concentração de 1% (p/v) de proteína foram dispersas em água destilada e os concentrados de soro doce 1% (p/v) em tampão citrato-fosfato pH 4,6. As suspensões de caseínas tiveram seu pH ajustado para 7,0, com soluções de NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. As suspensões foram agitadas em agitador rotativo por uma hora à temperatura ambiente e em seguida, centrifugadas a 13.000 rpm durante 30 minutos em centrífuga Beckman (modelo Avanti TM J-25). Retirou-se uma alíquota do sobrenadante filtrado para determinação de proteína solúvel pelo método de Kjeldahl. A concentração de proteína solúvel (PS) expressa em porcentagem foi calculada pela expressão:

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

2.5 Controle microbiológico

O controle microbiológico foi realizado em várias fases do processamento segundo metodologia da American Public Health of Water and Wastewater, traduzida por Silva *et al.*, (1997).

2.6 Métodos Analíticos

2.6.1 Composição centesimal

- **Nitrogênio total.** Foi determinado pelo método de semi-micro Kjeldahl, descrito pela AOAC (1990). A proteína total foi obtida multiplicando-se o valor de nitrogênio total pelo fator de correção 6,38 (produtos lácteos).
- **Umidade.** Foi determinado pelo método descrito pela AOAC (1990), baseado na técnica de secagem em estufa a 100-105°C, até peso constante.
- **Cinza.** Determinada pela metodologia descrita pela AOAC (1990). A metodologia baseia-se na perda da matéria orgânica, quando a amostra é incinerada em mufla em temperaturas de 500-550°C.
- **Lipídios Totais.** Foi determinado segundo metodologia descrita por Bligh & Dyer (1959), empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água na proporção inicial de 1:2:0,8 respectivamente, para extração de todas as classes de lipídios.
- **Lactose.** Foi determinada segundo a metodologia de Acton (1977), a qual corresponde a modificação do método de determinação de carboidratos totais descrito por Dubois *et al.* (1956), utilizando o reagente fenol e ácido sulfúrico.

2.6.2 Determinação de aminoácidos

Para identificação e quantificação dos aminoácidos as amostras foram hidrolisadas com HCl 6N na temperatura de 110°C por 22 horas. Após a incubação, o ácido clorídrico foi evaporado e as amostras recuperadas em tampão citrato pH 2,2. Alíquotas de 25µL foram injetadas no analisador Dionex DX 300, onde a separação dos aminoácidos ocorreu em coluna de troca catiônica e reação pós-coluna com ninidrina (Spackman *et al.*, 1958). Solução padrão de aminoácidos da marca Pierce foi utilizado como referência. O triptofano (destruído na hidrólise ácida) foi quantificado pelo método de Spies (1967).

2.6.2 Escore Químico

O escore químico foi determinado, relacionando a concentração de cada um dos aminoácidos essenciais das frações protéicas em estudo com os aminoácidos do padrão de referência da FAO/WHO (1990), de acordo com metodologia de Henley & Kuster (1994).

$$EQ = \frac{\text{mg de aminoácido / g N da proteína teste}}{\text{mg de aminoácido / g da proteína padrão ou referência}} \times 100$$

2.7 Ensaio biológico

2.7.1 Avaliação Nutricional *in vivo*

O valor nutritivo da proteína, de vários produtos do leite, foi determinado comparativamente à caseína comercial (CC), variando somente a fonte de proteína. Foram utilizadas as seguintes fontes protéicas: concentrado protéico de soro doce (CSD), caseinato de sódio (CasNa) e o coágulo de caseína (Co-Cas).

O ensaio biológico foi realizado no Laboratório de Ensaios Biológicos do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL).

Foram utilizados para experimentação 40 ratos machos da linhagem Wistar livres de patógenos (SPF), recém-desmamados, com 21 dias de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Após a pesagem inicial, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, contendo dieta e água à vontade. Os ratos foram divididos em 5 grupos de 8 animais e foram mantidos nas dietas (*ad libitum*) durante todo o período de experimentação (28 dias). As condições ambientais do biotério foram controladas a fim de manter a temperatura em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com períodos alternados de claro e escuro de 12 horas.

O critério para distribuição dos animais aos grupos foi feito de acordo com o peso. Todos os animais foram pesados antes do início do experimento e uma tabela com ordem crescente de peso foi elaborada. Os grupos mantidos em dietas experimentais foram selecionados tomando-se um animal de menor peso e um animal de maior peso até completar o grupo com 8 animais. A Tabela 1 demonstra a seleção dos animais aos grupos, de acordo com o peso.

Tabela 1. Valores médios de peso inicial (média \pm desvio padrão) dos animais de experimentação.

Animais/ Grupos	Grupos designados para as dietas				
	CSD	Co-Cas	CasNa	CC	Aprotéica
1	44,4	47,29	51,73	53,64	40,18
2	53,97	56,30	57,00	58,46	53,75
3	60,25	61,65	62,40	62,60	58,71
4	64,57	64,65	66,10	66,90	64,45
5	70,24	67,5	67,35	67,22	72,50
6	75,97	75,15	73,92	73,00	76,19
7	78,85	78,80	78,20	77,10	78,90
8	89,70	85,15	82,33	79,22	98,33
Média	67,24	67,06	67,37	67,26	67,88
Desvio	14,53	12,38	10,44	8,93	17,74

CSD = concentrado protéico de soro doce; Co-Cas = coágulo de caseína; CasNa = caseinato de sódio; CC = caseína comercial.

Valores expressos como média de 8 animais por tratamento \pm desvio padrão.

2.7.2 Protocolo Experimental

• Composição e preparo das dietas

Todas as dietas foram preparadas segundo as especificações da AIN-93 G (Reeves *et al.*, 1993) exceto pela concentração de proteína, a qual foi mantida a 10%. As dietas preparadas foram isocalóricas e isoprotéicas. As misturas minerais e vitamínicas (Roche) estão descritas nas Tabelas 3 e 4 respectivamente.

Tabela 2. Composição básica da dieta, segundo AIN-93 G (Reeves *et al.*, 1993) para ratos em crescimento.

Ingredientes	%
Amido de milho	397,48
Fonte de Proteína	200,0
Amido Dextrinizado	132,0
Sacarose	100,0
Óleo de soja	70,0
Fibra	50,0
Mistura mineral	35,0
Mistura vitamínica	10,0
L-cistina	3,0
Bitartarato de colina	2,5
Tert-butil-hidroquinona	0,014

Fonte: Reeves *et al.* (1993)

Para execução dos ensaios, as seguintes dietas foram preparadas utilizando diferentes fontes protéicas: 1. dieta padrão, de caseína comercial (CAS), marca M. CASSAB; 2. dieta contendo proteínas de soro como única fonte protéica (CSD); 3. dieta contendo coágulo de caseína como fonte protéica (Co-Cas); 4. dieta contendo caseinato de sódio (CasNa) produzido em planta piloto e 5. dieta isenta de proteína, aprotéica (AP).

Tabela 3. Mistura mineral AIN-93 G-MX

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

Fonte: Reeves *et al.* (1993)

Tabela 4. Formulação da mistura vitamínica AIN-93 VX

Componentes	G/Kg
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina – HCl	0,700
Tiamina – HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
D-biotina	0,020
Cianocobalamina (B-12)(0,1% em manitol)	2,500
Acetato de all-rac- α -tocoferol (E) (500 UI/g)	15,00
Palmitato de all-trans-retinol (A) (500.000 UI/g)	0,800
Colicalciferol (D ₃) (400.000 UI/g)	0,250
Filoquinona (Vitamina K)	0,075
Sacarose	974,655

Fonte: Reeves *et al.*(1993)

- **Determinação do valor nutritivo da proteína**

O valor nutritivo da proteína foi estimado através dos seguintes índices nutricionais: NPR (quociente de eficiência líquida da proteína), PER (quociente de eficiência protéica) e Dv (digestibilidade verdadeira), segundo metodologia descrita por Sgarbieri (1987).

O NPR (ganho de peso (g) do grupo em dieta experimental + perda de peso do grupo em dieta aprotéica / proteína ingerida (g) pelo grupo em dieta experimental) foi determinado após 21 dias, sendo que 5 dias os animais permaneceram em adaptação. O PER (ganho de peso (g) / proteína ingerida (g)) foi calculado após 28 dias de experimentação. As fezes dos animais foram cuidadosamente coletadas para o cálculo da digestibilidade (nitrogênio absorvido / nitrogênio ingerido), expressa em %.

O nitrogênio excretado pelos animais em dieta aprotéica serviu de correção para o cálculo da Dv, subtraindo-se esse valor do nitrogênio excretado pelos grupos em dietas protéicas.

2.8 Escore químico corrigido pela digestibilidade *in vivo* (PDCAAS)

Este índice foi descrito por Henley & Kuster (1994) e avalia a qualidade da proteína em estudo através do produto entre o escore químico do concentrado protéico de soro (CSD), do coágulo de caseína (Co-Cas), do caseinato de sódio (CasNa) e da caseína comercial (CC) , com a digestibilidade verdadeira (Dv), através da seguinte fórmula:

$$\text{PDCAAS} = \text{EQ} \times \text{Dv} \quad \text{onde,}$$

Dv= Digestibilidade verdadeira

EQ= Escore químico

3. Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância (Gomes, 1982).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química do concentrado protéico de soro doce (CSD), caseinato de sódio (CasNa) e do coágulo de caseína (Co-Cas).

Os resultados da caracterização química do CSD, CasNa e Co-Cas, desidratados por liofilização, spray dryer e secagem em bandejas com circulação de ar quente, respectivamente, estão apresentados na Tabela 5 (em base seca).

O teor de proteína da amostra CSD (83,84%) foi semelhante ao encontrado por Bounous *et al.* (1989), que obtiveram um concentrado protéico de soro de leite com 80% de proteína. Esse resultado indica que o objetivo de reproduzir a obtenção de concentrado protéico com elevado teor de proteína do autor acima citado, foi atingido.

Tabela 5. Composição centesimal aproximada e valor de solubilidade encontrados para: concentrado protéico de soro doce (CSD), coágulo de caseína (Co-Cas) e caseinato de sódio (CasNa), em base seca.

Resultados ¹ (%)	Amostras		
	CSD	Co-Cas	CasNa
Sólidos totais	96,37	92,71	93,85
Proteína (N × 6,38)	83,84	80,78	76,82
Cinza	2,77	5,08	9,01
Lactose	8,88	12,51	19,91
Lipídios	4,48	1,61	1,66
Solubilidade	93,09	35,12	98,20

¹ Média de determinações em triplicata.

Existem alguns pontos a serem melhorados no processamento do CSD, como aumentar a concentração de proteína e reduzir a de lactose através do aumento dos ciclos de diafiltração. O teor de lipídios poderia ser diminuído no soro

por processo de microfiltração, antecedendo a ultrafiltração e a diafiltração, ou por um processo mais completo de desnate.

O teor de cinza também variou bastante entre os produtos. A elevada taxa de material inorgânico presente no CasNa (9,01%) seria devido à adição do hidróxido de sódio à caseína isoelétrica, com o objetivo de elevar o pH para valores próximos de 7,0 e assim torná-la solúvel para secagem em “spray dryer”. A concentração de cinzas no Co-Cas (5,08%) poderia ser explicada pelo método de obtenção do mesmo. A formação do coágulo de caseína, provavelmente permite algum tipo de ligação entre os minerais e o gel formado, aumentando assim a concentração de minerais neste produto. Uma lavagem mais exaustiva do coágulo, previamente à secagem poderia reduzir o teor de minerais. O CSD obteve valores reduzidos de matéria inorgânica (2,77%), possivelmente devido ao tratamento recebido pelo processo de diafiltração, justamente com o objetivo de eliminar água, lactose e minerais.

Morr (1992) observou variabilidade entre concentrados protéicos de soro de leite quanto aos compostos protéicos e não-protéicos, como concentração de lipídios, lactose e minerais em termos de propriedades funcionais. Estudou o efeito destes componentes sobre a funcionalidade do CSD. Demonstrou também, que concentrados protéicos de soro apresentando baixas concentrações de lipídios foram mais efetivos na formação de géis estáveis, com baixa concentração de proteína. A presença de íons resulta em géis mais firmes, porém como já citado a disponibilidade de CSD é grande no mercado e varia muito.

A análise de solubilidade das dispersões protéicas foi monitorada com o objetivo de controlar o grau de desnaturação protéica sofrido durante o processamento e armazenagem do material, se encontra na Tabela 5. Segundo Bounous & Gold (1991), a percentagem de solubilidade das proteínas do soro pode refletir o grau de desnaturação e conseqüentemente influenciar as propriedades nutricionais e fisiológico- funcionais destas proteínas.

Bounous & Gold (1991), demonstraram que a solubilidade das proteínas do soro de leite em tampão citrato-fosfato, pH 4,6, deve ser superior a 95% para que se tenha uma garantia da não desnaturação das principais proteínas do soro. A solubilidade do caseinato de sódio, em água, em pH 7,0 foi bastante elevada, sugerindo que a secagem em “spray dryer” parece não promover desnaturação da caseína, mantendo a solubilidade próxima de 100%. Por outro lado, o coágulo de caseína, obtido pela coagulação enzimática (quimosina) e secado em secador convencional de bandejas, com circulação de ar quente, apresentou solubilidade muito baixa (35%), em pH 7,0, sugerindo que, do ponto de vista funcional e/ou tecnológico, essa fonte protéica teria que ser bastante melhorada.

Bounous & Gold (1991) estudou vários tipos de concentrados protéicos de soro de leite e demonstrou que o material obtido com maior percentagem de solubilidade, apresentou melhores resultados em estudos feitos com animais para avaliar a capacidade destas proteínas em elevar os níveis de glutathione celular e assim a proliferação de linfócitos e conseqüente aumento da resposta imune. A perda de solubilidade das proteínas pode estar diretamente associada ao grau de desnaturação, que por sua vez pode estar relacionado com o tratamento térmico utilizado durante pasteurização e processamento, bem como com a desidratação e o armazenamento do material. Para se manter a integridade estrutural e funcional das proteínas do soro, é necessário uma monitoração rigorosa do processamento em geral.

4.2 Composição em aminoácidos

Na Tabela 6 encontram-se os valores de composição aminoacídica do concentrado protéico de soro doce (CSD), caseinato de sódio (CasNa), coágulo de caseína (Co-Cas) e caseína comercial (CC). O CSD é excelente fonte de aminoácidos essenciais, entre eles, a histidina (requerida por crianças de 2 a 5 anos de idade), a leucina, a lisina e os sulfurados como a metionina e cisteína. Na

amostra CSD a concentração de todos os aminoácidos essenciais foi superior às quantidades recomendadas pela FAO/WHO (1990), como mostra a Tabela 7.

O caseinato de sódio e o coágulo de caseína apresentaram deficiência no teor de triptofano. Este aminoácido encontra-se em quantidade inferior nestas amostras quando comparados com o padrão de referência sugerido pela FAO/WHO (1990).

4.3 Escore Químico e PDCAAS

Dentre as amostras analisadas, o menor escore químico encontrado foi 0,79 para o triptofano, presente no Co-Cas, e o maior foi de 1,02 em relação ao CSD . Na Tabela 8 estão apresentados o escore químico do aminoácido limitante primário (EALP) e o escore químico corrigido pela digestibilidade *in vivo* (PDCAAS) de todas as amostras estudadas (CSD, CasNa, Co-Cas e CC).

Tabela 6. Perfil de aminoácidos dos produtos: concentrado protéico de soro doce (CSD), caseinato de sódio (CasNa), coágulo de caseína (Co-Cas) e caseína comercial (CC).

Aminoácidos (g/100g Prot.)	CSD	CasNa	Co-Cas	CC ¹
Ác. Aspártico	9,55	6,32	7,42	7,17
Treonina	6,40	3,61	3,75	4,15
Serina	5,14	5,17	6,11	5,93
Ác. Glutâmico	16,56	19,72	23,87	21,87
Prolina	5,55	9,07	10,87	9,97
Glicina	1,66	1,52	1,88	1,80
Alanina	4,42	2,56	2,99	3,03
Valina	5,04	5,33	6,31	6,16
Metionina +	5,44	3,94	3,71	2,17
Cistina				
Isoleucina	5,29	4,00	4,61	4,62
Leucina	9,81	7,97	9,80	8,87
Fenilalanina +	7,24	11,51	11,38	6,3
Tirosina				
Lisina	9,27	5,08	6,88	7,67
Histidina	5,15	5,95	6,37	2,84
Arginina	1,45	1,96	2,47	1,96
Triptofano	1,12	0,92	0,87	1,40

¹ Valores da Literatura

Tabela 7. Valores obtidos para os aminoácidos essenciais dos produtos: concentrado protéico de soro doce (CSD), caseinato de sódio (CasNa), coágulo de caseína (Co-Cas) e caseína comercial (CC), tendo por base o padrão de referência da FAO/WHO ¹.

Aminoácidos essenciais (g/100g prot.)	Padrão FAO/WHO	CSD	CasNa	Co-Cas	CC
Treonina	3,4	7,63	4,69	3,75	4,15
Metionina + Cistina	2,5	5,44	3,94	3,71	2,17
Valina	3,5	5,04	6,94	6,31	6,16
Leucina	6,6	11,70	10,37	9,80	8,87
Isoleucina	2,8	6,30	5,20	4,61	4,62
Fenilalanina + Tirosina	6,3	7,24	11,51	11,38	9,92
Lisina	5,8	11,05	6,61	6,88	7,67
Histidina	1,9	5,15	5,95	6,37	2,84
Triptofano	1,1	1,12	0,92	0,87	1,40
Escore Químico	-	1,02 (Trp)	0,84 (Trp)	0,79 (Trp)	0,87 (Met+Cys)
PDCAAS		1,0	0,8	0,7	0,8

¹ FAO/WHO (1990).

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

A análise de aminoácidos realizada nas diversas fontes de proteína utilizadas neste estudo, demonstrou quantidades de aminoácidos essenciais superiores às recomendadas pela FAO/WHO para quase todos os aminoácidos essenciais, exceto pelo triptofano no CasNa e no Co-Cas e pelos aminoácidos sulfurados na CC. Em especial, o CSD apresentou quantidades elevadas, maiores que as recomendadas pela FAO/WHO para idade de 2 a 5 anos, para todos os aminoácidos essenciais. O CSD também apresentou quantidades superiores à caseína comercial para os aminoácidos treonina, leucina, metionina+cisteína, isoleucina, lisina, histidina e triptofano.

A presença de baixos teores de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina e a tirosina nas proteínas do soro do leite, podem favorecer o seu consumo por crianças com fenilcetonúria (Hambraeus, 1982).

Outras características de composição de aminoácidos da proteína de soro de leite, como a relação cisteína/metionina aproximadamente igual a 1, são altamente desejadas para elaboração de fórmulas infantis.

Muita atenção tem sido dada para o aspecto nutricional relacionado aos aminoácidos essenciais em formulações para crianças que apresentem alergias para proteínas intactas e dietas para pacientes com funções gastrointestinais comprometidas. A composição de aminoácidos das fórmulas infantis parece ser um fator crítico para a nutrição de bebês recém-nascidos quando são utilizadas proteínas intactas ou hidrolisado protéico. A baixa concentração de triptofano e cisteína parece ser o maior problema para a produção de fórmulas infantis, uma vez que suas deficiências são notadas no metabolismo geral fisiológico da indução do sono e na produção da glutathione, respectivamente. (de Wit, 1998). Apenas a α -La bovina apresenta quantidades ideais e superiores ao leite humano de cisteína e triptofano e são recomendadas para suplementação de fórmulas infantis (Heine *et al.*, 1991).

As concentrações de alguns aminoácidos essenciais, como a lisina e treonina, são significativamente maiores em fórmulas infantis do que no leite humano. O aumento do conteúdo de treonina em formulações, pode dobrar a concentração plasmática de treonina, quando comparado com o leite humano (de Wit, 1998).

No plasma dos bebês alimentados com fórmula baseada em soro de leite bovino foram identificadas altas concentrações de treonina, lisina, metionina e isoleucina. No entanto, deve-se ter cuidado para manipulação de fórmulas infantis, quanto à composição de aminoácidos, uma vez que, pré-termos e neonatos podem ter capacidade limitada para metabolizar certos aminoácidos e isto pode promover alterações nos aminoácidos plasmáticos em bebês que recebem fórmulas substituindo o leite humano (Heine *et al.*, 1991).

Heine *et al.* (1991), estudaram substituição de leite materno por fórmulas infantis à base de leite bovino e demonstraram o cuidado que se deve ter com este tipo de formulação. Apesar da concentração protéica do leite humano ser inferior à concentração protéica do leite bovino, no leite humano, encontram-se os tipos e quantidades adequadas de aminoácidos. Há uma preocupação com o crescimento do neonato e esquece-se um pouco da importância da maturação dos órgãos que somente o leite materno contendo seus fatores tróficos, promove de forma ideal.

A FAO/WHO (1990) considera o escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) um índice mais apropriado para avaliar a qualidade protéica em alimentos e fórmulas infantis. Esse índice utiliza os requerimentos dos aminoácidos essenciais para humanos, sendo mais apropriado quando comparado com ensaios em animais utilizados para avaliar a qualidade da proteína em alimentos. A FAO/WHO considerou três parâmetros críticos para avaliação da qualidade protéica: 1 – o perfil de aminoácidos essenciais presente no alimento protéico; 2 – sua digestibilidade e 3 – a capacidade desses

aminoácidos em suprir os requerimentos humanos, sendo que essas variáveis devem ser consideradas de acordo com a idade.

O PDCAAS indica a proporção em que determinada fonte protéica é utilizada pelo organismo em relação ao padrão. Quando se calcula o PDCAAS, os valores ideais são próximos de 1. Não há vantagens em se ter valores superiores a 1 para o PDCAAS.

Estudos realizados pela FDA (Food and Drug Administration) demonstraram que o PDCAAS vem substituindo o PER com vantagens. O quociente de eficiência protéica (PER) vem sendo o método de escolha para determinar a capacidade da proteína em promover crescimento em ratos recém-desmamados. Porém foi demonstrado que este índice superestima valores de algumas proteínas de origem animal e subestima outras de origem vegetal.

O PDCAAS de um alimento protéico é determinado pela comparação do perfil de aminoácidos essenciais de um alimento protéico, corrigido pela sua digestibilidade, em comparação com os requerimentos exigidos pela FAO/WHO para crianças de 2 a 5 anos de idade (Henley & Kuster, 1994).

4.4 Avaliação microbiológica

Durante o processamento foram recolhidas amostras dos materiais em diversas fases, desde a chegada do leite até o concentrado protéico final, para controle microbiológico.

As análises microbiológicas dos diversos materiais obtidos, foram comparadas com o edital do Ministério da Agricultura e Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, portaria nº 8, 26 de junho de 1984, para o leite em pó.

As contagens dos vários tipos de microorganismos, revelaram valores abaixo do máximo permitido por esses órgãos oficiais.

4.5 Resultados obtidos no ensaio biológico com ratos

A Tabela 8 mostra os dados de ingestão de dieta (DI) e proteína (PI), ganho de peso (GP) e o cálculo do quociente de eficiência protéica (PER), para grupos de 8 ratos, mantidos em dietas contendo concentrado protéico de soro doce (CSD), caseinato de sódio (CasNa), coágulo de caseína (Co-Cas) e caseína comercial (CC), como única fonte de proteína, na concentração de 10% p/p da dieta.

Tabela 8. Valores obtidos (média \pm desvio padrão) para dieta ingerida (DI), proteína ingerida (PI), ganho de peso (GP) e quociente de eficiência protéica (PER) para ratos Wistar recém-desmamados mantidos em experimento por 28 dias.

Tratamentos	Índices determinados			
	DI	PI	GP	PER
CSD	209,85 \pm 32,61 ^a	35,73 \pm 6,36 ^a	77,45 \pm 15,03 ^a	3,44 \pm 0,31 ^{ab}
CasNa	208,36 \pm 28,93 ^a	35,34 \pm 4,37 ^a	81,57 \pm 11,89 ^a	3,15 \pm 0,38 ^b
Co-Cas	236,53 \pm 26,10 ^a	40,83 \pm 4,03 ^a	79,98 \pm 11,65 ^a	3,65 \pm 0,40 ^a
CC	233,42 \pm 21,76 ^a	39,98 \pm 4,65 ^a	85,64 \pm 7,48 ^a	3,42 \pm 0,25 ^{ab}

Valores expressos como média de 8 animais por tratamento \pm desvio padrão.

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

Os resultados obtidos neste estudo mostraram não haver diferença significativa ($p > 0,05$) na ingestão de dieta, ingestão de proteína e ganho de peso corporal entre os grupos de animais, mantidos em diferentes fontes de proteína. Quanto aos valores de PER, as dietas contendo o concentrado protéico de soro doce, caseinato de sódio e caseína comercial, não diferiram, enquanto aquela cuja

fonte protéica era o coágulo de caseína apresentou valor estatisticamente superior ($p < 0,05$) ao da dieta contendo caseinato de sódio.

Renner (1988) realizou ensaio biológico de avaliação nutricional e obteve valores de PER de 3,6, 2,9 e 2,1 para concentrado protéico de soro de leite bovino, caseína e proteína de soja, respectivamente. Friedman (1996), considera de alto valor nutritivo, proteínas com valor de PER acima de 2,0.

Existem alguns fatores que podem influenciar os valores de PER, dentre eles, a concentração lipídica da dieta e a concentração protéica. Elevadas concentrações de proteínas acrescentadas na dieta, como 12 a 15% elevam os gastos energéticos, diminuindo a eficiência da proteína para a síntese de novas proteínas corpóreas. Segundo Sgarbieri (1996), a concentração de proteína ideal para análise do índice PER está no intervalo de 9 a 10%, para proteína de alto valor nutritivo, onde esta proteína será mais utilizada por estar limitante e assim deve ser preferencialmente utilizada para síntese de proteínas corporais.

A Figura 1 mostra a evolução ponderal dos ratos. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

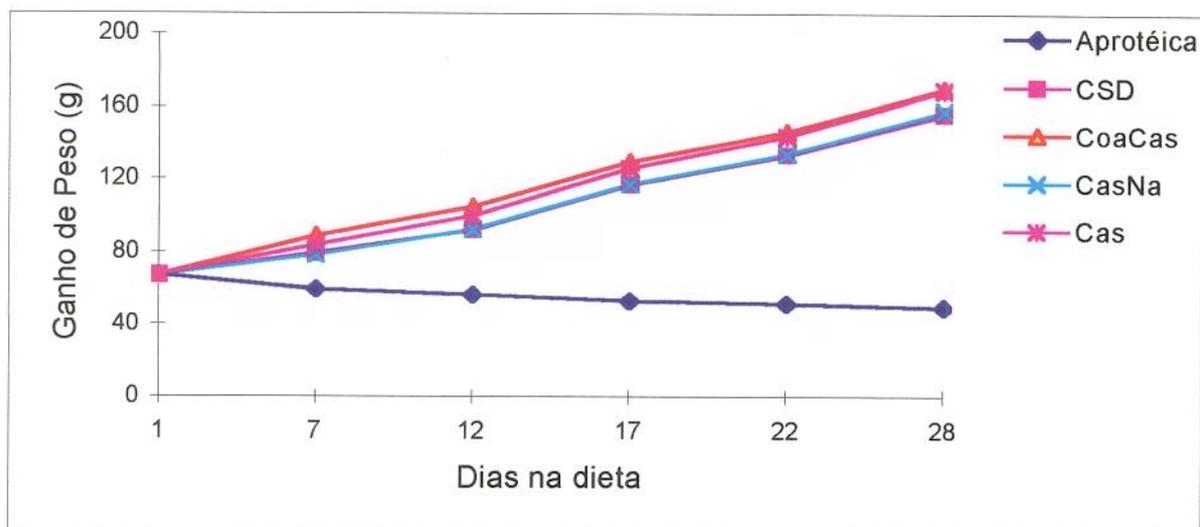


Figura 3. Evolução Ponderal de ratos Wistar alimentados com dietas de concentrado protéico de soro doce (CSD), coágulo de caseína (Co-Cas), caseinato de sódio (CasNa) e caseína comercial (CC).

Embora a composição em aminoácidos e a solubilidade tenham sido diferentes para os concentrados protéicos que compunham as dietas, seus efeitos em promover crescimento foram estatisticamente iguais.

Na Tabela 9 estão representados os valores obtidos para digestibilidade verdadeira (Dv) e NPR. A digestibilidade verdadeira do coágulo de caseína foi significativamente menor em relação às outras fontes protéicas. Essa baixa digestibilidade encontrada para o coágulo pode estar associado ao processo de preparação por desidratação. Apesar de apresentar escore químico menor que um apenas para o aminoácido triptofano, a concentração de aminoácidos essenciais se apresentou menor em relação às outras fontes de proteínas. Pode ainda estar relacionado com a desnaturação protéica.

Estudos realizados por Boirie *et al.* (1997), demonstraram que tanto o concentrado protéico de soro quanto a caseína possuem alta digestibilidade e adequado escore químico, porém as proteínas de soro são absorvidas mais rapidamente, exercendo um estímulo à síntese de proteínas nos tecidos.

O índice determinado NPR não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) entre os tratamentos. Apesar disso, resultado obtido para o concentrado protéico de soro doce foi maior em relação aos outros tratamentos e em relação à caseína.

Tabela 9. Valores obtidos para NPR (quociente de eficiência líquida da proteína) e Dv (digestibilidade verdadeira) encontrados para ratos Wistar recém-desmamados, pelos diferentes tratamentos.

Tratamento	NPR	Dv
CSD	$3,82 \pm 0,15^a$	$94,92 \pm 1,25^a$
CasNa	$3,78 \pm 0,34^a$	$94,81 \pm 1,37^a$
Co-Cas	$3,62 \pm 0,12^a$	$91,70 \pm 1,44^b$
CC	$3,78 \pm 0,15^a$	$93,57 \pm 0,97^a$

Valores expressos como média de 8 animais por tratamento \pm desvio padrão

^{a,b} Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5. Conclusões

Os dados referentes a este capítulo permitem concluir:

- a) o perfil aminoacídico do concentrado protéico de soro doce (CSD) é superior ao do caseinato de sódio (CasNa), coágulo de caseína (Co-Cas) e caseína comercial (CC), sendo o CSD a única fonte protéica que atendeu integralmente a recomendação da FAO/WHO para crianças de 1 a 5 anos (EQ= 1,02);
- b) o coágulo de caseína apresentou digestibilidade verdadeira significativamente inferior ($p < 0,05$) às demais fontes protéicas, que não diferiram entre si;
- c) o PDCAAS (EQ \times Dv) foi significativamente superior (96,8%) para o CSD que para as demais fontes protéicas estudadas;
- d) não houve diferença significativa no ganho de peso, no PER e no NPR, para as quatro fontes protéicas estudadas.

6. Referências Bibliográficas

- ACTON, G.H. The determination of lactose in cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 32, n. 3, p. 111-114, 1977.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - **Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists**, 15 th Ed., 1990, Washington. D.C., 1141 p.
- BLIGH, E.C.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M..P.; MAUBOIS, J.L.; BEAUFRÈRE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy Science**, Washington, v. 94, p. 14930-14935, 1997.
- BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Berlin, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.
- BOUNOUS, G.; GERVAIS, F.; AMER, V.; BATIST,G.; GOLD, P. The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and the diseases of aging. **Clinical and Investigative Medicine**, Berlin, v.12, n. 6, p. 343-349, 1989.
- de Wit, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 3, p.597-608, 1998.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBBERS, J.K. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). **Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation**. Bethesda, 1990.

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

GOMES, F.P. **Curso de Estatística Experimental**. 10. ed. São Paulo: Nobel, 1982. 430 p.

GUZMÁN, G.J. Whey protein concentrate (80%) its importance in human nutrition. **Anais do Simpósio Latinoamericano de Ciência de Alimentos**, FEA/UNICAMP, Campinas, Brazil, novembro 13 - 16, 1995, p.1-6.

HAMBRAEUS, L. Nutritional aspects of milk proteins: In: FOX, P.F. (Ed.) **Development of Dairy Chemistry**. London: Applied Sciences, 1982. p. 289-313.

HARPER, W.J.; MANGINO, M.E. Workshop: First whey protein, UNICAMP, p.1-22, 1997.

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

HEINE, W.E.; KLEIN, P.D.; REEDS, P.J. The importance of α -lactalbumin in infant nutrition. Critical Review, **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.121, n.3, p. 277-283, 1991.

-
- HORTON, B.S. Whey processing and utilization. **Bulletin of International Dairy Federation**, Cambridge, n. 308, p. 1-6 1996.
- HUFFMAN, L.M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 49-52, 1996.
- MORR, C.V. Improving the texture and functionality of whey protein concentrate. **Food Techonology**, Chicago, v. 46, n. 4, p. 108-110, 1992.
- MORR, C.V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.M.; VAN BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p.1715-1718, 1985.
- MORR, C.V.; HA, E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Columbus, v.33, n. 6, p. 431-473, 1993.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. (A Committee Report). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on reformulation of the AIN-76 rodent diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n. 2, p. 467-472, 1993.
- RENNER, E. Effect of agricultural practices on milk and dairy products. In: **Nutritional Evaluation of Food Processing**. 3rd Edition, Eds.: Karmas & Harris, Van Nostrand Reinhold, NY, 1988, p.203-224.
- SGARBIERI, V.C. **Alimentação e Nutrição**. Fator de saúde e desenvolvimento. Almed, São Paulo, 1987. 387p.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo Ed. Varela, 1997.

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

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

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

CAPÍTULO 3

“ESTUDO COMPARATIVO DA DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE AMINOÁCIDOS DO CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE BOVINO E DO CASEINATO DE SÓDIO.”

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi o estudo comparativo da digestão e absorção dos aminoácidos das proteínas do concentrado protéico de soro doce (CSD) e do caseinato de sódio (CasNa), produzidos experimentalmente no ITAL, Campinas S.P. Foram utilizados 32 ratos machos adultos da linhagem Wistar (pesando aproximadamente 300,0 gramas), divididos em 4 grupos de 16 animais por tratamento, mantidos até então em dieta comercial. Os ratos foram submetidos ao jejum por 24 horas e em seguida intubados diretamente no estômago, com proteína de soro de leite ou caseinato de sódio. Nos tempos 10, 20, 40 e 60 minutos, após intubação, 4 animais de cada tratamento foram submetidos à retirada de sangue da veia porta e à remoção do intestino delgado. No soro sanguíneo (veia porta) foram determinadas proteínas totais e aminoácidos. No conteúdo do intestino delgado determinou-se proteínas totais. Após 10 minutos de gavagem, e tratamento com o CSD apresentou maior concentração sérica ($p < 0,05$) dos aminoácidos prolina, alanina, cistina, metionina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina e lisina, além de maior concentração de proteínas séricas comparado com o CasNa. Após 20 minutos (T20), apenas a cistina permanecia elevada no soro dos animais intubados com CSD. Alanina, valina e arginina apareceram em concentração mais alta ($p < 0,05$) para o tratamento de CasNa. Neste mesmo tempo (T20) aparecia um pico de concentração de proteína sérica no tratamento com CSD. Apenas valina e fenilalanina (T40), cistina e metionina (T60) mostraram-se mais elevadas ($p < 0,05$) após estes intervalos da intubação. Não houve diferença estatística entre os tratamentos para proteínas totais no conteúdo intestinal dos vários tempos após a intubação. Os resultados deste experimento sugerem que a digestão protéica e a absorção dos

aminoácidos do CSD ocorreu a uma maior velocidade e que a utilização desses aminoácidos para a síntese protéica também foi muito rápida, permitindo o aparecimento de um pico de proteína no soro sanguíneo aos vinte minutos após a intubação gástrica.

1. INTRODUÇÃO

O efeito do metabolismo protéico pós-prandial corporal, foi estudado por Boirie *et al.* (1997), para dois tipos de proteínas do leite bovino, as caseínas e as proteínas do soro. Usando técnica de gavagem estomacal em humanos, os autores observaram que a elevação do perfil plasmático de aminoácidos da caseína foi mais lento e mais reduzido comparado ao do soro, quando as respectivas proteínas foram administradas em humanos adultos. Houve também uma inibição no catabolismo protéico dos indivíduos que receberam a caseína, enquanto que os que receberam proteína de soro não tiveram alteração de catabolismo protéico. Boirie *et al.*(1997) classificaram as proteínas de leite em “fast” e “slow”, de acordo com o tempo que demoram para serem digeridas, absorvidas e metabolizadas.

A alteração na concentração sérica de aminoácidos depende principalmente da ingesta e da composição de aminoácidos da proteína ingerida. Como os animais foram alimentados com quantidade equivalente dos dois tipos de proteína, os perfis séricos estão relacionados às composições diferentes de aminoácidos das respectivas fontes protéicas (Baró *et al.*, 1995). Neste estudo, foram encontradas diferenças significantes nas concentrações séricas de ratos adultos alimentados com proteína de soro de leite e caseína, independente de sua forma molecular (intacta ou hidrolisada). Os animais que receberam a proteína de soro de leite apresentaram, de um modo geral, maior concentração de aminoácidos séricos quando comparados aos que receberam caseína.

As proteínas do soro de leite e as caseínas, diferem em composição de aminoácidos e em propriedades estruturais e fisico-químicas, principalmente nos aminoácidos de cadeias ramificadas e os sulfurados. O metabolismo das proteínas é um processo finamente controlado, no qual o ganho ou perda de proteína corporal é ajustado de acordo com as necessidades biológicas. A limitação de um aminoácido pode interferir no metabolismo protéico no momento da síntese de

uma proteína. O soro por apresentar elevada concentração de aminoácidos de cadeias ramificadas, exerce efeito sinérgico com a insulina no metabolismo protéico. Desse modo, o efeito catabólico do glicagênio é menor após a ingestão de dieta contendo proteínas de soro (Baró *et al.*, 1995).

A demora da elevação do nível aminoacídico no sangue em dieta de caseína é atribuído ao atraso no esvaziamento gástrico, pois a caseína coagula no estômago (pH ácido), enquanto que o soro possui um esvaziamento gástrico rápido, passando para o duodeno (Boirie *et al.*, 1997).

Os peptídios com atividade opióide que se formam na digestão das caseínas podem ser em parte, responsáveis pela lenta motilidade gástrica. São geralmente derivados da β -caseína e em alguns estudos com porcos, foi possível demonstrar uma redução da contratilidade muscular do íleo. Os peptídios opióides das β -caseínas ocorrem na seqüência de aminoácidos nas posições 60 a 66. Devido ao alto conteúdo de prolina, esses peptídios são aparentemente resistentes à proteólise. Algumas evidências sugerem que estes peptídios sejam liberados no trato gastrointestinal de humanos e porcos durante a digestão da caseína do leite bovino (Daniel *et al.*, 1990). As diferenças na secreção de insulina e glicagênio podem ser estimuladas pela composição de aminoácidos. Ao contrário, a secreção de glicagênio é estimulada em menor intensidade pelos aminoácidos do soro quando comparados com os da caseína. Desse modo, o efeito catabólico do glicagênio é menor após a ingestão de dieta de soro (Boirie *et al.*, 1997).

Diferenças de esvaziamento gástrico entre caseína e soro podem ocorrer também devido a presença de peptídios opióides liberados durante a digestão da caseína. Eles diminuem a motilidade intestinal, retardando o esvaziamento gástrico por interação direta com receptores de opióides no intestino delgado (Meisel, 1998).

A digestão de uma dieta de proteína é iniciada no estômago, com a ação da protease pepsina, a qual é secretada como pepsinogênio, uma pró-enzima inativa. A ativação ocorre automaticamente quando pequenos fragmentos de peptídios são liberados do precursor inativo. A contribuição da fase gástrica para a digestão protéica é desnaturar e fragmentar parcialmente a proteína da dieta em polipeptídios que passam para o intestino delgado onde se completa a digestão protéica. No intestino delgado, as proteínas ou polipeptídios são hidrolisados à pequenos peptídios e aminoácidos livres. As proteases pancreáticas também são secretadas pelo pâncreas na forma de pró-enzimas, as quais vão sendo ativadas de acordo com a liberação de produtos digeridos (Steele & Harper, 1990). A proteína da dieta pode ser hidrolisada à aminoácidos livres em três fases da digestão: no lúmen intestinal, na borda dentada do enterócito e no citoplasma do enterócito (Siemensma *et al.*, 1993). O grau de hidrólise de ligações peptídicas individuais depende de algumas variáveis, como: a natureza do aminoácido, o grau de desnaturação da proteína que está sofrendo a digestão, o acúmulo de aminoácidos e peptídios e o grau em que suas ligações são expostas às ações das proteases (Siemensma *et al.*, 1993).

Os di e tripeptídios são transportados intactos através da borda em escova dos enterócitos por carreadores e por processo distinto de qualquer outro transporte de aminoácidos. O principal destino dos produtos da digestão protéica é a liberação de aminoácidos dentro da veia porta para subsequente utilização por outros tecidos (Steele & Harper, 1990). A absorção de di e tripeptídios é mais rápida do que a absorção de quantidade equivalente de aminoácidos livres. Isto porque peptídios de cadeia curta são transportados dentro das células intestinais por mecanismos carreadores específicos (Siemensma *et al.*, 1993).

Cabe salientar que as condições de processamento para obtenção do concentrado de soro de leite foram cuidadosamente monitoradas, para evitar que ocorresse a desnaturação das proteínas.

No presente trabalho objetivou-se comparar a velocidade de absorção de aminoácidos das proteínas de um concentrado protéico de soro doce (CSD) e de um caseinato de sódio (CasNa) obtidos a partir de leite bovino desnatado e pasteurizado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria - prima

Leite bovino tipo B desnatado e pasteurizado (72°C, 15s) foi fornecido pela Cooperativa dos Produtores de Leite de Campinas, Jaguariúna – S.P. O leite foi transportado até o Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas – S.P. e em seguida processado em planta piloto do Centro de Tecnologia de Laticínios (TECNOLAT).

2.2 Obtenção dos concentrados protéicos de soro e caseínas.

O procedimento para obtenção dos concentrados protéicos de soro e das caseínas foram apresentados nos fluxogramas 1 e 2 (Capítulo 1), e se assemelha ao proposto por Bounous & Gold (1991). Procurou-se preservar as propriedades biológicas e nutricionais destas proteínas, através da minimização do tratamento térmico, durante o processamento da matéria-prima.

2.3 Metodologia

2.3.1 Estudo comparativo da digestão e absorção do concentrado protéico de soro doce (CSD) e do caseinato de sódio (CasNa), em experimentos com ratos.

- **Protocolo experimental**

Os animais utilizados foram ratos machos da linhagem Wistar, livres de patógenos (SPF) com aproximadamente 35 dias de idade fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

No laboratório os animais foram colocados em gaiolas, dois a dois e mantidos em dieta comercial e água à vontade por 60 dias até atingirem peso ideal (cerca de 400g) para retirada de aproximadamente 5 mL de sangue da veia porta. As condições ambientais do biotério foram controladas para manter a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com períodos alternados claro / escuro de 12 horas.

Para realização do experimento, os animais foram submetidos ao jejum durante 24 horas e separados em grupos de 16 ratos por tratamento. Os 16 animais de cada tratamento foram subdivididos em grupos de 4, submetidos à intubação gástrica com solução de caseinato de sódio ou de concentrado protéico de soro doce e sacrificados após vários tempos da intubação. Sangue foi retirado da veia porta após anestesia profunda com éter etílico, decorridos tempos:

T 10 = sangue retirado 10 minutos após a intubação;

T 20 = sangue retirado 20 minutos após a intubação;

T 40 = sangue retirado 40 minutos após a intubação;

T 60 = sangue retirado 60 minutos após a intubação.

O fluxograma da Figura 1 ilustra o protocolo experimental utilizado.

Estudou-se comparativamente a velocidade da digestão e absorção de aminoácidos do concentrado protéico de soro doce (CSD) e do caseinato de sódio (CasNa), através da determinação de aminoácidos séricos no sangue obtido da veia porta.

As proteínas foram previamente pesadas (0,042g) e suspensas em 2 mL de água destilada, e então transferidas para uma seringa ajustada em uma cânula e então administrada diretamente no estômago do animal.

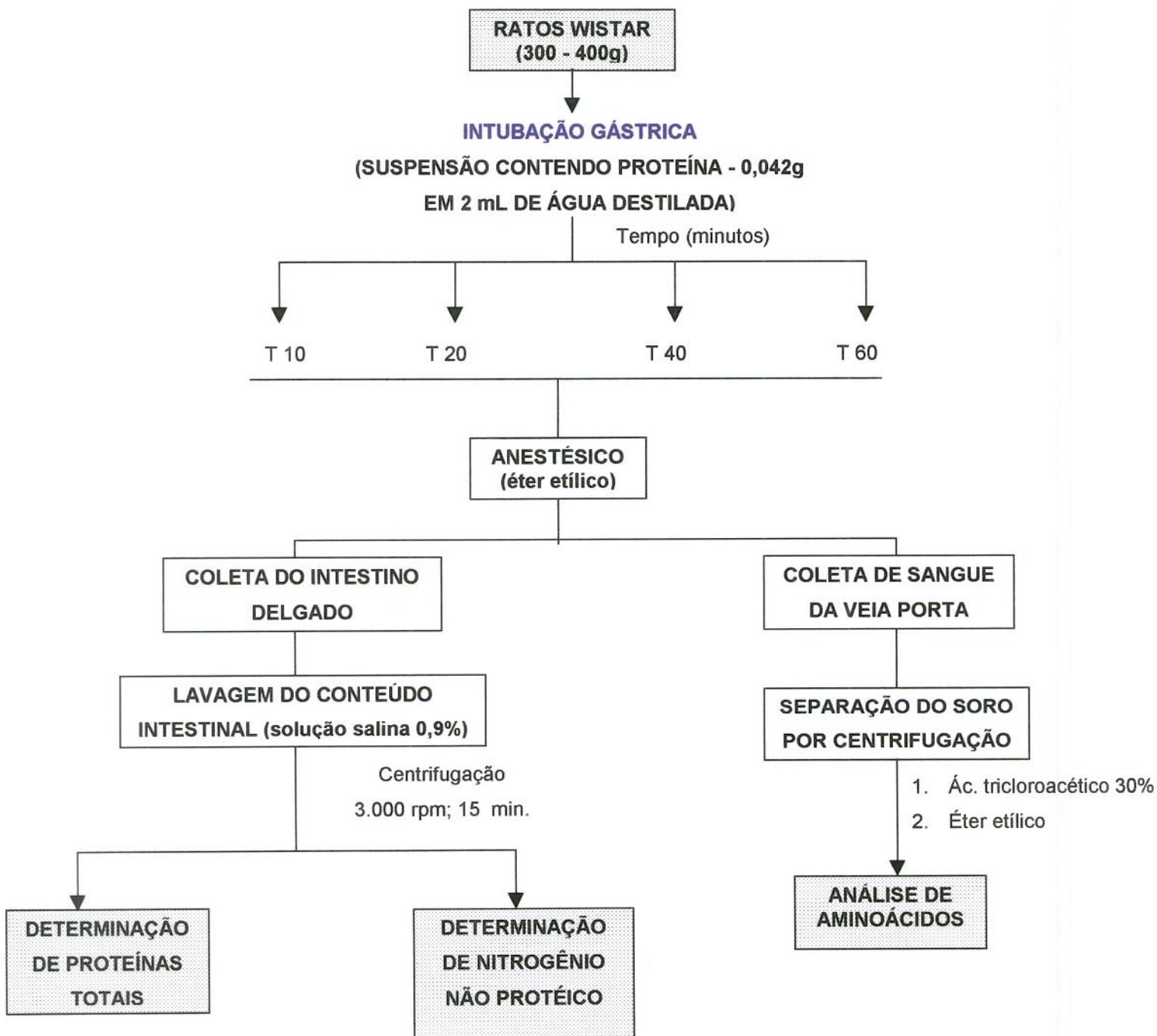


Figura 1. Procedimento experimental para intubação gástrica da suspensão de proteína, coleta de sangue (veia porta) e preparo do soro para determinação de aminoácidos, e coleta de material do intestino delgado.

2.3.2 Avaliação da absorção de aminoácidos pela determinação no soro sanguíneo (veia porta) de animais previamente intubados.

- **Dosagem de proteína no soro sanguíneo**

As proteínas do soro sanguíneo foram analisadas e quantificadas segundo metodologia descrita por Bradford (1976). O método permite quantificar a proteína através da intensidade do cromóforo formado pela ligação da proteína ao comassie brilliant blue, através da comparação com curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). É um método sensível e indicado para amostras de pouco volume e quantidades reduzidas de proteína.

- **Determinação de aminoácidos livres no soro sanguíneo**

Para análise de aminoácidos livres, uma alíquota equivalente a 2 volumes da amostra foi misturada com 1 volume de solução de ácido tricloroacético (TCA) 30%, seguida de centrifugação, para retirada do sobrenadante. O sobrenadante foi lavado com éter etílico para remoção do excesso de TCA e filtrado em membrana de 0,45 μ m de porosidade (grau HPLC). Alíquotas de 25 μ l do filtrado foram injetadas no analisador Dionex DX 300 para separação dos aminoácidos em coluna de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina (Spackman *et al.*, 1958). Como referência para quantificação usou-se solução padrão de aminoácidos da marca Pierce.

- **Preparação da amostra para determinação de proteínas totais no conteúdo intestinal de animais previamente intubados**

Foi retirado o intestino delgado dos animais para determinação de proteínas totais no conteúdo intestinal. Os animais, depois de sacrificados, tiveram dois pontos do sistema digestivo amarrados com linha, o final do estômago e o início do intestino grosso, para impedir a saída do conteúdo intestinal. O intestino foi lavado com 3 mL de solução salina 0,9% (solução fisiológica), e o material

removido foi acondicionado em placa de Petri. Em seguida o conteúdo intestinal foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos (centrífuga REVAN – ciclo CI/ Rotor 3.200 rpm máx.) ; o sobrenadante foi mantido e o precipitado descartado.

- **Determinação de proteínas totais**

Foram realizadas determinações de proteínas totais nos sobrenadantes obtidos após centrifugação do conteúdo intestinal dos ratos, utilizando o método descrito por Bradford (1976).

3. Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância (Gomes, 1982).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2 está representada a concentração de proteínas séricas presentes no soro do sangue dos animais que receberam concentrado protéico de soro de leite (CSD) ou caseinato de sódio (CasNa), via intubação gástrica, nos diferentes tempos.

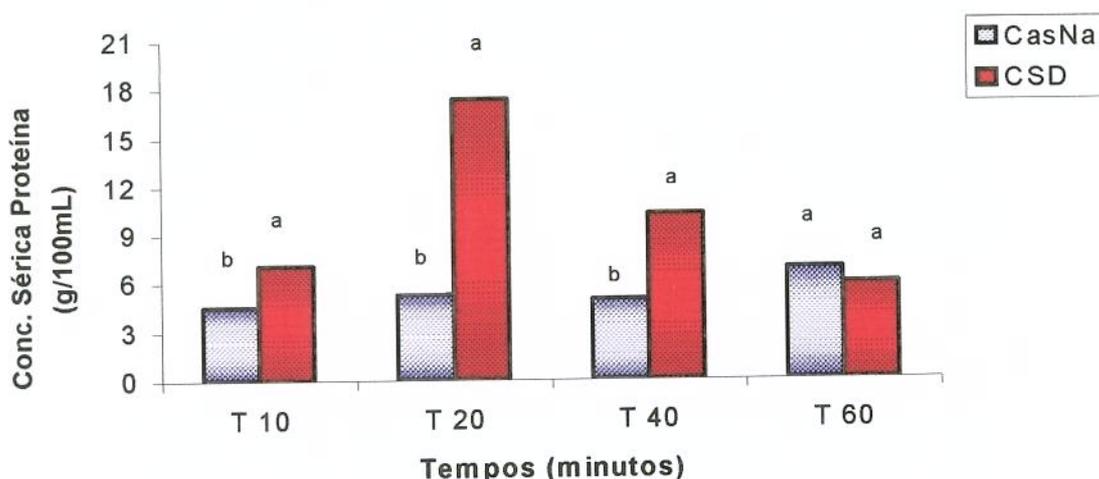


Figura 2. Concentração de proteína no soro sanguíneo para duas fontes protéicas, em função do tempo após intubação: concentrado protéico de soro doce (CSD) ou caseinato de sódio (CasNa).

Letras diferentes sobre as colunas (a, b), indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre tratamentos.

No T10, os animais que receberam a proteína de soro apresentaram maior concentração de proteínas séricas (7,10 g/100mL) a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, em relação aos animais que receberam o caseinato de sódio (4,54 g/100mL). Aos 20 minutos de intubação a diferença tornou-se ainda mais significativa entre o CSD (17,43 g/100mL) e o CasNa (5,31 g/100mL). No T40 essa diferença ainda prevaleceu significativamente maior para o CSD (10,31 g/100mL) que para o CasNa (5,02 g/100mL). No T60 não houve diferença

estatística entre os tratamentos à nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Através da Figura 2 pode-se observar que a caseína é muito menos eficiente em elevar a concentração de proteína do sangue do que o CSD. Esse fato pode ser atribuído ao atraso no esvaziamento gástrico, pois a caseína sofre coagulação no estômago devido ao pH ácido (pH= 1,5 a 2,0). O soro possui um esvaziamento gástrico rápido, passando para o duodeno, devido a sua maior solubilidade nesta faixa de pH. Pode-se deduzir que a maior concentração protéica no soro dos animais que receberam o concentrado protéico de soro de leite deva refletir uma maior velocidade de absorção de aminoácidos e uma maior capacidade de estimular a síntese protéica, no tratamento com CSD. Por outro lado, observa-se uma diminuição rápida das proteínas do soro no tratamento com CSD que se iguala ao tratamento com caseinato após 60 minutos (T60).

Os ratos intubados que receberam proteína de soro de leite bovino, mostraram concentrações maiores de aminoácidos livres no soro sanguíneo, tanto essenciais quanto não essenciais, quando comparados com os que receberam caseinato de sódio.

Nas Tabelas 1 e 2 estão ilustrados valores encontrados para os diferentes aminoácidos séricos de animais previamente intubados com quantidade idêntica das duas fontes protéicas estudadas, concentrado protéico de soro doce (CSD) e caseinato de sódio (CasNa).

O efeito das duas fontes protéicas sobre o perfil de aminoácidos no soro sanguíneo de ratos (retirado da veia porta), mostrou diferenças significativas entre os grupos de animais previamente intubados com proteína de soro de leite e com caseinato de sódio.

Alterações na concentração de aminoácidos do soro foram significativamente maior ($p < 0,05$), logo após intubação (T10) de animais que receberam concentrado protéico de soro, principalmente para aminoácidos de cadeia ramificada como a valina, leucina e isoleucina, os aromáticos, como a tirosina e fenilalanina, e os sulfurados como a metionina e a cistina. De um modo geral, a concentração de aminoácidos essenciais nos animais que receberam proteína de soro foi maior em relação ao caseinato de sódio.

Após 20 minutos da intubação, as alterações aminoacídicas detectadas foram invertidas. Embora o resultado obtido para a maioria dos aminoácidos tenha sido estatisticamente igual entre o CSD e o CasNa, concentrações maiores do ácido aspártico, treonina + serina, alanina, valina e arginina foram detectadas para o CasNa. Somente a concentração de cistina permaneceu mais elevada para os animais que receberam CSD, demonstrando que a proteína de soro apresenta maior concentração de aminoácidos sulfurados, comparado com a caseína.

Após 40 minutos (T40), a concentração de valina e fenilalanina continuaram mais elevadas para o CSD, diferindo estatisticamente à nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Em relação aos outros aminoácidos não houve diferença estatística entre os tratamentos no tempo T40.

Após 60 minutos (T60), a presença de metionina e arginina foi maior para o tratamento com CasNa, enquanto que para o CSD, a cistina continuou prevalecendo em maior concentração. Os demais aminoácidos não diferiram estatisticamente a nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Baró *et al.* (1995) em estudos realizados com ratos recém-desmamados, encontraram perfis séricos de aminoácidos diferentes para fontes protéicas distintas independente de sua forma molecular. Foi também observado pelos autores a baixa quantidade de aminoácidos sulfurados no soro dos animais que

receberam dieta de caseína, confirmando a hipótese de que a caseína possui quantidades limitantes de aminoácidos sulfurados.

Um estudo relatado por Boirie *et al.* (1997), sugeriu que diferenças de tempo no esvaziamento gástrico entre caseína e proteínas do soro, podem existir, uma vez que a caseína coagula em meio ácido e portanto coagula no estômago; ao contrário da proteína de soro, que é liberada mais rapidamente para digestão e absorção no duodeno. Esses autores mostraram diferenças fundamentais entre a caseína e as proteínas de soro no metabolismo humano. Enquanto as proteínas de soro ao serem ingeridas passam rapidamente ao intestino delgado, são rapidamente digeridas e absorvidas, as caseínas sofrem coagulação no estômago onde permanece por um tempo bem maior, retardando assim os processos da digestão e a absorção de aminoácidos. Por outro lado as proteínas do soro parecem favorecer e estimular a síntese protéica no organismo, enquanto que as caseínas parecem favorecer a conservação das proteínas no organismo, retardando o catabolismo.

Boirie *et al.* (1997), classificaram as proteínas do soro como “fast” e as caseínas como “slow” no que tange à digestão, absorção de aminoácidos e metabolismo protéico no organismo. Comentando as pesquisas de Boirie e colaboradores (1997), Fruhbeck (1998) chama a atenção da importância que as proteínas do soro de leite possam ter em condições de estresses metabólicos como em queimaduras, desnutrição protéica aguda, prematuros, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, entre outros, como fonte protéica restauradora das deficiências protéicas no organismo.

Pode-se concluir que a concentração sérica de aminoácidos depende principalmente da proteína ingerida e do perfil aminoacídico desta proteína. Também é importante citar que a velocidade da síntese pós-prandial de proteínas é dependente do tipo de determinados aminoácidos existentes na fonte protéica ingerida. Neste estudo pôde-se observar que o CSD é digerido e absorvido mais

rapidamente que o CasNa, sugerindo uma maior eficiência do CSD como agente de síntese protéica, em função não somente da velocidade de digestão e absorção, mas também do excelente equilíbrio de aminoácidos destas proteínas.

Tabela 1. Valores encontrados para análise de aminoácidos no soro de animais previamente intubados com concentrado protéico de soro doce (CSD) ou caseinato de sódio (CasNa).

Aminoácidos (mg/100mL soro)	Tempos (minutos)			
	T 10 CasNa	T 10 CSD	T 20 CasNa	T 20 CSD
Ac. Aspártico	0,47 ± 0,046	0,49 ± 0,043	0,56 ± 0,05 ^a	0,23 ± 0,03 ^b
Treonina + Serina	13,77 ± 1,51	13,50 ± 0,27	10,16 ± 0,76 ^a	8,56 ± 0,97 ^b
Ác. Glutâmico	4,40 ± 0,49	4,59 ± 0,35	3,68 ± 0,22	3,05 ± 0,56
Prolina	1,89 ± 0,15 ^b	2,32 ± 0,03 ^a	1,72 ± 0,15	1,61 ± 0,22
Glicina	3,24 ± 0,46	3,50 ± 0,18	2,35 ± 0,33	1,86 ± 0,68
Alanina	5,8 ± 0,91 ^b	8,75 ± 0,23 ^a	5,98 ± 0,70 ^a	3,82 ± 0,53 ^b
Cistina	0,028 ± 0,05 ^b	5,13 ± 0,10 ^a	0,16 ± 0,01 ^b	3,84 ± 0,07 ^a
Metionina	0,32 ± 0,04 ^b	0,70 ± 0,08 ^a	0,14 ± 0,06	0,21 ± 0,04
Valina	2,36 ± 0,25 ^b	3,81 ± 0,18 ^a	2,28 ± 0,34 ^a	1,14 ± 0,05 ^b
Isoleucina	1,57 ± 0,19 ^b	2,30 ± 0,04 ^a	1,27 ± 0,17	1,32 ± 0,24
Leucina	2,56 ± 0,39 ^b	3,73 ± 0,11 ^a	1,89 ± 0,29	1,80 ± 0,61
Tirosina	1,61 ± 0,26 ^b	2,12 ± 0,1 ^a	1,56 ± 0,19	1,39 ± 0,25
Fenilalanina	1,31 ± 0,21 ^b	1,77 ± 0,77 ^a	1,02 ± 0,21	1,04 ± 0,18
Lisina	4,67 ± 0,67 ^b	8,65 ± 0,14 ^a	5,45 ± 0,71	5,01 ± 0,59
Histidina	2,46 ± 0,14	2,12 ± 0,53	2,13 ± 0,68	1,40 ± 0,21
Arginina	0,25 ± 0,029 ^a	0,069 ± 0,02 ^b	1,36 ± 0,05 ^a	0,23 ± 0,08 ^b
Somatória dos aminoácidos totais	46,71	63,55	41,71	36,51

Médias seguidas por letras diferentes ^{a, b} (linhas) indicam diferença estatística, a nível de 5% pelo teste de Tukey, entre os tratamentos com CSD e CasNa, nos tempos T10 e T20.

Valores expressos como média de 4 animais por tratamento ± desvio padrão.

Tabela 2. Valores encontrados para análise de aminoácidos no soro de animais previamente intubados com concentrado protéico de soro doce (CSD) ou caseinato de sódio (CasNa).

Aminoácidos (mg/100mL soro)	Tempos (minutos)			
	T 40 CasNa	T 40 CSD	T 60 CasNa	T 60 CSD
Ac. Aspártico	0,44 ± 0,02	0,45 ± 0,07	0,51 ± 0,87	0,43 ± 0,01
Treonina + Serina	8,90 ± 0,69	9,73 ± 1,57	10,33 ± 0,77	9,81 ± 1,68
Ác. Glutâmico	2,80 ± 0,17	2,67 ± 0,35	3,03 ± 0,14	3,05 ± 0,6
Prolina	1,68 ± 0,17	1,71 ± 0,24	1,66 ± 0,07	1,38 ± 0,3
Glicina	2,18 ± 0,36	2,29 ± 0,32	2,43 ± 0,08	2,14 ± 0,33
Alanina	4,24 ± 0,49	4,79 ± 0,63	4,38 ± 0,43	3,57 ± 0,54
Cistina	2,39 ± 0,26	1,97 ± 0,24	0,11 ± 0,01 ^b	2,05 ± 0,04 ^a
Metionina	0,05 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,29 ± 0,03 ^a	0,14 ± 0,08 ^b
Valina	1,44 ± 0,06 ^b	2,30 ± 0,39 ^a	2,12 ± 0,28	1,84 ± 0,29
Isoleucina	1,06 ± 0,18	1,36 ± 0,19	1,23 ± 0,16	1,21 ± 0,15
Leucina	1,61 ± 0,27	2,07 ± 0,27	1,74 ± 0,14	1,85 ± 0,26
Tirosina	1,23 ± 0,14	1,36 ± 0,15	1,36 ± 0,11	1,28 ± 0,04
Fenilalanina	0,75 ± 0,13 ^b	1,04 ± 0,17 ^a	0,90 ± 0,10	0,90 ± 0,12
Lisina	4,50 ± 0,63	5,33 ± 0,92	5,09 ± 0,35	5,74 ± 0,48
Histidina	2,30 ± 0,03	2,42 ± 0,21	2,37 ± 0,23	1,97 ± 0,77
Arginina	0,49 ± 0,06	0,50 ± 0,07	0,38 ± 0,07 ^a	0,26 ± 0,04 ^b
Somatória dos aminoácidos totais	36,06	40,06	37,93	37,62

Médias seguidas por letras diferentes ^{a, b} (linhas), indicam diferença estatística a nível de 5% pelo teste de Tukey, entre os tratamentos, nos tempos T40 e T60.

Valores expressos como média de 4 animais por tratamento ± desvio padrão.

As Figuras 3a e 3b mostram o esquema gráfico dos diversos aminoácidos encontrados no soro de animais que receberam proteína de soro de leite bovino e de caseinato de sódio, via intubação gástrica.

* Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

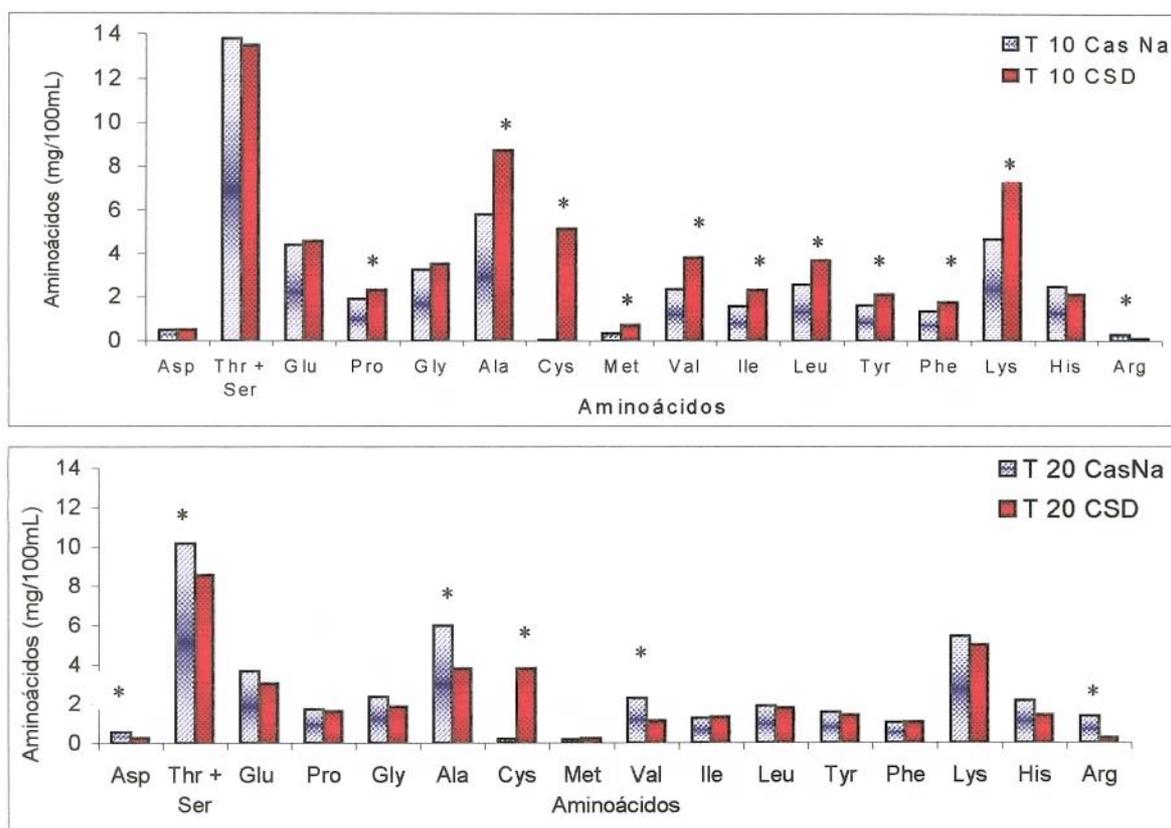


Figura 3a. Acúmulo, seguido de desaparecimento de aminoácidos no soro sangüíneo da veia porta de ratos intubados com quantidade idêntica de proteínas CSD ou CasNa (mg de aminoácido/100mL de soro, nos tempos de T10 e T20 min após gavagem).

* Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

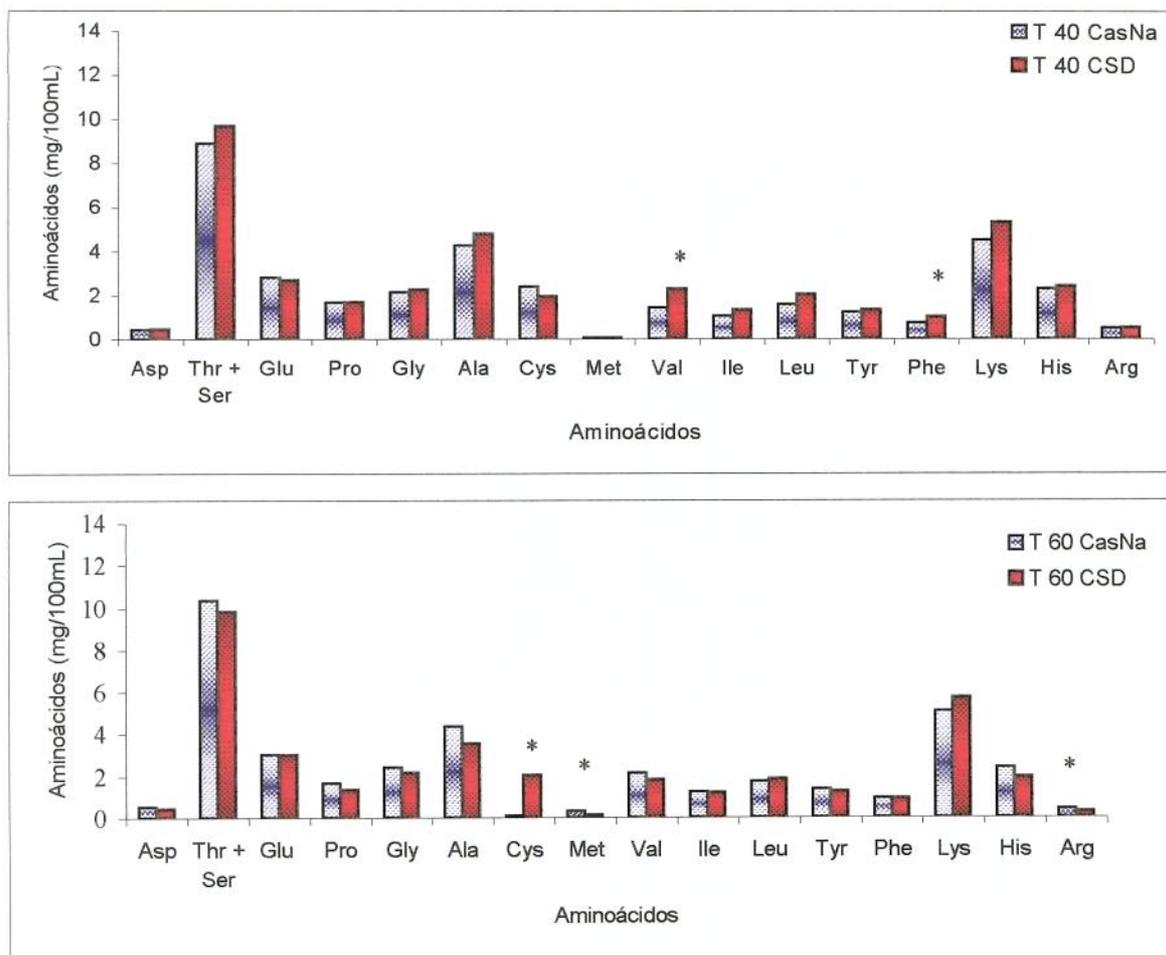


Figura 3b. Acúmulo, seguido de desaparecimento de aminoácidos no soro sangüíneo da veia porta de ratos intubados com quantidade idêntica de proteínas CSD ou CasNa (mg de aminoácido/100mL de soro, nos tempos de T40 e T60 min após gavagem).

O desaparecimento rápido dos aminoácidos séricos (entre 10 e 40 minutos) após intubação, no tratamento com CSD (Figura 3a e 3b), coincidindo com a formação de um pico de proteína no soro sangüíneo aos 20 minutos após intubação, sugere que, não somente houve digestão e absorção rápida para as proteínas do soro, mas também, que seus aminoácidos entram rapidamente no processo de síntese a nível de vários tecidos. Isto também sugere que esta fonte

de proteína poderá ser muito eficiente para reabastecer as células e o organismo de proteína em condições de estresses metabólicos como em prematuros, queimaduras e outros tipos de traumas bem como câncer e AIDS, em sua fase avançada.

Essas observações, embora ainda preliminares, parecem concordar com a de outros pesquisadores (Boirie *et al.*, 1997; Fruhbeck, 1998) de que a proteína de soro de leite induziu um aumento dramático mas efêmero dos aminoácidos plasmáticos. Por outro lado, a síntese protéica, imediatamente após a ingestão foi estimulada em 68% no caso das proteínas de soro de leite e apenas 31% pela ingestão da caseína (Boirie *et al.*, 1997).

A Figura 4 mostra a concentração de proteína no conteúdo intestinal nos vários tempos após intubação gástrica, em ratos que receberam concentrado protéico de soro de leite bovino ou de caseinato de sódio.

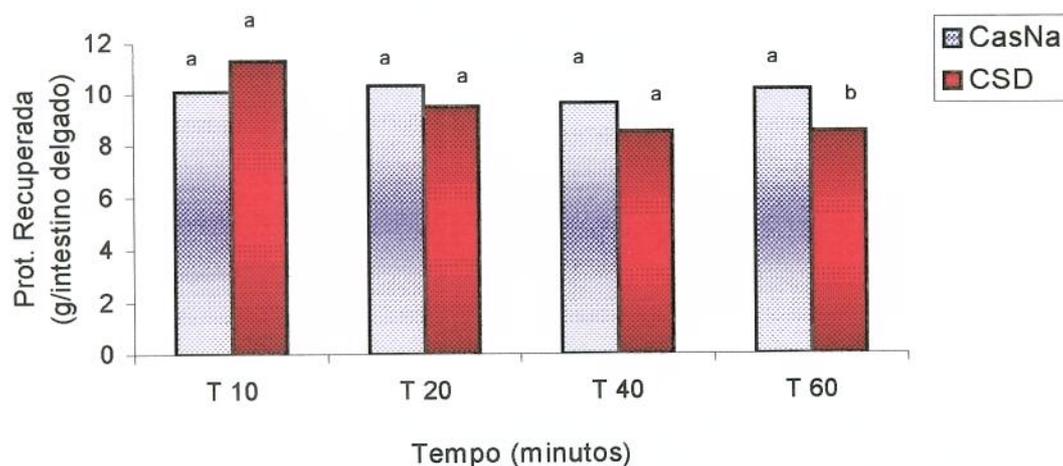


Figura 4. Concentração de proteína solúvel no conteúdo intestinal de ratos intubados com duas fontes proteicas: concentrado protéico de soro doce (CSD) ou caseinato de sódio (CasNa), após vários tempos de intubação.

Letras diferentes sobre as colunas, indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre tratamentos.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos nos tempos 10, 20 e 40 minutos, para o conteúdo de proteína solúvel recuperada do intestino dos animais nos dois tratamentos. Após 60 minutos de intubação, houve diferença estatística em relação ao conteúdo intestinal de proteína solúvel dos animais que receberam o caseinato de sódio que foi superior ao tratamento com concentrado protéico de soro doce ($p < 0,05$).

Este fato demonstra o retardamento da digestão e absorção do caseinato de sódio em relação ao concentrado protéico de soro de leite. A velocidade de digestão do CSD é maior por ser uma proteína solúvel, nas condições ácidas do estômago, enquanto que as caseínas coagulam no estômago retardando, deste modo, o esvaziamento gástrico e conseqüentemente, o trânsito intestinal e liberação de aminoácidos para síntese orgânica de novas proteínas (Boirie *et al.*, 1997).

As casomorfina, liberadas durante a digestão das caseínas, podem afetar a função gastrointestinal, inibindo o grau de esvaziamento gástrico e a motilidade intestinal, retardando a passagem da dieta não somente do estômago para o intestino, mas também através de todo tubo digestivo (Schanbacher *et al.*, 1998; Daniel *et al.*, 1990).

4. Conclusões

- a) O concentrado protéico de soro doce (CSD), promoveu no tempo T10 (10 minutos após intubação gástrica) maior concentração sérica ($p < 0,05$) dos aminoácidos prolina, alanina, cistina, metionina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina e lisina, bem como concentração significativamente mais elevada de proteína sérica do que o tratamento com idêntica quantidade de caseinato de sódio (CasNa).

- b) No T20 (20 minutos após intubação gástrica), apenas o aminoácido cistina permaneceu significativamente mais elevado no soro dos animais que receberam CSD em comparação aos que receberam o caseinato de sódio tendo, entretanto, sido atingido o pico máximo de proteínas séricas para o tratamento de CSD, exatamente 20 minutos após intubação gástrica.

- c) A proteína solúvel recuperada do intestino delgado, nos vários tempos após intubação, não diferiu estatisticamente para os dois tratamentos, até os 40 minutos; aos 60 minutos após intubação, a proteína recuperada foi mais elevada no tratamento com caseína ($p < 0,05$) que para o tratamento com CSD.

5. Referências Bibliográficas

- BARÓ, L.; GUADIX, E.M.; AUGUSTIN, O.M.; BOZA, J.J.; GIL, A. Serum amino acid concentrations in growing rats fed intact protein versus enzymatic protein hydrolysate-based diets, **Biology of Neonate**, v. 68, n. 1, p. 55-61, 1995.
- BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M..P.; MAUBOIS, J.L.; BEAUFRÈRE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy Science**. London, v. 94, p. 14930 – 14935, 1997.
- BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Berlin, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- DANIEL, H.; VOHWINKEL, M.; REHNER, G. Effect of casein and β -casomorphins on gastrointestinal motility in rats. **Journal of Nutrition**, Germany, v. 120, n. 3, p. 252-257, 1990.
- FRUHBECK, G. Slow and fast dietary protein. **Nature**, v. 391, n.2, p. 843-845, 1998.
- GOMES, F.P. **Curso de Estatística Experimental**. 10 ed., Nobel: São Paulo, 1982, 430 p.
- MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, Germany, v. 8, n. 5/6, p. 363-373, 1998.

SCHANBACHER, F.L.; TALHOUK, R.S.; MURRAY, F.A.; GHERMAN L.I.; WILLETT, L.B. Milk-borne bioactive peptides, **International Dairy Journal**, Ohio, v. 8, n. 5/6, p. 393-403, 1998.

SIEMENSMA, A. D.; WEIJER, W.J.; BAK, H.J. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae, **Trends in Food Science & Technology**, v.4, n. 1, p. 16-21, 1993.

STEELE, R.D.; HARPER, A. E. Protein. In: BROWN, M.L. (Ed.), **Present Knowledge in Nutrition**, 6th ed. Washington, DC: Nutrition Foundation, 1990, p. 67-79.

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

Anexos

Trabalhos preparados para publicação com dados parciais desta tese:

1. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo.

Zinsly, P.F.; Sgarbieri, V.C.; Pereira Dias, N.F.G.; Jacobucci, H.B.; Pacheco, M.T.B.; Baldini, V.L.S. Submetido para publicação na Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, 2000.

1. Novel Nutritional and physiological functions of milk proteins.

Sgarbieri, V.C.; Rangel, H.A.; Zinsly, P.F.; Pacheco, M.T.B.; Pereira Dias, N.F.G. A ser apresentado e publicado nos Anais da "4th International Conference of Food Science and Technology", October 17 to 20, 2000, Wuxi, China.