

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE HIDROLISADO DE PROTEÍNAS DO SORO DE
QUEIJO BOVINO NO PREPARO DE SUPLEMENTO NUTRICIONAL:
MINIMIZAÇÃO DA SARCOPENIA EM RATOS IDOSOS.**

DANIELA PARREIRA MARQUES

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA-UNESP,
COMO PARTE DAS EXIGÊNCIAS PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE **DOCTOR EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS.**

ARARAQUARA/SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE HIDROLISADO DE PROTEÍNAS DO SORO DE
QUEIJO BOVINO NO PREPARO DE SUPLEMENTO NUTRICIONAL:
MINIMIZAÇÃO DA SARCOPENIA EM RATOS IDOSOS.**

DANIELA PARREIRA MARQUES

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA-UNESP,
COMO PARTE DAS EXIGÊNCIAS PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE **DOCTOR EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS.**

ORIENTADOR: PROF. DR. RUBENS MONTI

ARARAQUARA/SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S357p Marques, Daniela Parreira
Produção e aplicação de hidrolisado de proteínas do soro de queijo bovino no preparado de suplemento nutricional: minimização da sarcopenia em ratos idosos / Marques Parreira Marques. – Araraquara, 2009.
125 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Rubens Monti

1.Hidrolisados. 2.Proteínas do soro de queijo bovino. 3.Enzimas imobilizadas. 4.Ratos idosos. I.Monti, Rubens, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rubens Monti
(Orientador)

Prof. Dr. Reinaldo Marchetto
(Membro)

Prof. Dra. Thais Borges Cesar
(Membro)

Prof. Dr. João Atílio Jorge
(Membro)

Prof. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel Inocentes
(Membro)

Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi
(Membro- Suplente)

Prof. Dra. Olga Luisa Tavano
(Membro- Suplente)

Prof. Dr. Antônio José Goulart
(Membro- Suplente)

Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido
(Membro- Suplente)

Prof. Dra. Eleonora Cano Carmona
(Membro- Suplente)

Agradeço a Deus, Ser Supremo, por ter me concedido a sabedoria, o discernimento e a compreensão para os pequenos e grandes adventos da vida.

A meu noivo Rodrigo pela paciência, apoio
e grande incentivo para seguir em frente.

À minha mãe Cris, Naná, Chico e Odilon
pelos conselhos e ajuda.

Ao meu orientador Rubens, pelos ensinamentos,
conselhos e amizade

AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo Vitor pela grande ajuda, conselhos e risadas.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Ana, Caio, Julio, Andréa, Jú, Carol e Rubens pela amizade, auxílio e agradáveis momentos divididos.

Aos meus amigos estrangeiros Andreina, Juanma, Pilar, Fernando, Godoi, Chioma, Chiara, Marco, Marzia, Javi, Litzie e Yanoska que tornaram os dias de trabalho na Espanha mais prazerosos e divertidos.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto e Saulo pelo apoio, sugestões e incentivo.

Aos Profs Drs. Guisán, Gloria, Beni, Palomo, Mateo e Munilla pela paciência, conselhos e ensinamentos que auxiliaram imensamente minha pesquisa no exterior.

A todos os Laboratórios e técnicos que auxiliaram na obtenção de dados da minha pesquisa com animais.

Às minhas queridas amigas Jú e Vanessa pela grande amizade e incentivo.

À Fundunesp, Capes e PADC- UNESP-Araraquara pelo auxílio financeiro.

Aos animais que cederam a vida para tornar viável a pesquisa, um agradecimento especial.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha pesquisa e conclusão desse trabalho
OBRIGADA.

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO 1- Obtenção de hidrolisados de proteínas de soro de queijo por enzimas solúveis</i>	33
INTRODUÇÃO.....	33
1. Proteínas do soro de queijo	33
1.1 β - Lactoglobulina.....	33
1.2 α - Lactoalbumina.....	33
1.3 Soro Albumina Bovina.....	34
1.4 Imunoglobulinas.....	34
1.5 Glicomacropéptido.....	35
1.6 Lactoferrina e Lactoperoxidase.....	35
2. Enzimas Proteolíticas	36
2.1 Pepsina.....	36
2.2 Tripsina	36
2.3 Quimotripsina.....	36
2.4 Carboxipeptidase.....	36
OBJETIVOS.....	37
1. Geral.....	37
2. Específicos.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
MATERIAL.....	38
1. Soro de queijo.....	38
2. Enzimas e Tampões.....	38
3. Reagentes utilizados na dosagens de proteína, aminoácidos e peptídeos e açúcar redutor.....	38
3.1 Proteínas.....	38
3.2 Aminoácidos e peptídeos.....	38
3.3 Açúcar redutor.....	39
3.4 Gordura.....	39
4. Filtração.....	39
5. Diálise.....	39
6. Eletroforeses.....	39
7. Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	39

8. Equipamentos.....	40
MÉTODOS.....	40
1. Preparo do soro de queijo e análise da quantidade de proteína, açúcar redutor e pH do soro produzido.....	40
2. Preparo das enzimas hidrolíticas.....	41
3. Hidrólise do soro de queijo.....	41
4. Análise por HPLC dos produtos de hidrólise do soro de queijo.....	42
5. Caracterização dos hidrolisados.....	42
6. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS.....	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
1. Análise do conteúdo de aminoácidos.....	43
2. Análise das proteínas do soro de queijo por HPLC e SDS-PAGE após diferentes tratamentos enzimáticos.....	44

<i>CAPÍTULO 2- Utilização dos hidrolisado de proteínas do queijo bovino como suplemento para ratos idosos visando a minimização da sarcopenia.....</i>	54
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

INTRODUÇÃO.....	54
1. A sarcopenia em idosos e as pesquisas visando sua minimização.....	54
OBJETIVOS.....	56
1. Geral.....	56
2. Específicos.....	56
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
MATERIAL.....	57
1. Animais.....	57
2. Ração.....	57
3. Suplementação.....	57
MÉTODOS.....	57
1. Análise do protocolo experimental pelo comitê de ética.....	57
2. Criação dos animais.....	58
3. Estabelecimento da amostra e grupos experimentais.....	60
4. Metodologia aplicada na administração do suplemento alimentar.....	61
5. Determinação da quantidade de ração e suplemento a serem administrados diariamente.....	63

6. Período de experimentação.....	63
7. Sacrifício dos animais.....	64
8. Extração de sangue e peças a serem analisadas.....	64
9. Análise sanguínea.....	66
10. Análise da massa muscular e massa óssea (peso).....	66
11. Análise de cálcio ósseo.....	66
12. Análise de proteína do músculo gastrocnêmio.....	67
13. Análise estatística de dados.....	67
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68

CAPÍTULO 3- Imobilização e estabilização das enzimas tripsina e pepsina para posterior utilização na obtenção de hidrolisados de soro de queijo..... 79

INTRODUÇÃO..... 79

1. Imobilização de enzimas..... 79

1.1 Aspectos gerais sobre a imobilização de enzimas..... 79

1.1.1 Retenção física..... 80

1.1.1.1 Aprisionamento..... 80

1.1.1.2 Inclusão em membranas..... 80

1.1.2 União química..... 81

1.1.2.1 Adsorção..... 81

1.1.2.2 União covalente..... 82

1.2 Efeitos da imobilização..... 83

1.2.1 Estabilidade 83

1.2.2 Atividade Enzimática 84

1.3 Aplicações de enzimas imobilizadas..... 84

1.4 Pepsina e tripsina imobilizadas..... 84

OBJETIVOS..... 86

1. Geral..... 86

2. Específicos..... 86

MATERIAL E MÉTODOS..... 87

MATERIAL..... 87

1. Derivado tripsina..... 87

2. Derivado pepsina..... 87

MÉTODOS.....	87
1. Obtenção dos derivados tripsina.....	87
1.1 Ativação dos géis sepharose.....	87
1.2 Preparo dos derivados de tripsina.....	88
1.3 Redução com borohidreto.....	88
1.4 Ensaio enzimáticos.....	89
1.5 Termoestabilidade dos derivados.....	89
1.6 Estabilidade dos derivados em presença de co-solventes e temperatura.....	89
1.7 Termoestabilidade dos derivados em pH 9,0.....	90
1.8 Reação de hidrólise da PGA (proteína G-acilase) pelos diferentes derivados de tripsina.....	90
1.9 Reação de hidrólise de extrato de E.coli pelos diferentes derivados de tripsina.....	90
1.10 Hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino pelo derivado tripsina glioxil pH 8,5.....	90
1.11 SDS-PAGE dos derivados de tripsina.....	91
1.12 SDS- PAGE dos produtos de hidrólise de E.coli, PGA e proteínas do soro de queijo bovino.....	91
2. Obtenção dos derivados pepsina.....	91
2.1 Ativação dos géis sepharose.....	91
2.2 Purificação da pepsina.....	91
2.3 Preparo dos derivados de pepsina.....	92
2.4 Redução com borohidreto.....	92
2.5 Ensaio enzimáticos.....	92
2.6 Termoestabilidade dos derivados.....	93
2.7 SDS-PAGE dos derivados de pepsina e dos produtos de hidrólise.....	93
3. Obtenção e análise dos hidrolisados de proteína do soro de queijo bovino utilizando-se os melhores derivados de pepsina e tripsina.....	93
3.1 Obtenção dos hidrolisados.....	93
3.2 Análise do conteúdo de proteínas.....	94
3.3 SDS-PAGE dos produtos de hidrólise.....	94
3.4 Análise do conteúdo de aminoácidos (HPLC).....	94
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
1. Derivados de tripsina.....	95

2. Derivados de pepsina.....	103
3.Análise dos hidrolisados das proteínas do soro de queijo pelos derivados pepsina e tripsina.....	107
CONCLUSÃO.....	113
<i>CAPÍTULO 1.....</i>	113
<i>CAPÍTULO 2.....</i>	113
<i>CAPÍTULO 3.....</i>	114
ANEXO- Aprovação do trabalho pelo Comitê de ética.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.

- Figura 1. **A.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 1) no tempo de 40 minutos. **B.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 1) no tempo de 120 minutos..... **44**
- Figura 2. Eletroforese do padrão e do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 1) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação..... **45**
- Figura 3. **A.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 2) no tempo de 40 minutos. **B.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 2) no tempo de 120 minutos..... **46**
- Figura 4. Eletroforese do padrão e do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 2) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação..... **47**
- Figura 5. **A.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 3) no tempo de 40 minutos. **B.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 3) no tempo de 120 minutos..... **48**
- Figura 6. Eletroforese do padrão e do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 3) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação..... **49**
- Figura 7. Eletroforese do padrão e do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 4) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação..... **49**
- Figura 8. **A.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 4) no tempo de 40 minutos. **B.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 4) no tempo de 120 minutos..... **50**
- Figura 9. **A.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 5) no tempo de 40 minutos. **B.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 5) no tempo de 120 minutos..... **51**
- Figura 10. Eletroforese do padrão e do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 5) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação..... **52**

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Gráfico de peso inicial (pré-experimento) e final (dia antecedente ao sacrifício) médio (g) dos animais..... **69**
- Figura 2. Gráfico da massa seca média (g) do músculo soleus dos animais..... **70**
- Figura 3. Gráfico da massa seca média (g) do músculo tibial dos animais..... **70**

Figura 4. Gráfico da massa seca média (g) do músculo EDL dos animais.....	71
Figura 5. Gráfico da média da dosagem de proteína do músculo gastrocnêmio (mg proteína/100g de músculo) dos animais.....	71
Figura 6. Gráfico da massa média (g) das cinzas do fêmur dos animais.....	72
Figura 7. Gráfico da média da dosagem de cálcio ósseo (mg cálcio/g de cinza) dos animais.....	72
Figura 8. Gráfico da média da dosagem de glicose, colesterol, triglicerídeos e HDL (mg/dL) dos animais.....	74
Figura 9. Gráfico da média da dosagem de TGO (aminotransferase glutâmico-oxalacética) e TGP (aminotransferase glutâmico- pirúvica) (U/I) dos animais.....	75
Figura 10. Gráfico da média da dosagem de uréia (mg/dL) dos animais.....	75
Figura 11. Gráfico da média da dosagem de creatinina (mg/dL) dos animais.....	76
Figura 12. Gráfico da média da dosagem de cálcio sérico (mg/dL) dos animais.....	77

CAPÍTULO 3.

Figura 1. Análise por SDS- PAGE (15%) da adsorção da tripsina comercial em diferentes suportes. <i>coluna 1.</i> marcador de massa molar; <i>coluna 2.</i> tripsina comercial preparada (4mg/mL); <i>coluna 3.</i> derivado tripsina BrCN; <i>coluna 4.</i> derivado tripsina glioxil pH 10; <i>coluna 5.</i> derivado tripsina IDA-glioxil; <i>coluna 6.</i> derivado tripsina glioxil pH 8,5.....	96
Figura 2. Termoestabilidade de diferentes derivados de tripsina. Inativação realizada à 75°C pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 5mM). Glioxil pH 10,0 (◆); Glioxil pH 8,5 (■); IDA- glioxil (▲).....	97
Figura 3. Termoestabilidade de diferentes derivados de tripsina. Inativação realizada à 70°C pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 5mM). BrCN (◆); IDA- glioxil (▲).....	97
Figura 4. Estabilidade de diferentes derivados de tripsina frente à co-solventes. Inativação realizada à 50°C pH 7,0 (tampão Tris 10 mM contendo 50% de dioxano). Ensaio realizado a 24°C pH 7,0. Glioxil pH 8,5 (■); Glioxil pH 10,0 (◆); IDA- glioxil (▲).....	98
Figura 5. Estabilidade de diferentes derivados de tripsina frente à co-solventes. Inativação realizada à 40°C pH 7,0 (Tris 10 mM contendo 50% de dioxano). Ensaio realizado a 24°C pH 7,0. BrCN (◆); IDA-glioxil (▲).....	99
Figura 6. Termoestabilidade de diferentes derivados de tripsina. Inativação realizada à 50°C	

pH 9,0 (tampão bicarbonato de sódio 5mM). Glioxil pH 10,0 (◆); Glioxil pH 8,0 (■); BrCN-activated-sepharose (▲).....	100
Figura 7. Análise por SDS- PAGE (12%) dos hidrolisados de PGA comercial pelos diferentes derivados. <i>coluna 1.</i> marcador de massa molar; <i>coluna 2.</i> PGA comercial (2mg/mL); <i>coluna 3.</i> hidrólise da PGA pelo derivado BrCN; <i>coluna 4.</i> hidrólise da PGA pelo derivado glioxil pH 10,0; <i>coluna 5.</i> hidrólise da PGA pelo derivado glioxil pH 8,5. A reação foi realizada à 37°C.....	101
Figura 8. Análise por SDS- PAGE (12%) dos hidrolisados de extrato de E. coli pelos diferentes derivados. <i>coluna 1.</i> marcador de massa molar; <i>coluna 2.</i> Extrato de E. coli preparado (2mg/mL); <i>coluna 3.</i> hidrólise do extrato de E. coli pelo derivado BrCN; <i>coluna 4.</i> hidrólise do extrato de E. coli pelo derivado glioxil pH 10,0; <i>coluna 5.</i> hidrólise do extrato de E. coli pelo derivado glioxil pH 8,5. A reação foi realizada à 50°C, pH 9,0. Amostras foram retiradas 24 horas após o início da hidrólise.....	102
Figura 9. Análise por SDS- PAGE (12%) dos hidrolisados proteína do soro de queijo pelo derivado tripsina glioxil pH 8,5 <i>1.</i> marcador de massa molar; <i>coluna 2.</i> soro de queijo bovino (6mg/mL); <i>coluna 3.</i> 30 minutos de hidrólise; <i>coluna 4.</i> 60 minutos de hidrólise; <i>coluna 5.</i> 120 minutos de hidrólise. A reação foi realizada em pH 9,0 e a 50°C.....	103
Figura 10. Análise por SDS- PAGE (12%) da adsorção da pepsina commercial em diferentes suportes. <i>coluna 1.</i> marcador de massa molar; <i>coluna 2.</i> derivado pepsina BrCN; <i>coluna 3.</i> derivado pepsina glioxil pH 10; <i>coluna 4.</i> derivado pepsina amino-glioxil.....	104
Figura 11. Atividade hidrolítica de diferentes derivados de pepsina preparados. Reação realizada em presença de proteínas do soro de queijo bovino (6mg/mL) a 40°C, pH 3,0 (Tampão acetato de sódio 50mM). Glioxil pH 10,0 (◆); Amino-glioxil (■); BrCN (▲)...	105
Figura 12. SDS-PAGE 12% das proteínas do soro de queijo (6mg/mL) por distintos derivados de pepsina. <i>coluna 1.</i> marcador de massa molar; <i>coluna 2.</i> soro de queijo bovino (6mg/mL); <i>coluna 3.</i> 30 minutos de hidrólise por derivado BrCN; <i>coluna 4.</i> 24 horas de hidrólise por derivado BrCN; <i>coluna 5.</i> 30 minutos de hidrólise por derivado glioxil pH 10,0. <i>coluna 6.</i> 24 horas de hidrólise por derivado glioxil pH 10,0. <i>coluna 7.</i> 30 minutos de hidrólise por derivado amino-glioxil. <i>coluna 8.</i> 24 horas de hidrólise por derivado amino-glioxil. As reações foram realizadas em pH 3,0 a 40°C.....	106
Figura 13. Estabilidade de diferentes derivados de pepsina. Inativação realizada em 50°C, pH 3,0 (tampão acetato de sódio 5mM). Ensaio realizado em presença de solução de soro de queijo (6mg/mL) a 40°C pH 3,0. Amino-glioxil (■); BrCN (▲).....	107

Figura 14. Atividade hidrolítica (%) da combinação dos derivados amino-glioxil pepsina e glioxil pH 8,5 tripsina frente às proteínas do soro de queijo (6mg/mL). Ensaio realizado em 50°C, pH 3,0 inicial para derivado pepsina e pH 9,0 para derivado tripsina. Hidrólise iniciada pelo derivado pepsina amino-glioxil (pH 3) e após 45 minutos, recuperado o derivado, hidrólise pelo derivado tripsina Glioxil pH 8,5 (reação em pH 9,0 por mais 45 minutos) (■); Hidrólise iniciada pelo derivado tripsina glioxil pH 8,5 (pH 9) e após 45 minutos, recuperado o derivado, hidrólise pelo derivado pepsina amino-glioxil (reação em pH 3,0 por mais 45 minutos) (▲). O tempo total de reação foi de 90 minutos.....	108
Figura 15. Aminograma do hidrolisado obtido pela ação do derivado pepsina amino-glioxil em pH 3,0 50°C (45 minutos de reação) frente às proteínas do soro de queijo (6mg/mL)....	109
Figura 16. Aminograma do hidrolisado obtido pela ação do derivado tripsina glioxil pH 8,5 em seqüência à hidrólise realizada pelo derivado pepsina (pH 9,0 50°C -90 minutos de reação) frente às proteínas do soro de queijo (6mg/mL).....	109
Figura 17. Aminograma do hidrolisado obtido pela ação do derivado tripsina glioxil pH 8,5 em pH 9,0 50°C (45 minutos de reação) frente às proteínas do soro de queijo (6mg/mL)....	110
Figura 18. Aminograma do hidrolisado obtido pela ação do derivado pepsina amino-glioxil em seqüência à hidrólise realizada pelo derivado tripsina pH 3,0 50°C (90 minutos de reação) frente às proteínas do soro de queijo (6mg/mL).....	111
Figura 19. SDS-PAGE 12% do produto de hidrólise das proteínas do soro de queijo (6mg/mL) pela combinação dos derivados de pepsina e tripsina. <i>coluna 1.</i> marcador de massa molar; <i>coluna 2.</i> soro de queijo bovino (6mg/mL); <i>coluna 3.</i> 45 minutos de hidrólise pelo derivado amino-glioxil pepsina; <i>coluna 4.</i> 90 minutos de hidrólise pelo derivado glioxil pH 8,5 tripsina; <i>coluna 5.</i> 45 minutos de hidrólise pelo derivado glioxil pH 8,5 tripsina. <i>coluna 6.</i> 90 minutos de hidrólise pelo derivado amino-glioxil pepsina.....	112

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1.

Tabela 1. Quantificação do produto de hidrólise liberado pela reação com diferentes combinações enzimáticas utilizando soro queijo como substrato	43
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 2.

Tabela 1. Análise de ganho de peso, massa muscular e massa óssea dos animais.....	68
-----------------------------------------------------------------------------------	-----------

Tabela 2. Análise dos resultados obtidos nas dosagens sanguíneas de glicemia, colesterol, triglicerídeos, HDL, TGO, TGP, uréia, creatinina e cálcio sérico dos animais.....	73
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 3.

Tabela 1. Percentual de imobilização e atividade expressada dos derivados de tripsina....	95
-------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

Tabela 2. Percentual de pepsina imobilizada nos suportes.....	104
---------------------------------------------------------------	------------

Tabela 3. Área total de aminoácidos obtidos por análise em HPLC (aminograma) dos hidrolisados das proteínas do soro de queijo.....	108
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

LISTA DE FOTOS

CAPÍTULO 2.

Foto 1. Caixa para contenção de animais utilizada nos experimentos.....	59
Foto 2. Estantes contendo as caixas com os animais.....	59
Foto 3. Injeção do suplemento à ração para posterior administração aos animais.....	61
Foto 4. Colocação do suplemento na gaiola.....	62
Foto 5. Ingestão da suplementação pelo animal.....	62
Foto 6: Finalização da ingestão da suplementação pelo animal.....	62
Foto 7. Equipe trabalhando na extração das peças dos animais envolvidos na pesquisa....	65
Foto 8. Músculo gastrocnêmio direito extraído de um dos animais.....	65
Foto 9. Bancada de pesagem e identificação das peças extraídas.....	65

LISTA DE ANEXOS

Parecer Comitê de ética em Pesquisa.....	115
------------------------------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIQ	Associação Brasileira de Indústrias de Queijo
ACN	Acetonitrile
AIN	American Institute of Nutrition
BAPNA	N- α -benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida
BrCN	Bromocianógeno
CCK	Colecistocinina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DHEA	Dehidro- Epi- Andosterona
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DRI	Dietary Reference Intakes
FAO	Food Agriculture Organization
GLP1	Peptídeo 1
GMP	Glicomacropéptídeo
HDL	High-density lipoprotein
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Iminodiacetic acid
kDa	Kilodaltons
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Proteína Bruta
TFA	Trifluoroacetic acid
TGO	Aminotransferase glutâmico-oxalacética
TGP	Aminotransferase glutâmico- pirúvica

RESUMO

Os hidrolisados de proteínas do soro de queijo vêm sendo amplamente utilizados para diversos fins. Dependendo das enzimas utilizadas e meio de reação, podemos obter hidrolisados com diferentes características. O intuito do presente trabalho foi hidrolisar as proteínas do soro de queijo bovino de diferentes maneiras, variando-se a temperatura de reação e modo de adição das enzimas, a fim de se obter hidrolisados com diferentes graus de hidrólise para posterior aplicação em ensaios animais. Os hidrolisados escolhidos para aplicação nos ensaios biológicos foram obtidos pela ação das enzimas pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase a 50°C. Dois hidrolisados diferentes foram preparados: um com maior quantidade de pequenos peptídeos (oligo, di e tripeptídeos) e outro com maior quantidade de aminoácidos livres. O soro sem hidrólise também foi utilizado como suplementação para um outro grupo de animais. A intenção foi testar os dois diferentes hidrolisados e o soro sem hidrólise como suplemento para ratos idosos, visando a minimização da sarcopenia. Diversos estudos apontam que fórmulas contendo oligopeptídeos, especialmente di- e tripeptídeos, possuem maior valor nutricional do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou proteínas intactas. Tomando-se como base essa informação, delineou-se a pesquisa esperando-se que, o grupo suplementado com as proteínas parcialmente hidrolisadas obtivesse um melhor desempenho na minimização da sarcopenia. Todos os 3 grupos suplementados obtiveram aumento na massa muscular e óssea diferindo significativamente em relação ao controle (não suplementado) porém, o que apresentou efeitos mais positivos na minimização da sarcopenia foi realmente o grupo suplementado por proteínas parcialmente hidrolisadas. Paralelamente a esse estudo, em doutorado sanduíche, estudou-se a obtenção de pepsina e tripsina imobilizadas (derivados) em suporte sólido, estáveis, para posterior aplicação na obtenção de hidrolisados de soro de queijo. A utilização de derivados em processos de hidrólise, além de promover um produto final mais limpo, livre de enzimas, garante uma diminuição dos gastos da indústria, pois permite reaproveitamento das enzimas utilizadas no processo.

Palavras chave: Hidrolisados. Proteínas do soro de queijo bovino. Ratos idosos. Minimização da sarcopenia. Enzimas imobilizadas.

ABSTRACT

The cheese whey hydrolysates have been widely used for various purposes. Depending on the enzymes used and the reaction medium, we can obtain hydrolysates with different characteristics. The purpose of this study was to hydrolyze bovine cheese whey proteins in different ways, varying the temperature of reaction and enzyme addition, in order to obtain hydrolysates with different degrees of hydrolysis for application in animal tests. The hydrolysates chosen for application in biological assays were obtained by the action of enzymes pepsin, trypsin, chymotrypsin and carboxypeptidase at 50°C. Two different hydrolysates were prepared: one with a larger amount of small peptides (oligo-, di- and tripeptides) and another with larger amount of free amino acids. Serum without hydrolysis was also used as a supplement to another group of animals. The intention was to test the two different hydrolysates and whey without hydrolysis as a supplement to old age rats in order to minimize the sarcopenia. Several studies indicate that formulas containing oligopeptides, especially di- and tripeptides, have higher nutritional value than an equivalent mixture of free amino acids or intact proteins. Taking this information as a basis, the research was then outlined expecting that the group supplemented with partially hydrolyzed protein could obtain a better performance in reducing the sarcopenia. The all 3 supplemented groups showed increase in muscle mass and bone and differ significantly from control (not supplemented). However, the group who presented the most positive effects in reducing the sarcopenia was actually the group supplemented with partially hydrolyzed protein. In parallel with this study, in sandwich PhD, the attainment of immobilized pepsin and trypsin (derivatives) in solid support, stable was studied, for further application to obtain cheese whey hydrolysates. The use of derivatives in hydrolysis processes, promote a cleaner final product free of enzymes, and provides a reduction in industry spending, because it allows to reuse the enzymes in the processes.

Keywords: Hydrolysates. Bovine cheese whey. Old rats. Minimization of sarcopenia. Immobilized enzymes.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA DO SORO DO QUEIJO BOVINO COMO ALTERNATIVA PARA O REAPROVEITAMENTO DO RESÍDUO E FORNECIMENTO DE AMINOÁCIDOS E PEPTÍDEOS PARA A SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL.

De acordo com a FAO, a produção mundial de leite de vaca em 2005, foi de aproximadamente 530.718 mil toneladas. Dentro desse contexto, o Brasil encaixa-se em 7º lugar sendo responsável por 4,4% da produção mundial (FAO, 2009).

O leite de vaca, como é sabido, é a matéria-prima utilizada na confecção de queijos. No Brasil, os queijos tiveram um consumo recorde nestes últimos cinco anos (ABIQ, 2009). Inevitavelmente, em razão da fabricação de queijos, são produzidos anualmente no Brasil cerca de 3,5 mil toneladas de soro (ABIQ, 2009). Em média, para a fabricação de um quilo de queijo, são necessários dez litros de leite e, dependendo da água utilizada na fábrica, são recuperados de 9 a 12 litros de soro.

Em razão da sua composição nutricional e do grande volume produzido, o soro do queijo é considerado um subproduto de grande importância. É um líquido de cor verde - amarelo e sabor ligeiramente ácido ou doce, obtido pela coagulação do leite e redução do pH. Segundo Kosikowski (1979), o soro, porção aquosa do leite que, durante a fabricação convencional de queijos ou da caseína, se separa, é responsável por 85 a 95% do volume do leite, retendo 55% dos nutrientes do mesmo. É um potente agente de poluição e, devido à sua alta demanda biológica de oxigênio (DBO) - cerca de 30.000 a 50.000 mg de oxigênio por litro de soro -, pode provocar a destruição da flora e da fauna. Este valor é aproximadamente 100 vezes maior do que o de um esgoto doméstico (RICHARDS, 2002).

A composição do soro varia em função do queijo produzido, mas, em média, é constituído basicamente de 93% de água e somente 7% de matéria seca (parte sólida), sendo que, deste total, 70% é lactose, 10% proteína bruta (PB), 9% gordura e 11% sais minerais (KOSIKOWSKI, 1979). É certo também, que o soro do queijo é uma mistura variada de proteínas que contém uma larga classe de propriedades químicas, físicas e funcionais.

Levando-se em conta tais aspectos, uma das alternativas para resolver o problema de desperdício, poluição e custo elevado no tratamento de efluentes, seria a transformação dos resíduos protéicos, em produtos comercializáveis. Com o auxílio de

processos técnicos modernos de separação e hidrólise, o soro do queijo vem sendo transformado em produtos de amplas utilidades.

Sabemos que a proteína é nutriente indispensável na dieta. É constituída de aminoácidos e, a responsável por todos os processos necessários para a construção e manutenção dos tecidos orgânicos (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998). O soro de queijo, por possuir conteúdo protéico de origem animal, é considerado um subproduto de alto valor biológico.

Diversos trabalhos têm demonstrado que as proteínas do soro apresentam algumas vantagens em relação às caseínas (BARÓ et al., 1995). Diferenças fundamentais no metabolismo e na ação fisiológica das caseínas e das proteínas de soro de queijo, baseiam-se na propriedade das proteínas do soro não sofrerem alterações conformacionais pelos ácidos estomacais. Ao atingirem o intestino delgado são rapidamente digeridas e seus aminoácidos absorvidos, elevando rapidamente a concentração aminoacídica do plasma e estimulando a síntese de proteínas nos tecidos (BORIE et al., 1997). A maioria das atividades estudadas sobre as proteínas do soro do queijo descreve sua atividade anticarcinogênica e, mais especificamente, seu papel protetor contra o câncer de cólon e como estimulador de resposta imune (BARÓ et al., 2001).

É certo afirmar que as proteínas, para serem absorvidas pelo trato gastrointestinal, necessitam ser hidrolisadas. Por esse motivo, diversos processos de hidrólise das proteínas vêm sendo desenvolvidos no intuito de melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando particularmente, as características de absorção das proteínas (PACHECO et al., 2005).

A hidrólise é um processo suave que ocorre em uma série de estágios e, como não é feita em paralelo com reações de degradação de outros componentes do meio, permite o controle da funcionalidade do produto final através da especificidade das enzimas utilizadas (MONTI & JOST, 1978).

Ultimamente, tem havido um grande interesse por parte das indústrias em alguns fragmentos protéicos específicos presentes na dieta (BARÓ et al., 2001), bem como, em suas propriedades funcionais. As aplicações de hidrolisados de proteína como fonte de aminoácidos livres e de pequenos peptídeos são inúmeras. Dentre elas podemos destacar: formulação de dietas enterais, utilização em suplementos esportivos, sorvetes, bebidas lácteas,

misturas para sucos, confecção de marcadores de massa molecular, utilização em medicamento entre outras.

Uma das aplicações mais importantes dos hidrolisados de proteína é a sua utilização como fonte de nitrogênio na formulação de dietas enterais, destinadas à alimentação infantil e de adultos enfermos (GUADIX et al., 2000). Para exemplificar podemos citar estudos em que se têm demonstrado que os hidrolisados de proteína são importantes quanto destinados ao uso dietético, pois, são ricos em peptídeos de baixa massa molar, especialmente di e tripeptídeos e, aminoácidos livres com valores terapêutico e nutricional altos (SILVESTRE, 1996).

Além das aplicações citadas acima, os componentes do soro do leite podem ser utilizados na formulação leites fermentados, ricota, bebidas nutricionais e fortificadas, chocolates, dentre outros produtos.

Como exemplo de enzimas envolvidas no processo de hidrólise, podemos citar as proteases comerciais, que podem ser classificadas segundo sua origem, ação catalítica ou natureza do sítio catalítico. Cada uma das espécies se diferencia das outras, pela solubilidade, que corresponde ao tamanho das moléculas, e à relação nitrogênio amino/nitrogênio total (GUADIX et al., 2000).

Hoje em dia existem muitas fórmulas nutricionais que contém peptídeos, mas o tipo e a quantidade desses peptídeos dependem da fonte protéica (caseína, lactalbumina, soja, carne, leite) e do grau e tipo de hidrólise enzimática utilizada (BARÓ et al., 2001).

A maioria dos hidrolisados protéicos de soro de queijo existentes são obtidos pela hidrólise das proteínas por enzimas solúveis. A utilização de enzimas imobilizadas na hidrólise do soro de queijo ainda é pouco explorada, apesar de existirem inúmeros trabalhos sobre imobilização de proteases (MARTÍN, 1988; MANRICH et al., 2008; SABINO, 2008).

Várias vantagens podem ser obtidas quando a hidrólise ocorre por enzimas imobilizadas. A enzima imobilizada, após realizar a hidrólise do substrato, pode ser recuperada facilmente do meio de hidrólise podendo ser reaproveitada várias vezes diminuindo, dessa maneira, os custos da empresa com enzimas. Outra vantagem é que a enzima sendo recuperada deixa o produto livre do catalisador utilizado na reação de hidrólise. Por último podemos citar que a enzima imobilizada geralmente apresenta estabilidade superior ao ser comparada à enzima solúvel.

Uma larga classe de suplementos constituídos por hidrolisados de proteínas de soro de queijo pode ser encontrada no mercado. Cada suplemento é formulado com o intuito de atender uma necessidade nutricional (crianças, gestantes, desnutridos, diabéticos, dentre outros). Um dos mercados mais rentáveis para a proteína de soro de queijo é o da suplementação esportiva.

Um mercado pouco explorado é o de suplementação para idosos. A maioria dos suplementos utilizados para desnutrição pode ser utilizada para idosos; porém, sua especificidade se torna pequena quando se busca somente um tipo de macronutriente em sua formulação. Estes suplementos geralmente possuem uma mistura de macronutrientes (gordura, proteínas e carboidratos) e grande quantidade de micronutrientes; além disso, a os suplementos existentes possuem flavorização (chocolate, morango, baunilha, dentre outros) e os idosos, geralmente inapetentes, não conseguem consumir estes produtos por longo período sem enjoarem do produto. A formulação de um concentrado de proteína hidrolisada sem sabor agregado seria a melhor opção para atender as necessidades dos idosos relacionadas à deficiência na ingestão protéica.

2. A POPULAÇÃO IDOSA NO BRASIL

O envelhecimento da população é reflexo do aumento da expectativa de vida, que por sua vez, é reflexo de melhorias ocorridas no sistema de saúde e redução na taxa de natalidade. Um indivíduo é considerado idoso, de acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde), quando apresenta-se com idade superior a 60 anos. De acordo com o último censo (2000) realizado no Brasil pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) os idosos são hoje 14,5 milhões de pessoas, cerca de, 8,6% da população total do país. Ainda de acordo com o mesmo Instituto, relata-se que em uma década, a população de idosos cresceu 17%. Espera-se com o crescente número de idosos que no ano de 2025, a população idosa brasileira atinja 30 milhões de pessoas, ou seja, 15% da população (SILVA, 2005).

Sabemos que o Brasil, como qualquer outro país em desenvolvimento, ainda busca alternativas econômicas para melhorar e adequar o país como um todo e que o desenvolvimento total é um processo lento; portanto, é fácil imaginar que o país poderá ter grandes dificuldades quanto à manutenção desses idosos.

3. O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO E A MANUTENÇÃO DA NUTRIÇÃO EM IDOSOS

A população brasileira vive hoje, em média, 68,6 anos, 2,5 anos a mais que no início da década de 90. Com esses índices, ao contrário do que aconteceu em países desenvolvidos, que tardaram cerca de 100 anos para ter uma população de idosos proporcionalmente grande, em relação à população economicamente ativa, o Brasil, prepara-se para envelhecer sua população ainda em fase de desenvolvimento econômico. Mas, a importância dos idosos para a economia do país não se resume à sua crescente participação na população total do país, mas sim, porque boa parte dos idosos hoje são chefes de família e ainda sustentam seus filhos. Vários questionamentos surgem então. Estaria o Brasil preparado para sustentar uma população de idosos oferecendo-lhes respaldo econômico, médico, social e cultural a que teriam direito?

O envelhecimento é definido como um processo progressivo, gradual e variável, caracterizado pela perda crescente de reserva funcional. Em consequência ocorrem alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e psicológicas, tornando o indivíduo mais propenso a adoecer, o que aumenta suas chances de morte. Essas mudanças naturais que ocorrem no envelhecimento, podem levar à limitações funcionais associadas a afecções agudas ou crônicas, tornando os idosos mais suscetíveis aos riscos ambientais (PORTO, 2009).

O envelhecimento também é marcado por uma perda progressiva de massa corpórea magra, assim como mudança na maioria dos sistemas orgânicos (BONNEFOY, 2003). Na realidade não se sabe ao certo se as mudanças fisiológicas ocorridas durante o envelhecimento são resultado inevitável dos eventos programados geneticamente, ou de influências ambientais prolongadas (MAHAN & ESCOTT- STUMP, 1998). O que se sabe é que a sarcopenia parece decorrer da interação complexa de distúrbios de inervação, diminuição de hormônios, aumento de mediadores inflamatórios e alterações da ingestão protéico-calórica. A perda de massa muscular é responsável pela perda da mobilidade e aumento da incapacidade funcional e dependência (SILVA et al., 2006).

Estima-se que a partir dos 40 anos, ocorra perda de 5% de massa muscular a cada década, com declínio mais rápido após os 65 anos particularmente nos membros inferiores (SILVA et al., 2006). Estudos de cadáveres com diversos métodos radiológicos

demonstraram que ocorre perda de 40% da área seccional transversa de vários grupos musculares (bíceps, tríceps, quadríceps) com a idade (SILVA, et al., 2006).

Algumas complicações são observadas quanto à ingestão recomendada de proteínas nessa fase da vida. A redução da ingestão alimentar, a “anorexia do envelhecimento”, é fator importante no desenvolvimento e progresso da sarcopenia principalmente quando associada a outras co-morbidades. Múltiplos mecanismos levam à ingestão alimentar reduzida no idoso, tais como perda de apetite, redução do paladar e olfato, saúde oral prejudicada, saciedade precoce (relaxamento reduzido do fundo gástrico, aumento da liberação da colecistocinina em resposta à gordura ingerida, elevação da leptina). Fatores psicossociais, econômicos e medicamentos também estão envolvidos (SILVA et al., 2006).

A absorção intestinal de cálcio diminui com a idade em ambos, homens e mulheres. Muitos estudos sugerem um declínio na absorção começando entre 50 e 60 anos de idade (IRELAND, 1973). A densidade óssea é diminuída e a osteoporose é uma complicação freqüente (FIATARONE, 1994).

Assim, devido ao crescente aumento da população idosa brasileira, muito se deve discutir sobre tais eventos incapacitantes nessa faixa etária.

De acordo com a DRI (2006), em média para a manutenção de uma dieta saudável, um indivíduo adulto deve ingerir cerca de 46 g/dia (mulheres) e 56 g/dia (homens) respectivamente de proteína; aproximadamente 0,8 g/Kg de peso/dia. A recomendação de proteínas é facilmente atingida quando se realiza uma dieta balanceada rica em carnes, ovos, peixes, frango, leite e derivados e, leguminosas (PHILIPPI et al, 1999). Para os vegetarianos, alcançar a recomendação se torna um pouco mais complicado.

A recomendação de proteína para os idosos (indivíduos com 60 anos ou mais), é igual a dos adultos, ou seja, 0,8 g/Kg peso/dia, porém, durante a última década um crescente corpo de pesquisa revela que o consumo de proteínas acima da DRI é benéfico na manutenção da função muscular e mobilidade e no tratamento de doenças incluindo obesidade, osteoporose, diabetes tipo II, síndrome metabólica, doença cardíaca e sarcopenia (LAYMAN, 2009).

Não existem muitos estudos a cerca deste assunto, mas, tendo em vista a depleção protéica que os idosos sofrem com o avançar da idade devido a vários fatores fisiológicos, torna-se plausível a justificativa de um incremento no consumo protéico por esses indivíduos.

Neste sentido então, desenvolveu-se a presente tese. Métodos de hidrólise foram estudados para a produção de hidrolisados de proteínas do soro de queijo bovino com enzimas solúveis e imobilizadas e em seguida, estes hidrolisados obtidos foram utilizados como suplemento nutricional na alimentação de ratos idosos com o intuito de minimizar a sarcopenia e conseqüentemente as alterações causadas por ela.

Capítulo 1.

CAPÍTULO 1

Obtenção de hidrolisados de proteínas do soro de queijo por enzimas solúveis.

INTRODUÇÃO

1. Proteínas do soro de queijo

1.1 β -Lactoglobulina (β -Lg)

A β -lactoglobulina, quantitativamente, é a principal proteína do soro, representando cerca de 50%. Sua proporção é de 3,3g/L leite bovino. No pH normal do leite (pH 6,68) ela é um dímero de massa molecular total de 36 kDa formada pela associação de duas subunidades globulares idênticas de massa molecular 18.400 kDa (LOURENÇO, 2000). Cada unidade possui estrutura primária constituída de 162 resíduos de aminoácidos em que estão presentes duas ligações dissulfeto intramoleculares que unem o resíduo de aminoácido 66 ao 160 e o resíduo 106 ao 121, e um grupo sulfidrilo reativo. A estrutura secundária da β -Lg parece ser formada por 15% de α -hélice, 50% de folhas β e de 15% a 20% de voltas β . A β -Lg nativa é muito resistente à proteólise pela pepsina em pH 2,0 e o aquecimento entre 50 e 70° C não aumenta a porcentagem de hidrólise, mas o aquecimento da proteína a 90°C antes da hidrólise facilita a ação da pepsina. A β -Lg nativa e aquecida em pH 9,0 à temperatura entre 50 e 70° são hidrolisadas com eficácia pela quimotripsina.

Ensaio biológicos realizados com animais de várias espécies mostram que a β -Lg é resistente à digestão gástrica e, pode ser considerada o principal alérgeno do leite bovino e das fórmulas lácteas infantis. Suas principais funções biológicas são: carreador de retinol, ligação com ácidos graxos, potencial antioxidante e precursor de peptídeos bioativos (FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS, 2008). De acordo com Shah (2000) a β -lactoglobulina em seu fragmento 102- 105, possui uma seqüência peptídica YLLF (β -lactoformina) que possui efeito estimulador não opióide sobre o íleo.

1.2 α - Lactoalbumina (α -La)

A α -lactoalbumina é a segunda principal proteína do soro estando presente em quantidade de 1,2g/L de leite. A família α -La consiste em um componente quantitativo principal de massa molecular 14,2 kDa (a menor proteína do soro) e possivelmente outros componentes em pequenas quantidades. A proteína é formada por 123 resíduos de aminoácidos é rica em resíduos lisil, treonil, triptofanil e cisteinil, tem ponto isoelétrico em pH 5,1 e quatro ligações dissulfeto intramoleculares que unem os resíduos 6 e 120, 28 e 111, 61 e 77 e 73 e 91, os quais estabilizam sua conformação nativa ao tratamento (LOURENÇO, 2000). Os estudos de estrutura secundária dessa proteína sugerem uma molécula de conformação dobrada compacta com 26% de α -hélice, 14% de conformação β e 60% em espiral ao acaso. Sua desnaturação ocorre em faixa ampla de temperatura (70 e 96°C).

Suas principais funções biológicas são: síntese de lactose em glândulas mamárias, carreador de Ca (cálcio), imunomodulação, anticarcinogênico e precursor do peptídeo bioativo α - lactoforina (fragmento 50-53), que possui ação opióide (antagonista) e de inibição de ECA (enzima conversora de angiotensina) atuando no controle da hipertensão arterial (FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS, 2008 & SHAH, 2000).

1.3 Soro Albumina Bovina (SBA)

A SBA tem conformação nativa globular solúvel em água, formada por uma cadeia polipeptídica constituída de aproximadamente 580 resíduos de aminoácidos de massa molecular 66,3 kDa, com pI em pH 4,7 a 4,8. Sua estrutura secundária contém cerca de 54% de α -hélice e 40% de conformação- β (folhas- β e voltas- β) (LOURENÇO, 2000). Essa proteína tem um grupo sulfidrílico no segmento amino-terminal e 17 ligações dissulfeto intramoleculares que são inacessíveis à redução por agentes químicos porque, estão confinadas no interior da conformação nativa. Suas ligações dissulfeto são reduzidas apenas em meio contendo agentes desnaturantes (uréia ou hidrócloridrato de guanidina). É resistente à desnaturação térmica a 60°C por tempos prolongados. A soroalbumina bovina apresenta-se na concentração de 0,3g/L de leite bovino e está ligada principalmente na produção de dois peptídeos bioativos: serotonina e albutensina A. O primeiro, provém do fragmento 399-404 e

possui atividade opióide e o segundo promove a contração do íleo e é inibidor de ECA (fragmento 208-215) (FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS, 2008 & SHAH, 2000).

1.4 Imunoglobulinas

Todas as imunoglobulinas, presentes na concentração de 0,6 a 1,0g/L de leite, são glicoproteínas monômeros ou polímeros de uma molécula de quatro subunidades das quais duas são leves de massas moleculares 20 kDa e duas são pesadas, de massas moleculares 50 a 70 kDa que se associam por meio de ligações dissulfeto e interações não covalentes.

Essas proteínas são divididas em quatro grupos designados IgA, IgE, IgG e IgM. Em cada molécula de um grupo ou subgrupo a estrutura primária das duas subunidades pesadas são idênticas e apresentam uma região constante de 310 a 500 resíduos de aminoácidos e uma região variável de 107 a 115 resíduos. As imunoglobulinas do soro representam 0,7% a 2% da proteína total do leite. A IgG é o grupo principal e compreende 80% do conteúdo total dessas proteínas (LOURENÇO, 2000). Como o próprio nome diz as imunoglobulinas possuem função na proteção imune específica (antisoros e sistemas complementares) (SHAH, 2000).

1.5 Glicomacropéptido (GMP)

O GMP é um peptídeo único que possui 64 resíduos de aminoácidos e massa molar de 6,755 kDa. Esse peptídeo C- terminal (resíduos 106-169) é liberado da κ -caseína durante a fabricação de queijos (FURLANETTI, 2003). Presente no leite bovino na concentração de 1,2g/L de leite, possui funções biológicas antiviral, antitrombótica, bifidogênica e de regulação gástrica. O principal peptídeo bioativo derivado dessa proteína é a Casoplatelina que possui atividade antitrombótica (SHAH, 2000).

1.6 Lactoferrina e lactoperoxidase

A lactoferrina e a lactoperoxidase são duas outras proteínas do soro de queijo. A primeira é capaz de ligar e transportar o ferro tem função antimicrobiana, antioxidativa, anticarcinogênica, antiinflamatória, e regula o crescimento celular e a segunda, possui amplas ações sendo a principal a de promover efeito antioxidante. A lactoferrina possui massa molar de 80 kDa e a lactoperoxidase 78 kDa. Ambas aparecem em pequena proporção no leite bovino (0,1g/L leite (lactoferrina) e 0,03g/L leite lactoperoxidase) (FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS, 2008).

2. Enzimas Proteolíticas

2.1 Pepsina

A pepsina é uma endopeptidase que hidrolisa ligações peptídicas entre os L-aminoácidos com melhor ação na tirosina e fenilalanina seguidas por ácido glutâmico e cisteína ou citina; porém, as hidrólises são mais rápidas entre aminoácidos aromáticos. Atua em pH ácido (~2,0). De acordo com Nissen (1992) existem vários tipos de pepsinas que podem ser classificadas em A, B, C e D. As pepsinas A e D são secretadas na mucosa gástrica fúndica enquanto as pepsinas C e B são secretadas na mucosa gástrica pilórica, onde o pH é mais baixo.

2.2 Tripsina

A tripsina é uma endopeptidase que hidrolisa ligações peptídicas em que o resíduo do lado carbonil é arginina ou lisina. Este procedimento desenrola a proteína deixando os resíduos aromáticos e hidrofóbicos mais disponíveis (WHITAKER (1966) apud TAARDIOLI et al., 2003). A massa molecular dessa enzima é 24 kDa e seu pH ótimo situa-se entre 7,0 e 9,0.

2.3 Quimotripsina

A quimotripsina é uma endopeptidase que cliva oligopeptídeos quando o aminoácido carboxílico é resíduo hidrofóbico como os aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina), leucina, isoleucina e outros. O pH ótimo dessa enzima situa-se entre 7,5 e 8,5.

2.4 Carboxipeptidase

A carboxipeptidase é uma exopeptidase que rapidamente remove amino ácidos aromáticos da extremidade carboxil terminal (AMBLER (1972) apud TARDIOLI et al., 2003). O pH e temperatura ótima de hidrólise são respectivamente 7,5 e 25°C.

OBJETIVOS

1. Geral

- Hidrolisar as proteínas do soro de queijo bovino com enzimas solúveis visando a obtenção de hidrolisados com diferentes graus de hidrólise para posterior utilização em ensaios biológicos com animais.

2. Específicos

- Utilizar diferentes combinações enzimáticas e observar a influência da temperatura e da adição das enzimas em tempos diferentes de reação, na hidrólise das proteínas do soro de queijo;

- Analisar os hidrolisados quanto ao grau de hidrólise por eletroforese e cromatografia (CLAE) e comparar os diferentes hidrolisados obtidos;

- Definir quais são os hidrolisados que deverão ser produzidos e as quantidades a serem produzidas de cada um deles para preparar o suplemento que será administrado aos animais nos ensaios biológicos (*CAPÍTULO 2*).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

1. Soro de queijo

O soro de queijo foi produzido no laboratório de enzimologia industrial- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Unesp- Araraquara, a partir do leite B (Cooperativa Dy Letto) e renina comercial de *Aspergillus niger* da marca Estrela.

2. Enzimas e Tampões

Tanto a Pepsina (EC 3.4.23.1 - 1290 unid.mg proteína⁻¹) como Quimotripsina (EC 3.4.21.1 - 55 unid.mg proteína⁻¹), Tripsina (EC 3.4.21.4 - 1300 of BAEE unid.mg sólidos⁻¹) e Carboxipeptidase foram adquiridas comercialmente da Sigma®. Já o ácido ascórbico e hidróxido de amônio utilizados para ajuste de pH foram adquiridos da Merck®

3. Reagentes utilizados nas dosagens de proteínas, aminoácidos e peptídeos e açúcar redutor

3.1 Proteínas

Para a dosagem de proteínas foram utilizados os seguintes reagentes: Sulfato de cobre, tartarato de sódio-potássio, carbonato de sódio e hidróxido de sódio (Merck®), Folin-Ciocalteu e soro albumina bovina (Sigma, Chemical Co., EUA®).

3.2 Aminoácidos e peptídeos

Ácido tricloroacético, sulfato de cobre, tartarato de sódio-potássio, carbonato de sódio e hidróxido de sódio (Merck®), Folin-Ciocalteu e tirosina (Sigma, Chemical Co., EUA®).

3.3 Açúcar redutor

Para a dosagem de açúcar redutor foram utilizados os seguintes reagentes: ácido 3-5´dinitrosalicílico (DNS) (Sigma) e lactose (Riedel®).

3.4 Gordura

Para a dosagem de gordura foram utilizados: álcool isoamílico (marca Synth®) e ácido sulfúrico (marca Merck®).

4. Filtração

O caulim utilizado para a filtração de gorduras foi da marca Reagen.

5. Diálise

As membranas utilizadas para dialisar o soro foram doadas pela Trip- Fort (Hoester®).

6. Eletroforeses

Para a realização das eletroforeses utilizou-se: Glicina, SDS, Temed, Comassie Brilliant Blue (Sigma, Chemical Co., ®) Tris-HCl (Vetec®); Acrilamida, bisacrilamida e persulfato de amônio (Merck®); Metanol, e ácido acético (Synth®) e kit com marcadores de massa molecular (Amersham Biociences GE®). O tampão utilizado para a realização das eletroforeses foi o TRIS- glicina SDS da Sigma® concentrado 10x.

7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os reagentes utilizados para a cromatografia foram: ácido trifluoracético (TFA) e padrão de aminoácidos, Sigma® e Acetonitrila e orto-ftaldeído Merck®.

8. Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: Centrífuga analítica (Fanem Excelsa Baby II Modelo 206-R); Banho Maria, com agitação e aquecimento Dubnoff (Marconi); pHmetro (Micronal B-374); Espectrofotômetro (Utrospec 1000); Bomba de Vácuo adaptada pelo Cemeq-Unesp; Cuba para eletroforese em acrílico com eletrodos adaptados (Sigma); Fonte de eletroforese 0-500 volts e de 0-250 mA (Amersham Biociences GE) e Cromatógrafo (Varian ProStar), composto por duas bombas modelo 210, injetor automático ProStar 400, detector UV/ Visível modelo ProStar 320 e integrador Star, analisador Shimadzu LC-10A/C- 47A; coluna principal: LC Column Shim-pack amino NA (P/N 228-18837-91) e pré-coluna: Shim-pack ISC 30/S0504 (Na), (P/N 228- 14206-91), controlado por uma Workstation para manipulação e tratamento dos dados.

MÉTODOS

1. Preparo do soro de queijo e análise da quantidade de proteína, açúcar redutor e pH do soro produzido

O soro de queijo bovino foi preparado a partir do leite bovino tipo B e da enzima renina (coalho comercial). CaCl_2 (0,5mol /L, 0,5%) foi adicionado para a precipitação da caseína total. A mistura foi mantida durante uma hora a 35 ° C. Após a coagulação, o queijo foi cortado e o soro foi retirado através de um processo de filtração simples com gaze. O soro obtido foi dialisado por 24 horas sob constante agitação contra água destilada para a remoção da lactose. Após a diálise, caulim (0,02g/mL) foi adicionado ao soro para remover a gordura seguido de filtração realizada em um funil de Büchner equipado com filtro de papel. O soro final foi analisado quanto ao pH e conteúdo de proteínas (HARTREE, 1972) e açúcares redutores (3-5' método do ácido dinitrosalicylic (DNS) (MILLER, 1959). O soro foi armazenado (-8°) em frascos identificados até o momento dos ensaios.

2. Preparo das enzimas hidrolíticas

As enzimas pepsina, tripsina e quimotripsina foram diluídas na proporção de 0,5mg de enzima pura para cada mL de água deionizada. Já a enzima carboxipeptidase foi preparada na proporção de 0,025 μL de enzima pura para cada ml de água deionizada. Anteriormente à definição das diluições, vários estudos foram realizados (MARQUES, 2005; CUSTÓDIO, 2001).

3. Hidrólise do soro de queijo

Vários estudos foram realizados anteriormente à definição da temperatura e pHs a serem utilizados, bem como a quantidade de enzima a ser adicionada em cada ensaio (MARQUES, 2005; CUSTÓDIO, 2001; CUSTÓDIO et al., 2005).

O soro de leite preparado foi submetido a 5 condições de hidrólise diferentes. Para as **condições 1 e 2** o soro foi tamponado com ácido ascórbico 1% para pH final 3. A temperatura

de hidrólise foi ajustada em 37°C para a **primeira condição** e 50°C para a **segunda condição**. No tempo zero de reação foi adicionada a enzima pepsina na proporção de 0,666µL de enzima diluída para cada 10 mL de soro. Após 20 minutos de reação o pH foi acertado para 9,5 com hidróxido de amônio 0,1mol/L e então foram adicionadas as enzimas tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase todas em sequência na mesma proporção calculada para a pepsina. A reação então foi mantida até um total de 120 minutos.

Sob a **condição 3** o soro foi tamponado para pH 3 e a temperatura de hidrólise foi ajustada para 50°C. Quando a temperatura foi alcançada, a pepsina foi adicionada. Após 20 minutos a suspensão (soro + pepsina) foi fervida por 2 minutos para inativação enzimática, esfriado a 35°C, tamponado para pH 9,5; então, as enzimas tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase foram adicionadas todas em conjunto na mesma proporção dos ensaios 1 e 2.

As **condições 4 e 5** seguiram as mesmas temperaturas utilizadas para os ensaios 1 e 2 respectivamente e a hidrólise por pepsina (pH tamponado para 3) ocorreu durante os primeiros 20 minutos de reação. Após tamponamento para pH 9,5 as demais enzimas foram adicionadas e seqüência em intervalos de 10 minutos: tripsina adicionada aos 20 minutos de reação, quimotripsina aos 30 minutos de reação e carboxipeptidase aos 40 minutos de reação. A hidrólise foi interrompida aos 120 minutos de reação.

4. Análise por HPLC dos produtos de hidrólise do soro de queijo

Em todas as condições amostras foram retiradas aos 40 e 120 minutos de reação para análise em HPLC. Essas amostras foram fervidas por 3 minutos e congeladas para subsequente análise por HPLC. Alíquotas de 20µL foram injetadas na coluna. As análises por HPLC foram realizadas por um aparelho da marca Varian ProStar ou por um aparelho Shimadzu LC10A, que utilizavam uma coluna Nucleosil C18 de fase reversa (25 x 0.46cm; 5µm; 300 Å) com um gradiente linear variando de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0.045% TFA; B: ACN, 0.036% TFA) por 30 min, velocidade de fluxo de 1.0 mL/min e detecção UV em λ 200nm. Os dados gerados pela workstation foram tratados em Origin 5.0 para a obtenção dos cromatogramas.

5. Caracterização dos hidrolisados

O método de McDonald e Chen (1965) foi utilizado para estimar o produto de reação liberado pelas enzimas. A sensibilidade desse método permite estimar os baixos níveis de peptídeos e aminoácidos formados no meio de reação. As alíquotas tomadas de tempos 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação foram analisados. As leituras de absorvância foram feitas em λ 700 nm. A curva de calibração foi realizada utilizando aminoácido tirosina da Riedel-de-Haën como padrão. A absorvidade estimada foi de $0,511 \text{ (mol.mL}^{-1}\text{)}^{-1}$.

6. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS

Em diferentes intervalos de tempo (0,10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos) alíquotas de 200 μL foram retiradas do ensaio enzimático. Tampão de amostra (Tris-glicina, SDS, β -ME e azul de bromofenol) foi adicionado. Depois de um minuto a 100°C , as amostras foram congeladas para posterior realização das eletroforeses. A eletroforese SDS-poliacrilamida (12% w/v) foi realizada com base no método Laemmli (1970). Amostras de 25 μL foram adicionadas e o tempo de corrida foi de 2 horas a 40 mA. 10 μL de um kit padrão de massa molar (Amershan Biociências GE), constituído por fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa) foi utilizado. A coloração do gel foi realizada com Brilliant Blue G-coloidal com base no método Neuhoff (1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análise do conteúdo de aminoácidos

Conforme demonstrado na Tabela 1. as unidades totais de aminoácidos aumentaram em todas as 5 condições testadas quando comparamos os resultados obtidos para os tempos de 40 e 120 minutos de reação respectivamente. Sob as condições 1 e 2 o produto de hidrólise teve um aumento de aproximadamente 480% e 504% respectivamente, 214% quando submetido à condição 3, 128% quando submetido a condição 4 e 115% de aumento quando submetido à condição 5. Estes valores demonstram que há um aumento na taxa de hidrólise das proteínas do soro de queijo, de diferentes maneiras, durante o experimento. Ao analisar os

valores obtidos no tempo de 120 minutos de reação, podemos notar que houve um aumento nas unidades totais de aminoácidos quando comparamos experimentos sob as mesmas condições realizados a diferentes temperaturas (condições 1 e 2 e 4 e 5). Melhor eficiência catalítica foi alcançada quando as reações são realizadas a 50°C. Os experimentos 4 e 5 alcançaram a melhor eficiência catalítica nos primeiros 40 minutos de reação, possivelmente devido à adição das enzimas em separado o que promoveu uma melhor atividade hidrolítica.

Tabela 1. Quantificação do produto de hidrólise liberado pela reação com diferentes combinações enzimáticas utilizando soro queijo como substrato

Ensaio	U totais de aa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de prot) (40 min)	U totais de aa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de prot) (120 min)
Condição 1 (37°)	0,2	0,96
Condição 2 (50°)	0,25	1,26
Condição 3 (50°)	0,76	1,63
Condição 4 (37°)	1,21	1,56
Condição 5 (50°)	2,2	2,55

Condição 1 e 2 – adição de pepsina (pH3.0). Após 20 min. mudança para pH 9.5 e adição de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase-A. (Reações feitas em 37°C e 50°C respectivamente).

Condição 3 – adição de pepsina (pH3.0). Após 20 min., fervura a 100° C por 2min., mudança para pH 9.5 e adição de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase-A. (Reações feitas em 50°C).

Condição 4 e 5 – adição de pepsina (pH3.0). Após 20 min, mudança para pH 9.5 e adição sequencial a cada 10 minutos 10min. De intervalo de tempo das enzimas tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase-A. (Reações feitas em 37°C e 50°C respectivamente).

2. Análise das proteínas do soro de queijo por HPLC e SDS-PAGE após diferentes tratamentos enzimáticos

As figuras 1 e 2 mostram os resultados da hidrólise das proteínas do soro de queijo submetido à condição 1, analisados por HPLC e SDS- PAGE respectivamente. A SDS-PAGE (Fig 2.) revelou algumas bandas de proteínas que não desapareceram completamente. A análise cromatográfica (Fig. 1A e 1B) confirma isso. Picos atribuídos a pequenas proteínas

podem ser observados no tempo de retenção de até 25 minutos. Assim, pode-se dizer que a hidrólise não foi completa, sob estas condições.

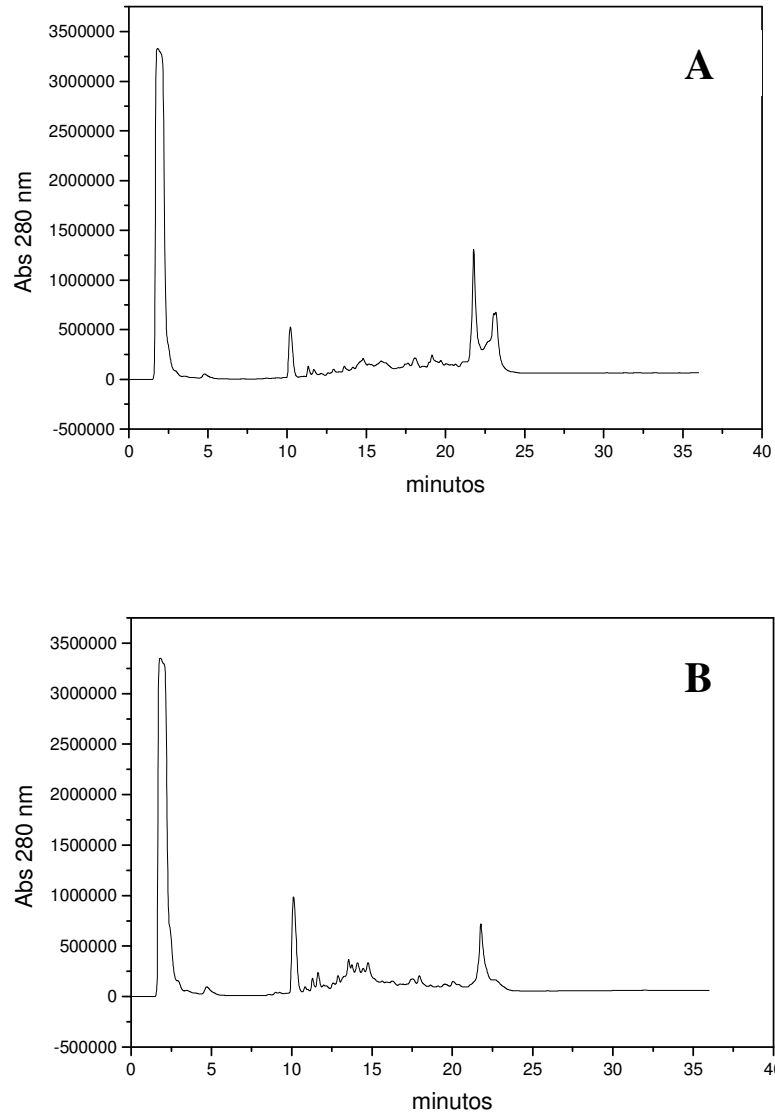


Figura 1. **A.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 1) no tempo de 40 minutos. **B.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 1) no tempo de 120 minutos.

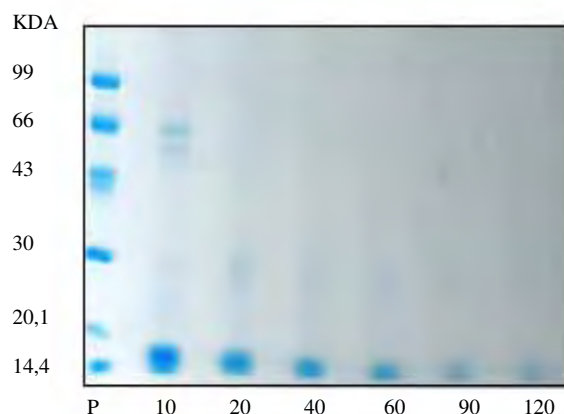


Figura 2. Eletroforese do padrão e do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 1) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação.

As Figuras 3 (HPLC) e 4 (SDS-PAGE) apresentam os resultados para os produtos de hidrólise obtidos sob a condição 2 (ver Métodos). A eficiência catalítica para a obtenção de hidrolisados de proteínas do soro, nestas condições, foi melhor do que sob a condição 1 (Fig. 1 e 2). Nos primeiros 15 minutos de reação, as proteínas hidrolisadas não foram detectadas e as bandas de proteínas não aparecem (Figura 4). No entanto, a Figura 3 (A e B) mostra picos em diferentes tempos de retenção, indicando que ainda havia peptídeos nestas amostras. Além disso, as proteínas de acordo com suas características estruturais, em meio aquoso expõe suas regiões hidrofóbicas aumentando a interação com a matriz de fase reversa. As proteínas, em condições típicas, são desorvidas da fase reversa da matriz de gel por uma diminuição da polaridade da fase móvel, resultando em maior tempo de retenção, se comparado com peptídeos pequenos que geralmente estão em um estado de espiral aleatório. A melhor resolução cromatográfica, observada na Figura 3B, indica uma hidrólise enzimática mais eficiente após 120 minutos. Os resultados obtidos na condição 1 corroboram com estes resultados.

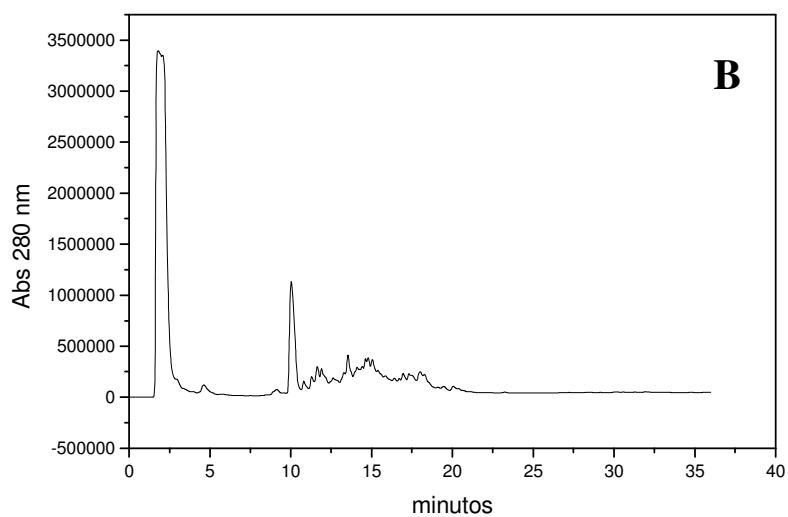
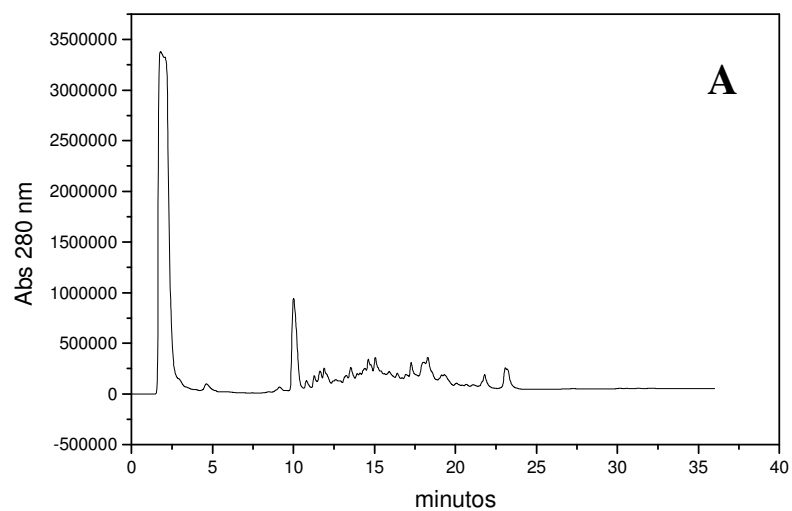


Figura 3. **A.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 2) no tempo de 40 minutos. **B.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 2) no tempo de 120 minutos.

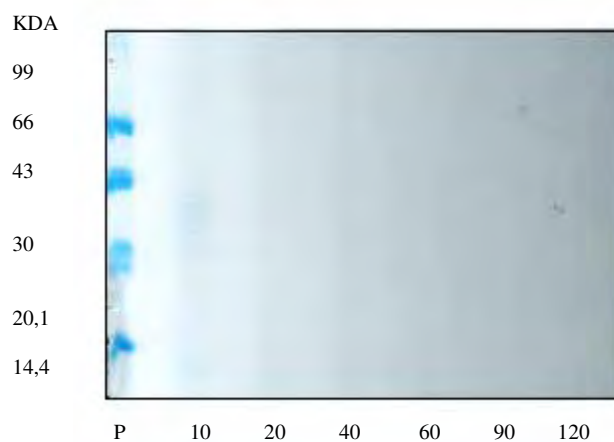


Figura 4. Eletroforese do padrão e do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 2) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação.

Embora sabendo que a mudança do pH para 9,5 iria inativar a pepsina, a desnaturação térmica da enzima foi realizada com o propósito de realizar uma inativação irreversível. No entanto, os resultados obtidos pela hidrólise de soro submetido à condição 3 (Figuras 5 e 6) indicam que a reação de ebulição, após 20 minutos, para inativar a pepsina para a adição posterior de outras enzimas no processo, não aumentou a eficiência na hidrólise das proteínas do soro, se comparado a condição 2, que foi realizado na mesma temperatura. A figura 5B mostra que os peptídeos hidrofóbicos ainda existem após o tempo de retenção de 20 minutos, em contraste ao observado na Figura 3B, porém, nenhuma proteína foi detectada (Figura 6).

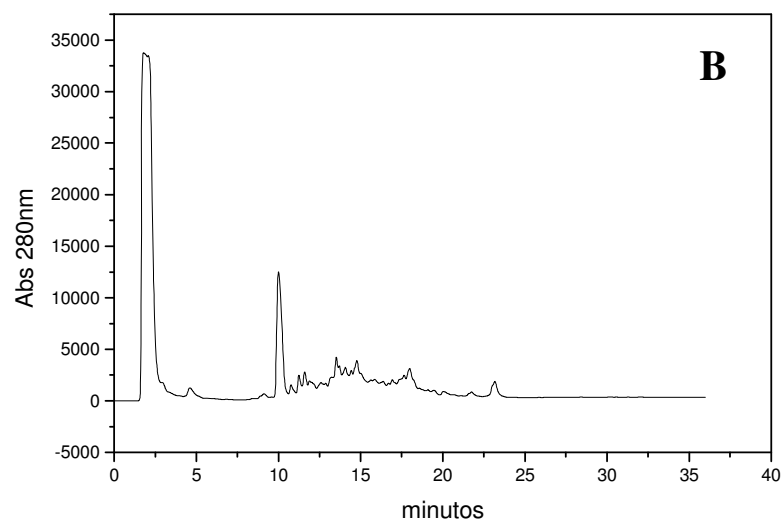
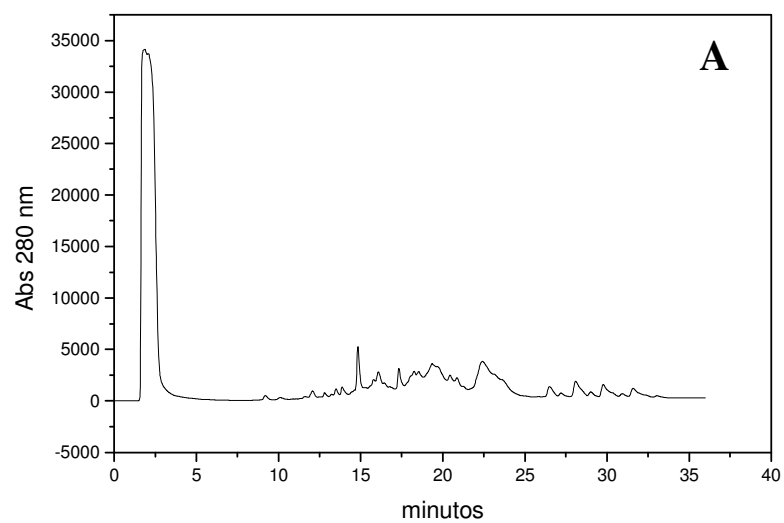


Figura 5. **A.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 3) no tempo de 40 minutos. **B.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 3) no tempo de 120 minutos.

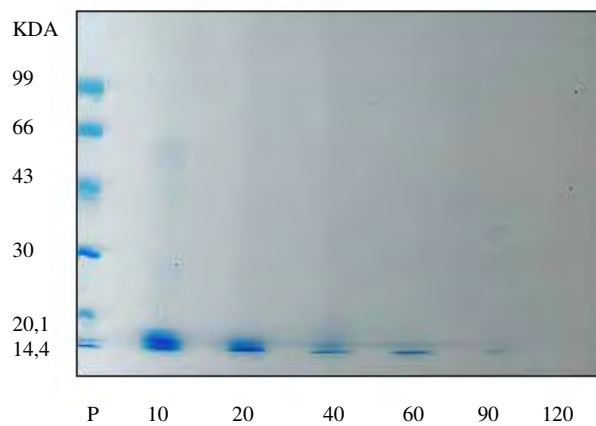


Figura 6. Eletroforese do padrão e do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 3) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação.

Os resultados obtidos nas condições 4 e 5, em que a diferença fundamental era a temperatura de hidrólise são apresentados nas Figuras 7 e 8 (condição 4), assim como nas 9 e 10 (condição 5). A hidrólise das proteínas do soro foi máxima quando o ensaio enzimático foi realizado a 50°C durante 120 minutos. Os resultados obtidos para o conteúdo de aminoácidos totais (Tabela 1) confirmam estes resultados.

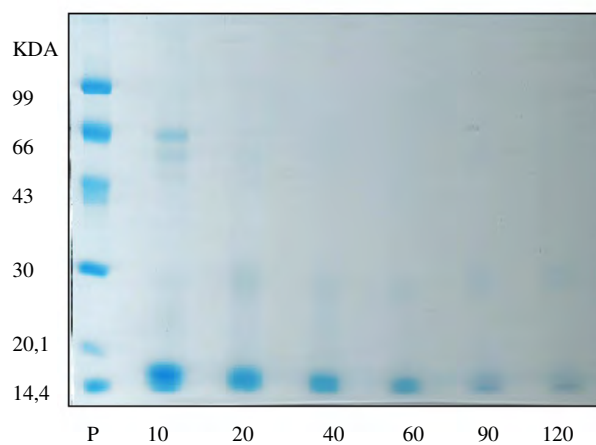


Figura 7. Eletroforese do padrão e do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 4) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação.

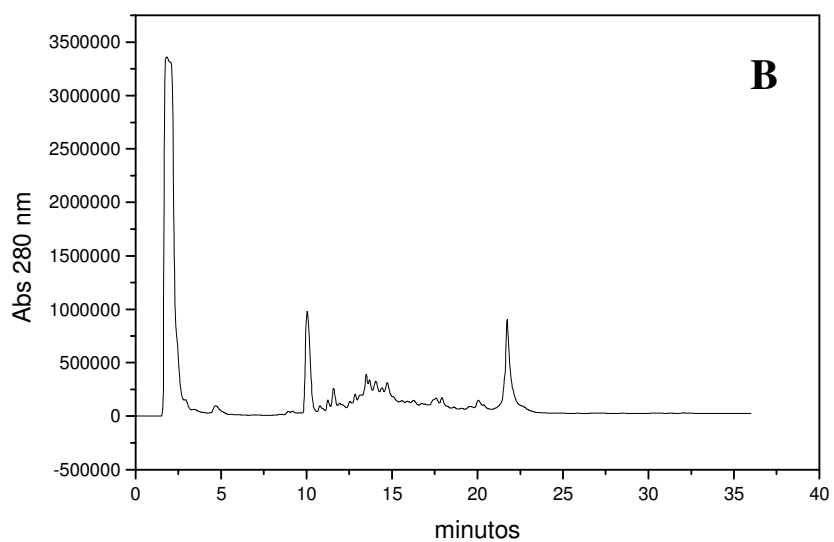
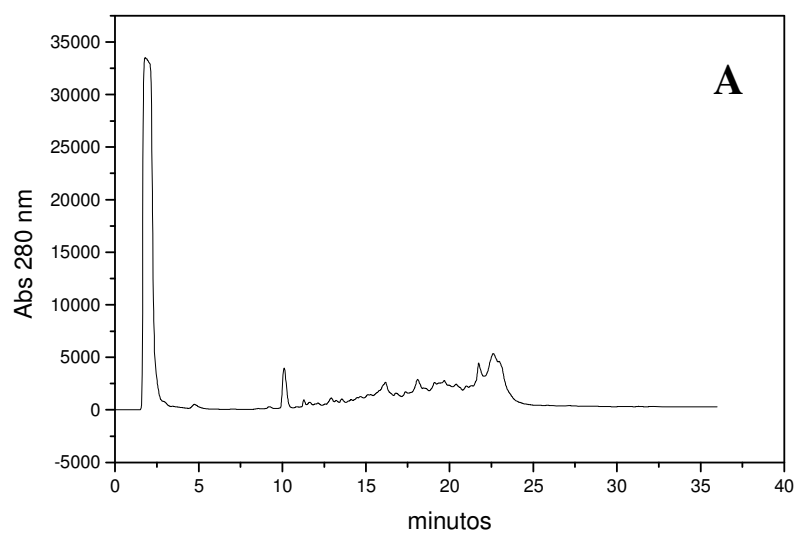


Figura 8. **A.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 4) no tempo de 40 minutos. **B.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 4) no tempo de 120 minutos.

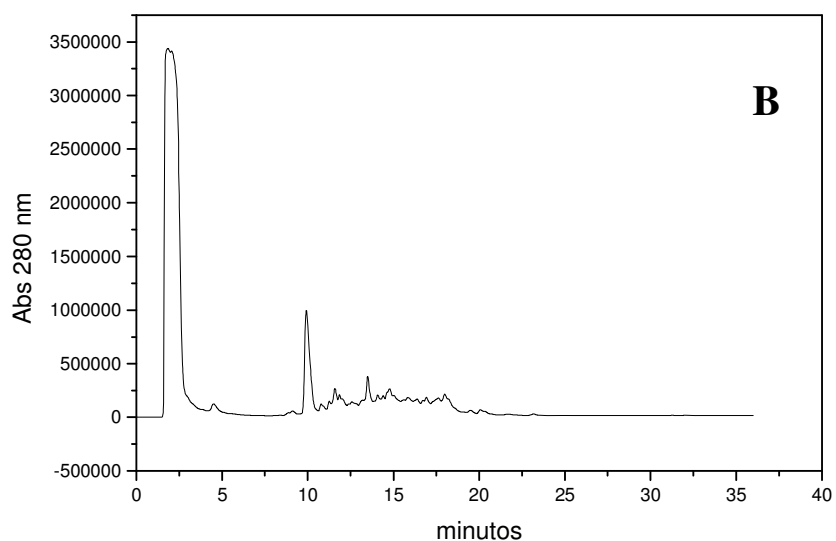
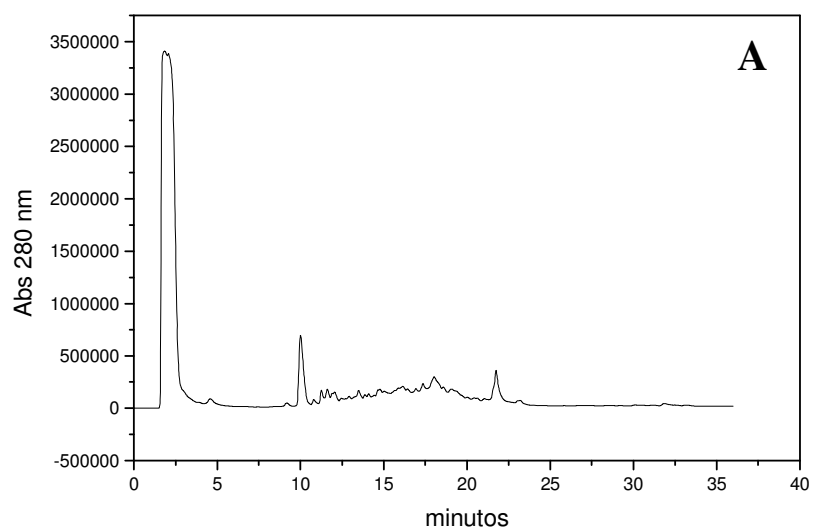


Figura 9. **A.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 5) no tempo de 40 minutos. **B.** CLAE do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 5) no tempo de 120 minutos.

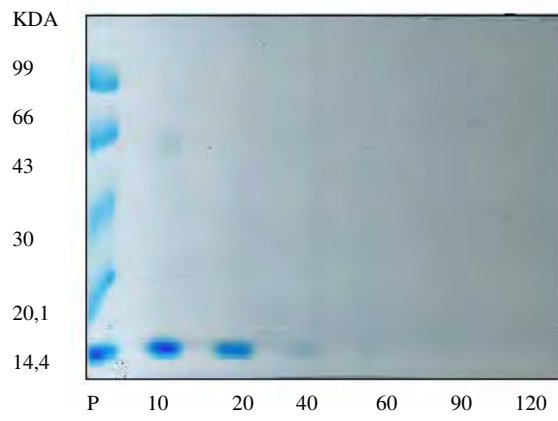


Figura 10. Eletroforese do padrão e do produto de hidrólise do soro de queijo (condição 5) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação.

Capítulo 2.

CAPÍTULO 2

Utilização de hidrolisado de proteínas do queijo bovino como suplemento nutricional para ratos idosos visando a minimização da sarcopenia.

INTRODUÇÃO

1. A sarcopenia em idosos e as pesquisas visando sua minimização

A musculatura esquelética constitui o maior tecido do corpo, compreendendo a maior massa celular e o maior componente protéico do organismo (MOUGIOS, 2006). A massa muscular é resultante do equilíbrio entre síntese (anabolismo) e catabolismo (destruição) de suas proteínas, principalmente as miofibrilares. A perda de massa muscular associada a prejuízos da função constitui entidade sindrômica denominada sarcopenia. A mais comum é a senil (MORLEY et al., 2001). A palavra sarcopenia, proveniente do grego significa “pobreza da carne” ou, cientificamente, perda degenerativa de massa e força nos músculos com o envelhecimento. Com o envelhecimento, a atrofia do músculo esquelético parece ser inevitável. A perda gradual das fibras musculares começa em cerca de 50 anos de idade e continua até os 80 anos quando nota-se a ausência de 50% delas.

Holloszki (1995) identificou possíveis mecanismos que poderiam conduzir à sarcopenia dentre eles, a redução de motoneurônios, das secreções hormonais (testosterona, DHEA (Dehidro- Epi- Androsterona), desnutrição e atrofia pelo estilo de vida sedentário.

De acordo com Novak (1972) os homens apresentam maior perda de massa muscular entre 41 e 60 anos de idade. Para ambos, seres humanos e ratos, a magnitude de perda é semelhante sugerindo que o mecanismo responsável pela sarcopenia seja o mesmo em ambos. O grau de atrofia vai depender não somente da alimentação do indivíduo, mas também, do tipo de atividade física executada pelo mesmo ao longo da vida e, logo após alcançar o período de início da perda (FAULKNER et al., 2007).

Vários autores sugerem a utilização de suplementos protéicos e a prática regular de atividade física no ganho de massa muscular (TONON, MELLO, DIAS & ANANRUMA (2001); HARAGUCHI, ABREU & PAULA (2006)). Pesquisas com idosos são um pouco mais escassas, apesar de existirem (KATSANOS, et al. (2008); KIM, WILSON & LEE

(2009)). Estudos com idosos utilizando a suplementação protéica independentemente da prática de atividade física regular são praticamente inexistentes. Além disso, os estudos existentes, não definem uma quantidade fixa para a ingestão desse suplemento pelos idosos sem que haja dano aos rins e outros órgãos inerentes ao metabolismo de proteínas.

Com base em estudos realizados pelo Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging localizado na Universidade Tufts, cujos resultados apontam que uma ingestão de proteína num nível de 1,0g/Kg peso/dia poderia fornecer um melhor balanço de nitrogênio e não provocaria alterações orgânicas aos indivíduos idosos (CAMPBELL et al., 1994) e, sabendo que originalmente os indivíduos em idade idosa de acordo com a DRI (DIETARY REFERENCE INTAKES, 2006) devem ingerir diariamente 0,8 g de proteína/Kg peso/dia, delimitou-se a pesquisa aqui apresentada.

Um importante dado que foi considerado para determinar o tipo de proteína a ser oferecida como suplementação para os ratos idosos, que apresentam uma taxa de absorção diminuída devido a alterações fisiológicas inerentes à senilidade, foi que o comprimento da cadeia dos peptídeos influencia sua taxa de absorção (GUADIX, 2000). Além disso, diversos trabalhos relatam que fórmulas contendo oligopeptídeos, especialmente di- e tripeptídeos, possuem maior valor nutricional do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou proteínas intactas (FRENHANI, 1999).

Com base na introdução aqui apresentada e, tendo como objetivo principal a minimização da perda de massa muscular (sarcopenia), ratos em idade avançada foram submetidos à suplementação com 0,2g prot/Kg peso/dia com proteínas e hidrolisados das proteínas do soro de queijo para sobrepor a ingestão de 0,8g prot/Kg peso/dia administrados pela ração. Nenhum dos animais foi exposto à atividade física, pois o intuito era observar se por si só o suplemento poderia exercer efeito benéfico na minimização da sarcopenia e consequentemente em alterações relacionadas a ela. A intenção de comparar três grupos suplementados (G2: proteína sem hidrólise; G3: proteína parcialmente hidrolisada e G4: proteína com 90% de hidrólise) era comprovar que os resultados obtidos, poderiam ser melhores naquele grupo suplementado com o soro hidrolisado parcialmente (suplemento contendo oligopeptídeos, di e tripeptídeos) do que nos demais, pois, neste grupo as proteínas ingeridas poderiam ser mais bem absorvidas favorecendo o estado nutricional.

OBJETIVOS

1. Geral

- Observar se a suplementação de 0,2g/ Kg peso/dia com proteínas de soro de queijo e hidrolisados (soros submetidos às condições de hidrólise 3 e 5 respectivamente, apresentadas no Capítulo 1), poderia minimizar a perda de massa muscular em ratos idosos.

2. Específicos

- Comparar através de exames bioquímicos (glicose, colesterol total, triglicerídeos, HDL, TGO, TGP, uréia, creatinina, cálcio sérico), massa corporal (peso), massa (peso) dos músculos (soleus, EDL e tibial), massa do fêmur, conteúdo protéico muscular (músculo gastrocnêmio) e conteúdo de cálcio ósseo, os efeitos de 3 diferentes suplementos de proteínas do soro de queijo (sem hidrólise, com hidrólise parcial e com hidrólise quase total das proteínas) na minimização da sarcopenia em ratos idosos;

- Observar uma melhor capacidade na minimização da sarcopenia no grupo suplementado por proteínas do soro de queijo parcialmente hidrolisadas (hidrolisado obtido através da condição de reação de hidrólise 3).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

1. Animais

Os ratos wistar do sexo masculino, de padrão sanitário convencional, com idade de 40 dias e peso aproximado de 200g foram adquiridos do biotério da UNESP- Campus Botucatu.

2. Ração

A ração utilizada no período de crescimento e envelhecimento dos animais (40 dias a 15 meses de idade) foi a Labina, marca Purina. Já a ração utilizada no período de experimentação, compreendido por 43 dias, balanceada de forma a fornecer 0,8g/prot/Kg peso/dia (440mg de proteína/20g de ração) e demais nutrientes de acordo com a Recomendação AIN 93 M, foi fornecida pela empresa Prag Soluções LTDA.

3. Suplementação

A suplementação foi produzida no Laboratório de Enzimologia conforme descrito no primeiro capítulo da presente tese.

MÉTODOS

1. Análise do protocolo experimental pelo comitê de ética

O projeto para experimentação com animais de laboratório foi submetido à análise e parecer pelo comitê de ética, devidamente registrado nesta Universidade. Após o aceite o

projeto foi colocado em execução (Anexo 1). Todas as condições a que seriam submetidos os animais foram previamente estudadas e respaldadas em literatura pertinente.

2. Criação dos animais

Os ratos wistar, adquiridos do Biotério de Botucatu, foram criados até a idade de 15 meses, considerada de acordo com diversos autores (Meneguello e Costa Rosa (2002); Mardon et al. (2008); Medeiros et al. (2003)) como idade avançada (\pm 60 anos), para então, serem iniciados os experimentos de suplementação.

É importante ressaltar que os biotérios fornecedores não criam animais até que atinjam a idade avançada. Este é um dos principais entraves na experimentação com animais idosos. Além de apresentarem-se caros para o pesquisador, os animais exigem cuidados diários, inclusive aos finais de semanas, feriados e dias festivos, o que acaba demandando várias horas de mão de obra especializada do pesquisador em período pré- experimental. É importante ressaltar também que tendo em vista que os animais fornecidos chegaram à Universidade com 40 dias de idade, o período de pré-experimentação foi, portanto, de 13,5 meses; isto é, mais de um ano.

Os biotérios existentes nas Universidades geralmente possuem grande rotatividade de experimentos, portanto, é difícil encontrar um local para criar animais por tanto tempo. Um outro ponto a ser ponderado é a grande variabilidade no peso que ocorre em animais criados por longo período. Mesmo iniciando a criação com animais de peso praticamente igual (variabilidade máxima de 5g) durante o período de criação, os animais apresentam-se diversamente com relação ao peso. Existem aqueles que se desenvolvem menos e aqueles mais o que é normal em uma população. Então, para que tenhamos no início experimental um grupo de 10 animais com uma homogeneidade variando em no máximo 5%, temos que criar uma quantidade de 15 animais. Esta variabilidade de peso pode ser vista como um problema para uma pesquisa que visa um refinamento experimental e uma análise estatística de dados para comprovação de resultados. Para minimizar esses efeitos seria provavelmente necessária a criação de um número de animais muito superior ao número amostral a ser adotado. Porém, isto incorreria em mais procura por espaço, dinheiro além da geração de excedente de animais sem destino.

Durante os 4 primeiros meses de criação, os animais foram mantidos em grupos de 4 animais por caixa plástica contentora de polipropileno medindo 41 x 34 x 16 cm (CxLxA) dotada de grade com cocho próprio para a colocação de ração e apoio para bebedouro conforme demonstra a foto abaixo (Foto 1.). A temperatura ambiente foi ajustada para $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa para 60%.

As caixas dos animais, identificadas, eram organizadas no biotério em estantes devidamente apropriadas para tal finalidade (Foto 2.).



Foto 1. Caixa para contenção de animais utilizada nos experimentos.



Foto 2. Estantes contendo as caixas com os animais.

A cada dois dias as caixas plásticas eram lavadas com detergente neutro, enxaguadas, desinfetadas com Lysoform e secas. Após o processo de limpeza as caixas eram forradas com maravalha (serragem) na espessura de ± 5 cm para favorecer o conforto dos animais. Diariamente colocava-se ração e trocavam-se as águas dos bebedouros. A quantidade de ração e água era *ad libitum*.

A partir do 5º mês de idade, os animais que agora estavam na puberdade, começaram a apresentar comportamento agressivo; então, houve a necessidade de separação dos animais em caixas individuais para evitar mutilação. Os cronogramas de limpeza foram mantidos até o final do período de experimentação.

3. Estabelecimento da amostra e grupos experimentais

Para estabelecer o tamanho da amostra para os experimentos, utilizou-se como critério a análise da curva de Gauss que define que dentro de uma amostra a maioria responde à normalidade (média) e a minoria aos desvios (desvio padrão). Dentro de uma curva normal podem existir animais que correspondam aos desvios (máximo 2 desvios padrões para cima ou para baixo). Por esse motivo, se a amostra escolhida for de 10 animais, ainda que nesta população existam animais que não correspondam à normalidade, temos entre 6 e 7 animais para comprovar os resultados. Esse *n* (número amostral) é considerado aceitável pela comunidade científica (SAMPAIO, 2005). A partir destas ponderações definiu-se então como 10 o número de animais por grupo.

Os animais de 15 meses de idade foram pesados 15 dias antes do início do experimento e divididos em 4 grupos experimentais de 10 animais. O peso dos animais por grupo foi em média 550g com uma variação de 5% para cima e para baixo.

Como dito anteriormente, 4 grupos experimentais foram formados:

Grupo 1: Grupo controle. Este grupo recebeu diariamente ração e água à vontade (G1)

Grupo 2: Grupo suplementado com proteínas do soro sem hidrólise (G2). Grupo alimentado com ração + suplemento de proteína do soro de queijo.

Grupo 3: Grupo suplementado com proteínas do soro que sofreram hidrólise parcial (G3). Grupo alimentado com ração + suplemento de proteína do soro hidrolisada parcialmente.

Grupo 4: Grupo suplementado com proteínas do soro que sofreram hidrólise acima de 90% (G4). Grupo alimentado com ração + suplemento de proteínas do soro hidrolisadas quase totalmente.

Todos os grupos experimentais receberam água a vontade, porém, a quantidade ingerida era anotada diariamente.

Os hidrolisados administrados foram produzidos conforme descrito no 1º capítulo da presente tese. O grupo 3 foi suplementado por soro submetido à condição de hidrólise definida como 3 e, o grupo 4, pelo soro submetido à condição de hidrólise 5.

4. Metodologia aplicada na administração do suplemento alimentar

Como metodologia propôs-se a princípio a suplementação por gavagem, mas, devido a idade dos animais encontrar-se avançada, o peso dos animais dificultar sua contenção durante a administração do suplemento e, pensando-se em preservar a qualidade de vida dos animais e evitar o estresse, vários ensaios foram realizados com o intuito de se encontrar um novo método para a administração da suplementação.

O melhor método encontrado para assim fazê-lo foi embeber um pedaço de 1,7g de ração comercial da marca Labina com o suplemento a ser administrado. Para evitar erros, administrou-se também ao grupo controle um pedaço de ração embebido com a mesma quantidade em mL que para o suplemento, só que com água (placebo). É importante salientar que, devido o soro apresentar cheiro de queijo, os animais, logo que esse era colocado na gaiola, o comiam prontamente. O suplemento foi administrado pela manhã (por volta das 11:00 horas) e sua ingestão era acompanhada atentamente. A ração colocada no dia anterior, não ingerida por algum animal, era retirada anteriormente à colocação do suplemento. Nova carga de ração era colocada diariamente em cada gaiola no início da tarde (13:00 horas).

As fotos abaixo (3, 4, 5 e 6) demonstram o processo de administração de suplemento aos animais.



Foto 3. Injeção do suplemento à ração para posterior administração aos animais.



Foto 4. Colocação do suplemento na gaiola.



Foto 5. Ingestão da suplementação pelo animal.



Foto 6: Finalização da ingestão da suplementação pelo animal.

5. Determinação da quantidade de ração e suplemento a serem administrados diariamente

Anteriormente ao período de experimentação, realizou-se por 20 dias análise do consumo médio diário de ração pelos animais. Este estudo foi realizado para determinação da quantidade diária de ração a ser formulada e oferecida aos animais durante o experimento. Chegou-se a conclusão que a quantidade de ração diária a ser oferecida deveria ser de 20g. Com base neste valor, entrou-se em contato com a empresa produtora de ração para que esta inserisse nestes 20 g, 440mg de proteína, isto é, o equivalente a 0,8g de proteína/ Kg peso dos animais (550g). Os demais nutrientes foram ajustados de forma a manterem-se em proporção recomendada pela AIN 93M para ingestão diária dos animais.

Os suplementos, previamente preparados, concentrados e congelados foram calculados de forma a fornecerem os demais 0,2g/prot/Kgpeso/dia por animal ou, 110mg de proteína. Sabendo-se que os suplementos haviam sido concentrados 20 vezes por liofilização e que a quantidade inicial de proteínas neste soro era de 6mg/mL, calculou-se em mL a quantidade de suplemento a ser administrado. A quantidade calculada foi de 0,92mL/dia.

6. Período de experimentação

Quinze dias antes do início do período experimental, os animais foram pesados e separados em 4 grupos de 10 animais conforme descrito anteriormente no item 3. Estes animais que anteriormente recebiam ração e água *ad libitum*, começaram a receber a porção

diária de 20 g da ração formulada para normalização do metabolismo e calibração de ingestão diária de alimentação. A ingestão de água também foi apontada diariamente.

Após estes 15 primeiros dias, iniciou-se o período de suplementação para o grupo 2. No dia seguinte iniciou-se a suplementação para os grupos 3 e 4 respectivamente. Este intervalo de dias para o início da suplementação foi proposital, pois, o sacrifício dos animais seria agendado para dias diferentes: grupos 1 e 2 (segunda-feira) e grupos 3 e 4 (terça-feira). Diariamente administrava-se a ração e suplementação e a quantidade de água ingerida era anotada. A cada dois dias os pesos dos animais eram tomados.

O experimento desenvolveu-se por 43 dias. Procurou-se então determinar um período que significasse ao menos 6 meses de ingestão do suplemento. Escolheu-se desta forma o tempo de 43 dias de suplementação.

No dia anterior ao sacrifício, os animais foram deixados em jejum para evitar possíveis contaminações durante o período de sacrifício.

7. Sacrifício dos animais

Após o período de 43 dias os animais foram sacrificados por decapitação após terem sido mantidos por 12 horas em jejum. De acordo com Conlee et al. (2005), a decapitação produz uma rápida perda de consciência (3-6 segundos) perda essa, considerada mais rápida do que quando utilizado o CO₂. Deve-se considerar, porém, o impacto adverso do animal durante o processo de manejo até a execução.

Ainda de acordo com o mesmo autor a indicação de eutanásia por CO₂ só é realizada quando pode-se utilizar como coadjuvante do processo anestesia, que no caso de roedores poderia ser: isoflurano, halotano e metoxiflurano.

Em especial nessa pesquisa, a utilização de anestésicos não é recomendada, uma vez que pretende-se após a eutanásia, realizar várias análises sanguíneas e análise do conteúdo protéico do músculo gastrocnêmio. A anestesia poderia alterar resultados sanguíneos. Além disso, o volume de sangue a ser extraído para a realização de todas as análises a que se pretendia só seria alcançado com a decapitação.

8. Extração de sangue e peças a serem analisadas

Após a decapitação os animais foram submetidos a exsanguinação. O sangue foi coletado em tubos da marca Vacuette® Heparinizados e prontamente centrifugados por 10 minutos a 2000 rpm. Após a centrifugação, o soro foi transferido para tubos estéreis e estes foram armazenados a 4°C até o momento das análises (5 horas após).

Retirado o sangue, o animal passou pela extração das peças. Foram extraídos: músculos soleus, EDL, tibial (pata esquerda) e gastrocnêmio (pata direita e esquerda), fêmur (direito e esquerdo) e fígado. Todas as peças, após serem extraídas foram passadas em solução fisiológica de NaCl (0,9%) para retirada de sangue e pêlos e pesadas. Um dos ossos (fêmur), um músculo gastrocnêmio e o fígado dos animais foram armazenados em solução de formol para posterior análise histológica. As demais peças foram embrulhadas em papel alumínio e congeladas até o momento das análises.

As fotos abaixo demonstram a equipe envolvida no processo de extração das peças, uma das peças extraídas e o processo de pesagem e identificação das peças. É importante frisar que para a correta extração dos músculos, dois componentes da equipe foram treinados na faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O treinamento, além de minimizar perdas, garante a correta extração da peça.



Foto 7. Equipe trabalhando na extração das peças dos animais envolvidos na pesquisa.



Foto 8. Músculo gastrocnêmio direito extraído de um dos animais.



Foto 9. Bancada de pesagem e identificação das peças extraídas.

9. Análise sanguínea

As análises sanguíneas foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual Paulista UNESP- Araraquara. Todas as análises foram realizadas de acordo com protocolos utilizados por esse Laboratório referência em análises clínicas. Os resultados obtidos com as análises foram impressos pelo Laboratório e entregues ao pesquisador para posterior análise de dados.

As análises sanguíneas realizadas no presente estudo foram: glicose jejum, colesterol total, HDL, triglicerídeos, TGO e TGP, creatinina, uréia e cálcio sérico.

10. Análise da massa muscular (peso) e massa do fêmur

Os músculos, Tibial, EDL e Soleus, congelados, foram pesados e levados à estufa com temperatura constante de 37°C. A cada 5 horas os músculos eram pesados até atingirem peso constante. Ao final de 4 dias o peso dos músculos era constante, então, tomou-se este dado como peso ou massa para cada um dos músculos.

Assim como os músculos, os ossos femurais foram secos a 37°C até peso constante. Após este período estes foram calcinados em bico de bunsen e, colocados em cadinhos devidamente desengordurados, secos e tarados. Os cadinhos foram levados à mufla cuja temperatura foi ajustada à 600°C para incineração até cinzas, por 24 horas. Após este período os cadinhos foram resfriados e pesados para obtenção da quantidade de cinzas. As cinzas obtidas foram armazenadas para posterior ensaio de cálcio ósseo por absorção atômica.

11. Análise de cálcio ósseo

Cerca de 50 mg das cinzas resultantes de incineração do fêmur foram dispersas em 2 mL de ácido clorídrico concentrado (E. Merck PA, 32%, $d = 1,19$, Alemanha) e quantitativamente transferidas para balão volumétrico de 100 mL, ajustando-se o volume com água deionizada. Uma alíquota de 2 mL da amostra diluída na razão de 1:10 foi misturada a 6 mL de cloreto de lantânio 0,2% (Vetec, Brasil), homogeneizada e analisada em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer 3110, E.U.A.). Cálculos foram realizados a fim de se estimar a quantidade de cálcio por g de cinza. Os dados obtidos foram apresentados em gráfico (mg de cálcio/ g de cinza).

12. Análise de proteína do músculo gastrocnêmio

200mg do músculo gastrocnêmio extraídos da pata direita de cada animal foram digeridos com 1mL de ácido perclórico por 1h sob fervura. Após este período, o produto da digestão foi centrifugado em 2560 rpm por 10 min e o sobrenadante obtido foi então diluído 50 vezes e analisado em λ 260nm para determinação do conteúdo de proteína. Os dados obtidos foram apresentados em gráfico (mg de proteína/ 100mg de músculo).

13. Análise estatística de dados

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística. O software utilizado para a avaliação dos resultados foi o “GraphPad Prism 5 for Windows” (GraphPad Software Inc., EUA). A análise iniciou-se pelo teste de Shapiro-Wilk. Todos os parâmetros estudados obedeceram à normalidade. Utilizou-se então a análise de variância – ANOVA – seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, para comparações entre os grupos. Uma segunda análise foi realizada utilizando-se o teste de comparação múltipla de Dunnett. Este teste comparou todos os grupos suplementados em relação ao controle. O nível de significância adotado foi de 0.05. Os dados foram representados pela média \pm desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela abaixo (Tabela 1.) apresenta os resultados obtidos na análise de ganho de peso, massa muscular e massa óssea dos animais.

Tabela 1. Análise de ganho de peso, massa muscular e massa óssea dos animais.

Parâmetros analisados	Grupos			
	G1 (controle)	G2 (suplem. sem hidrólise)	G3 (suplem. hidrólise parcial)	G4 (suplem. hidrólise de 90%)
Peso final (g)	581 ± 58 a a	602 ± 32 a a	591 ± 32 a a	601 ± 48 a a
Massa soleus (g)	0,07 ± 0 a a	0,06 ± 0 a a	0,07 ± 0 a a	0,07 ± 0 a a
Massa tibial (g)	0,25 ± 0 a a	0,26 ± 0 a a	0,26 ± 0 a a	0,25 ± 0 a a
Massa EDL (g)	0,05 ± 0 a a	0,05 ± 0 a a	0,06 ± 0 a a	0,06 ± 0 a a
Proteína muscular (mg prof/100g músc.)	2,42 ± 0,4 a a	4,52 ± 0,4 b b	6,33 ± 0,4 c c	4,50 ± 0,3 b b
Cinzas do fêmur (g)	0,63 ± 0 a a	0,64 ± 0 a a	0,65 ± 0 a a	0,62 ± 0 a a
Dosagem de cálcio ósseo (mg cálcio/g cinzas)	328,75 ± 14 a a	467 ± 20 b b	498,87 ± 6 c c	476,87 ± 10 b b

Valores apresentados por média e desvio padrão (±).

Valores com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si (p<0.05)

Valores analisados por Teste de Bonferroni e Teste de Dunnnett respectivamente

Os dados analisados e apresentados na Tabela 1., indicam que houve diferença significativa para maior na dosagem de proteína muscular dos três grupos suplementados (G2, G3 e G4) em relação ao controle. Os grupos 2 e 4 não apresentaram diferença significativa entre si para a dosagem de proteína muscular. Porém, o grupo 3 diferiu significativamente dos grupos 2 e 4, indicando que neste grupo, houve um maior incremento da massa muscular em relação a todos os demais grupos.

O mesmo pode ser observado na dosagem de cálcio ósseo. Todos os animais dos grupos suplementados apresentaram quantidade de cálcio ósseo significativamente ($p < 0.05$) maior em relação ao controle. Os grupos suplementados 2 e 4 não tiveram seus resultados diferindo significativamente entre si em $p < 0.05$, porém, o grupo 2 teve quantidade significativamente maior de cálcio ósseo comparado aos grupos 2 e 4.

As demais análises realizadas não demonstraram diferença significativa entre si. É importante lembrar que diversos trabalhos relatam que fórmulas contendo oligopeptídeos, especialmente di- e tripeptídeos, possuem maior valor nutricional do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou proteínas intactas (FRENHANI, 1999). Esta afirmação nos permite discutir e entender porque o grupo que recebeu o suplemento parcialmente hidrolisado (G3) obteve melhores resultados na análise de massa muscular e massa óssea em relação aos demais grupos.

As figuras (gráficos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) abaixo demonstram os resultados compilados na tabela acima de forma gráfica.

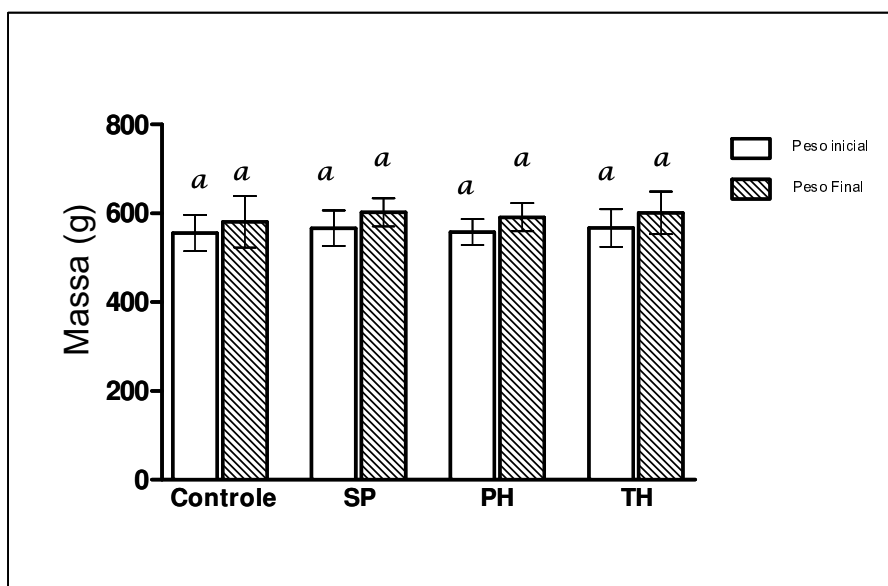


Figura 1. Gráfico de peso inicial (pré-experimento) e final (dia antecedente ao sacrifício) médio dos animais.

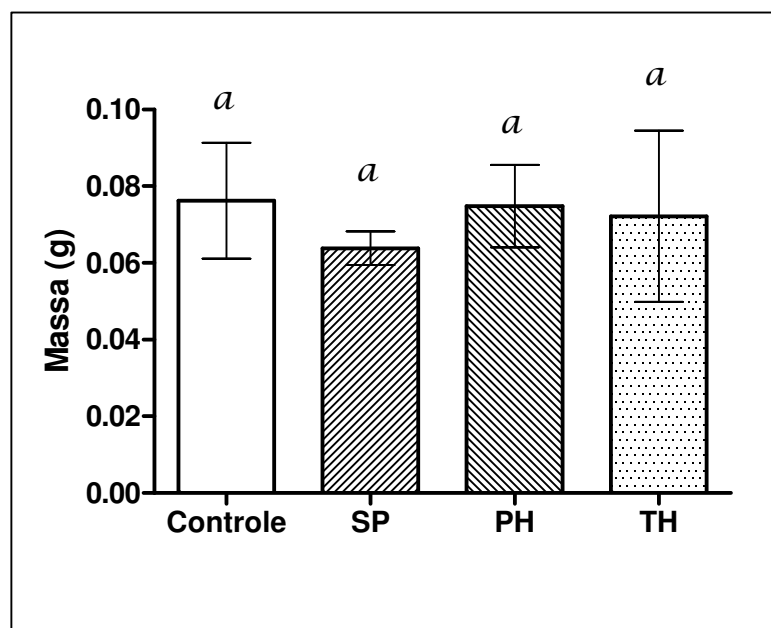


Figura 2. Gráfico da massa seca média (g) do músculo soleus dos animais.

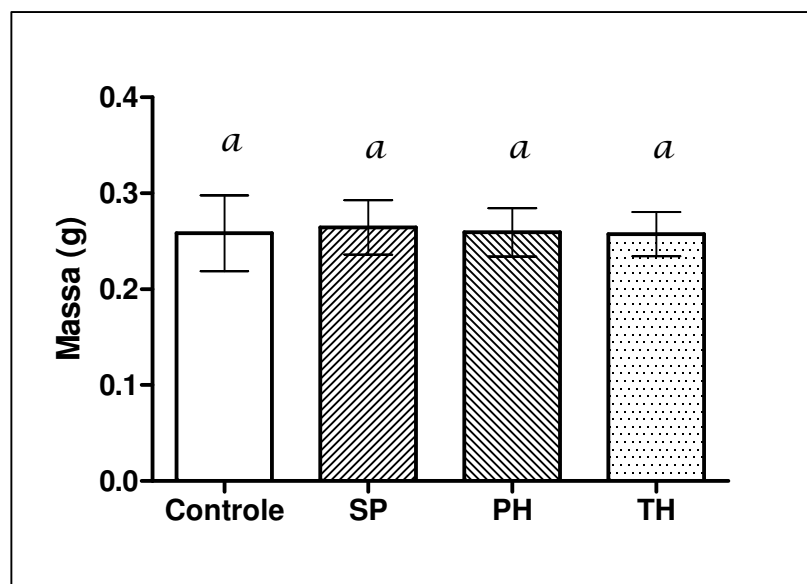


Figura 3. Gráfico da massa seca média (g) do músculo tibial dos animais.

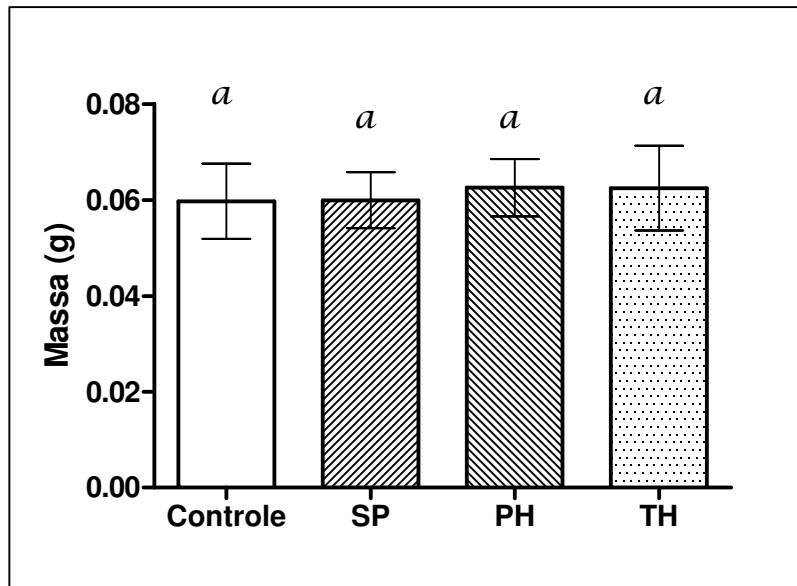


Figura 4. Gráfico da massa seca média (g) do músculo EDL dos animais.

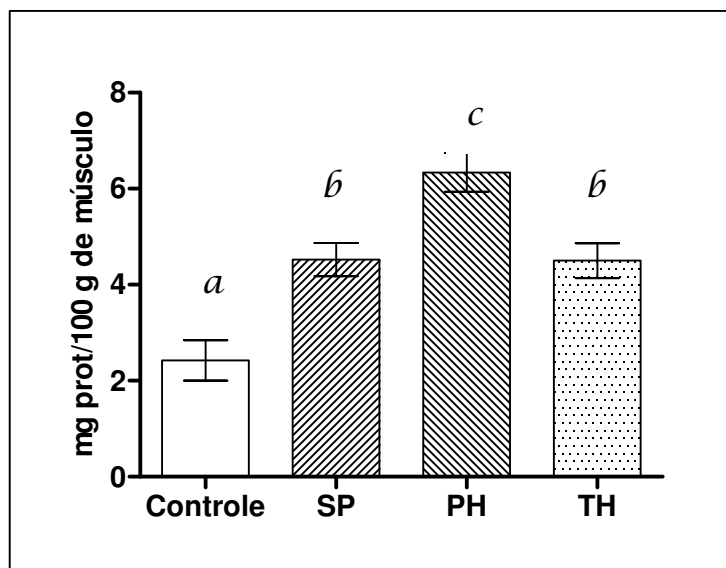


Figura 5. Gráfico da média da dosagem de proteína do músculo gastrocnêmio (mg proteína/100g de músculo) dos animais.

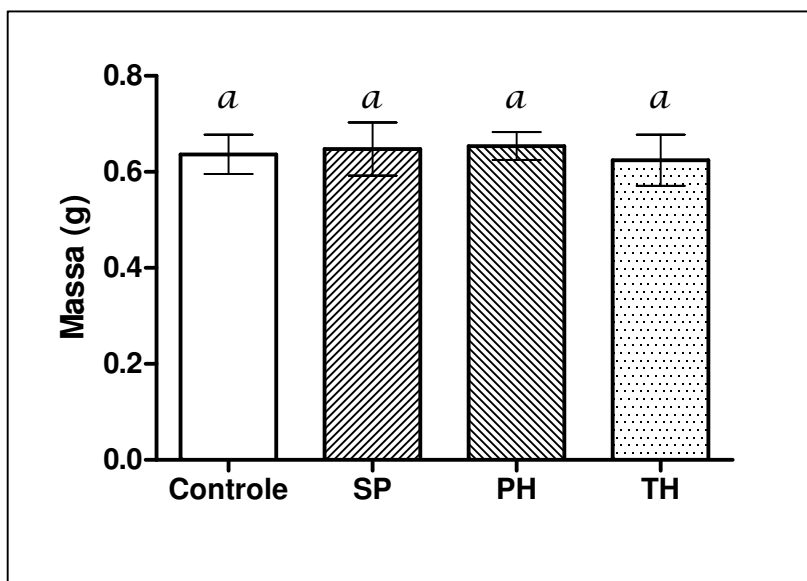


Figura 6. Gráfico da massa média (g) das cinzas do fêmur dos animais.

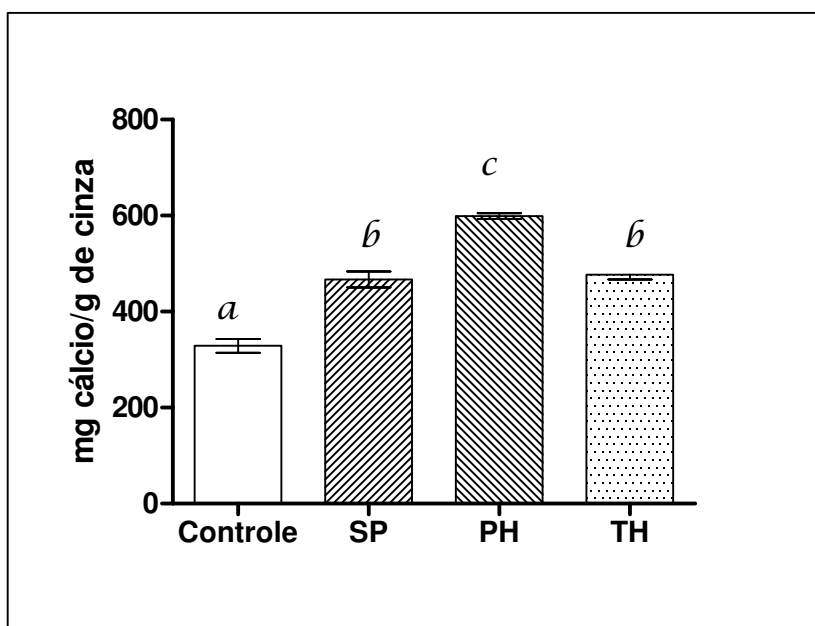


Figura 7. Gráfico da média da dosagem de cálcio ósseo (mg cálcio/g de cinza) dos animais.

Tabela 2. Análise dos resultados obtidos nas dosagens sanguíneas de glicemia, colesterol, triglicerídeos, HDL, TGO, TGP, uréia, creatinina e cálcio sérico dos animais.

Parâmetros analisados	Grupos			
	G1 (controle)	G2 (suplem. sem hidrólise)	G3 (suplem. hidrólise parcial)	G4 (suplem. hidrólise de 90 %)
Glicemia (mg/dL)	132,37 ± 9 a a	139,5 ± 14 a a	147,25 ± 11 a a	142,37 ± 18 a a
Colesterol (mg/dL)	90,12 ± 17 a a	114,12 ± 36 a a	105,12 ± 35 a a	97 ± 27 a a
Triglicerídeos (mg/dL)	212,62 ± 69 a a	170,37 ± 67 b a	177,12 ± 60 b a	242,37 ± 82 a a
HDL (mg/dL)	36 ± 6 a a	39,87 ± 10 a a	40,62 ± 5 a a	38,25 ± 9 a a
TGO (U/l)	215,12 ± 52 a a	189,5 ± 54 a a	157 ± 31 a a	190,12 ± 99 a a
TGP (U/l)	71,12 ± 28 a a	69,12 ± 29 a a	50,62 ± 20 a a	52,12 ± 16 a a
Uréia (mg/dL)	29,5 ± 3 a a	35,75 ± 16 a a	31,87 ± 6 a a	30,37 ± 4 a a
Creatinina (mg/dL)	0,58 ± 0 a a	0,72 ± 0,1 b b	0,6 ± 0 a a	0,55 ± 0 a a
Cálcio sérico (mg/dL)	10,06 ± 0,5 a a	10,5 ± 0,5 a a	11,65 ± 0,8 b b	10,42 ± 0,9 a a

Valores apresentados por média e desvio padrão (±).
Valores com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si (p<0.05)
Valores analisados por Teste de Bonferroni e Teste de Duncan respectivamente

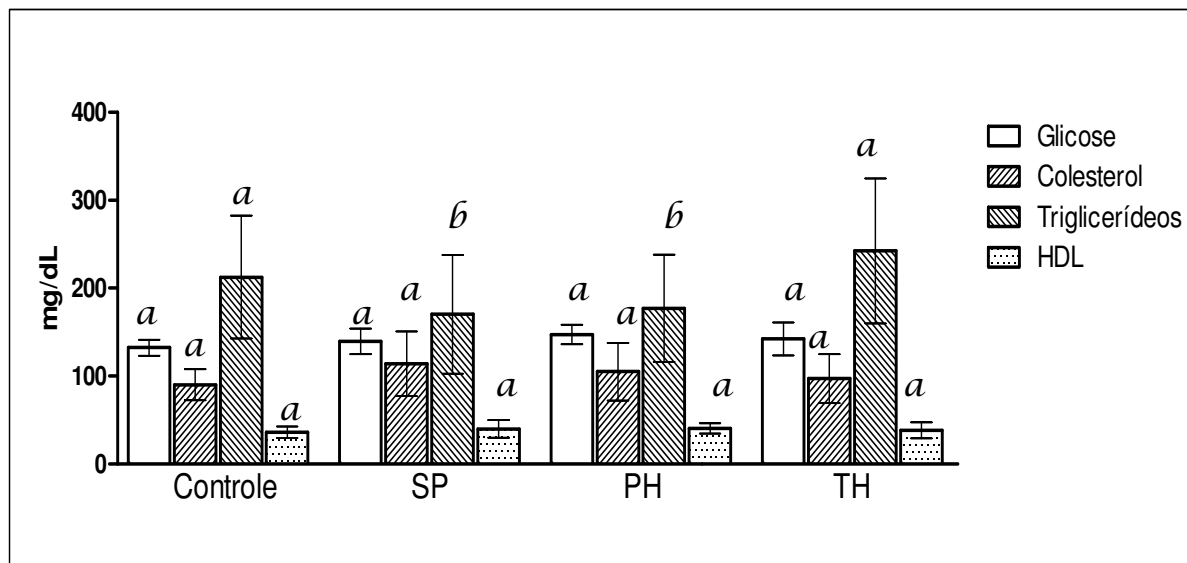


Figura 8. Gráfico da média da dosagem de glicose, colesterol, triglicerídeos e HDL (mg/dL) dos animais.

Os valores acima apresentados em forma de tabela (Tabela 2.) e gráfico (Figuras 8.) demonstram que, houve diferença significativa ao aplicar o Teste de análise múltipla Bonferroni nas análises de triglicerídeos entre os grupos 2 e 4 e 3 e 4. Os grupos 2 e 3 apresentaram quantidade significativamente inferior de triglicerídeos em relação ao grupo 4 e uma tendência, não representada significativamente, menor na quantidade de triglicerídeos em relação ao controle. A menor quantidade de triglicerídeos encontrada nos grupos suplementados 2 e 3 pode sugerir uma melhora no metabolismo de gorduras nestes grupos, principalmente, no grupo suplementado pelo hidrolisado parcial (G3) que apresentou menor média. Os altos níveis de triglicerídeos na corrente sanguínea podem ser relacionados ao aparecimento de dislipidemia e, conseqüentemente, complicações associadas a ela como: arterosclerose, risco aumentado de doença cardíaca e infarto (SCHIAVO, LUNARDELLI & OLIVEIRA, 2003).

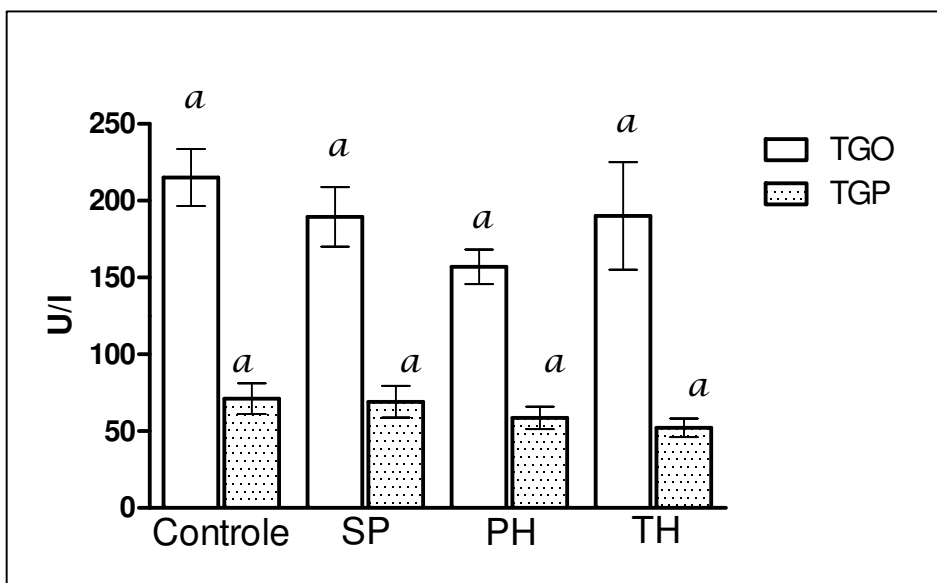


Figura 9. Gráfico da média da dosagem de TGO (aminotransferase glutâmico-oxalacética) e TGP (aminotransferase glutâmico- pirúvica) (U/I) dos animais.

As análises dos valores encontrados para glicemia, colesterol total, HDL (Tabela 2 e Fig. 8), TGO e TGP (Tabela 2 e Fig. 9) não diferiram significativamente entre si e nem em relação ao controle.

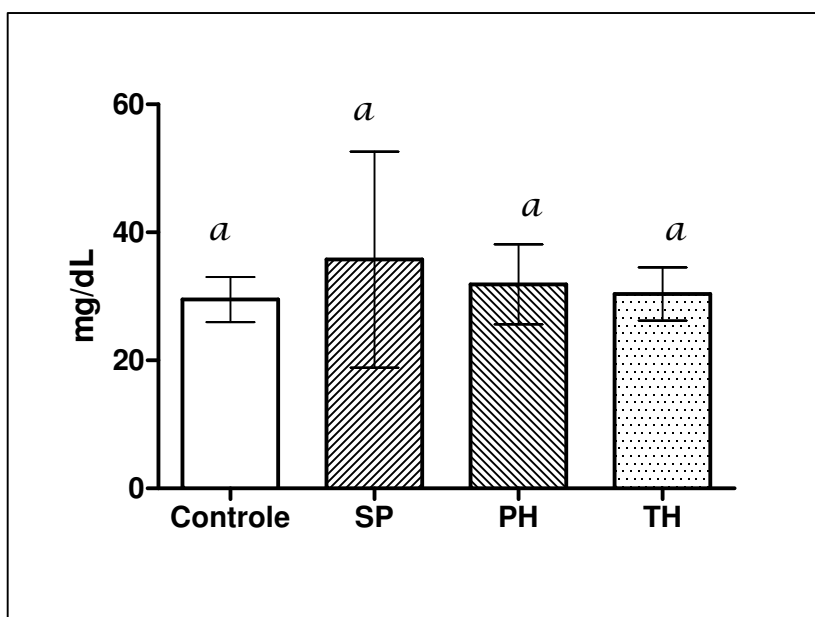


Figura 10. Gráfico da média da dosagem de uréia (mg/dL) dos animais.

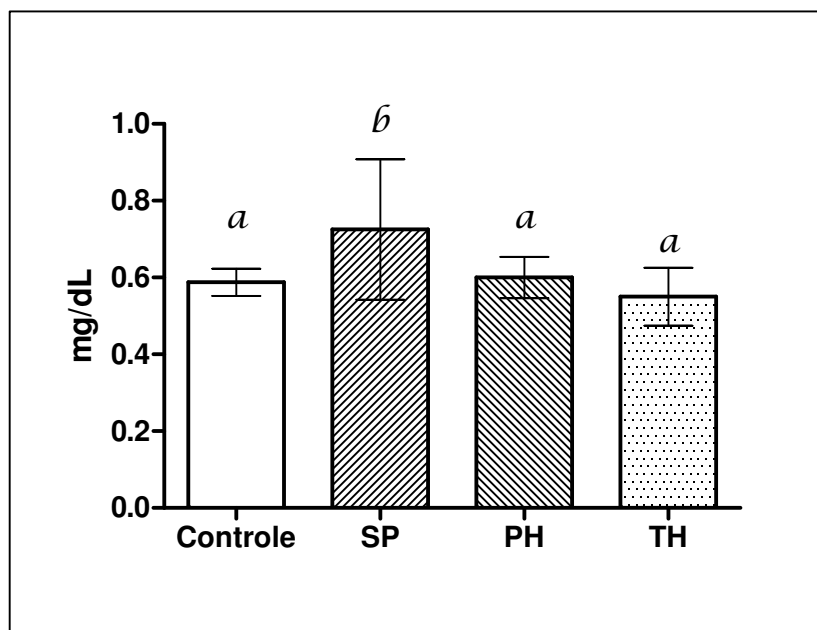


Figura 11. Gráfico da média da dosagem de creatinina (mg/dL) dos animais.

Os resultados representados na Tabela 2 e Figura 10 para as análises de uréia indicam que, não houve diferença significativa entre os grupos. A uréia é o principal produto terminal do metabolismo de proteínas. Mesmo a uréia não tendo boa especificidade para diagnosticar mudanças na função renal geral, ela é mais sensível para diagnosticar alterações primárias das condições renais.

As análises de creatinina (Tabela 2 e Fig. 11) demonstram diferença significativa entre os resultados obtidos para o grupo 2 e 4 e entre o grupo controle (G1) e o grupo 2. O grupo 2 foi o que apresentou maior média para os níveis de creatinina. A creatinina avalia o ritmo de filtração glomerular; portanto, quanto maior a quantidade de creatinina no sangue menor a taxa de filtração desse metabólito pelo rim. A creatinina é o principal parâmetro para a análise de aparecimento de insuficiência renal. O excesso de proteínas ingeridas pelo grupo 2 (suplementado pelo soro sem hidrólise) parece não ter sido bem metabolizada pelo organismo favorecendo um provável aparecimento de quadro de insuficiência renal nesses animais.

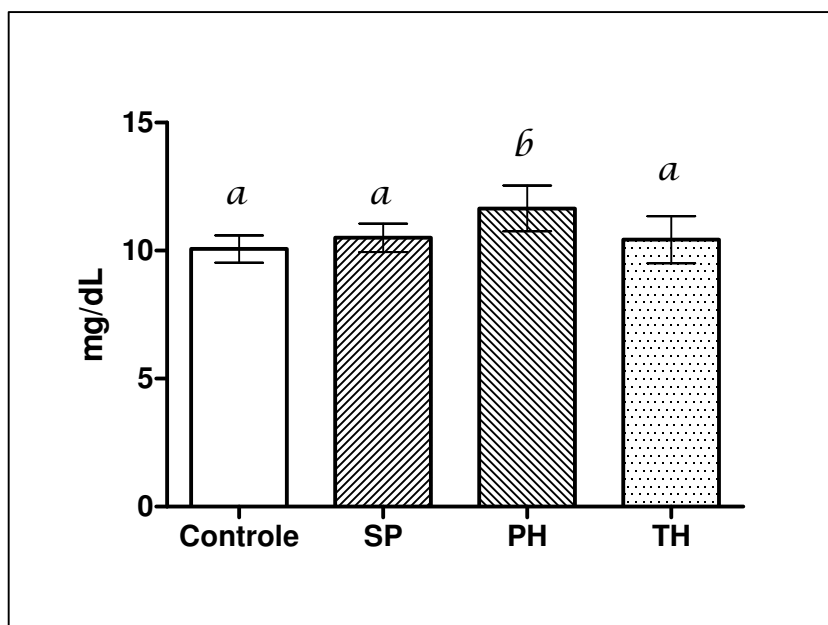


Figura 12. Gráfico da média da dosagem de cálcio sérico (mg/dL) dos animais.

Os resultados apresentados na Tabela 2 e Figura 12, encontrados para o cálcio sérico, foram maiores em todos os grupos suplementados em relação ao controle, porém, diferença significativa para maior pode ser encontrada somente entre o grupo 3 e grupo 4 e entre o grupo 3 e grupo controle (G1). Sabe-se que as proteínas do soro de queijo são ricas em cálcio (aproximadamente 600mg/100g) (LÁCTEA BRASIL, 2009). Isto pode explicar o aumento do cálcio sérico nos grupos suplementados. Provavelmente o mineral deva estar mais facilmente acessível nas proteínas parcialmente hidrolisadas fazendo com que o mineral seja mais bem absorvido pelas vilosidades intestinais e mais biodisponível para o organismo favorecendo dessa maneira o incremento de massa óssea por este grupo.

Capítulo 3.

CAPÍTULO 3

Imobilização e estabilização das enzimas tripsina e pepsina para posterior utilização na obtenção de hidrolisados de soro de queijo.

INTRODUÇÃO

1. Imobilização de enzimas

Os processos catalisados por enzimas na Indústria são cada dia mais numerosos, já que, apresentam uma série de vantagens frente aos catalisadores convencionais não biológicos:

1. Grande atividade catalítica;
2. Grande especificidade frente ao substrato;
3. São muito ativos à temperatura ambiente e pressão atmosférica.

Apesar de apresentarem vantagens, a maioria das enzimas solúveis não é estável por um longo período; além disso, por serem solúveis em água, sua separação dos substratos e produtos se torna difícil não sendo possível sua reutilização (ARROYO, 1998).

Com a imobilização de enzimas pode-se superar estes últimos inconvenientes permitindo maior rentabilidade econômica.

1.1 Aspectos gerais sobre a imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas é um processo em que se confina ou se localiza a enzima em uma região definida do espaço para dar lugar a formas insolúveis que retêm sua atividade catalítica e que podem ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente esta definição se ampliou para: “processo pelo qual se restringem, completa ou parcialmente, os graus de liberdade de movimento de enzimas, células, etc., por sua união a um suporte” (TAYLOR, 1991).

Como vantagens a respeito do processo de imobilização podem-se destacar:

1. Aumento da estabilidade da enzima;
2. Possível reutilização do derivado, diminuindo desta maneira os custos do processo;
3. Possibilidade de utilização de reator enzimático de fácil manejo e controle.

Os principais inconvenientes do processo de imobilização são:

1. Alteração da conformação da enzima em relação ao seu estado nativo;
2. Grande heterogeneidade do sistema enzima-suporte onde pode existir distintas frações de proteínas imobilizadas com um diferente número de uniões ao suporte;
3. Sempre pode haver uma perda de atividade da enzima durante a imobilização;
4. O biocatalisador é mais caro que a enzima nativa.

Em geral os métodos de imobilização se classificam em duas grandes categorias: 1) retenção física e 2) união química (KENNEDY & CABRAL, 1983).

1.1.1 Retenção física

1.1.1.1 Aprisionamento

Consiste na retenção física de uma enzima nas cavidades interiores de uma matriz sólida porosa constituída geralmente de prepolímeros fotoentrecruzados ou polímeros do tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato ou resinas de poliuretano. O processo de imobilização é realizado mediante a suspensão da enzima em uma solução do monômero. Seguidamente inicia-se a polimerização por uma mudança de temperatura ou mediante a adição de um reagente químico.

Este método de imobilização requer um controle rigoroso das condições de polimerização, assim como a comprovação de que a natureza química do processo não altera os grupos reativos da proteína (ARROYO, 1998).

1.1.1.2 Inclusão em membranas

Este método pode ser dividido em 2 tipos:

- 1) Microencapsulação
- 2) Reatores de membrana

Na microencapsulação as enzimas estão rodeadas de membranas semi-permeáveis que permitem a passagem de moléculas de substrato e produto, mas não da enzima. Estas membranas semi-permeáveis podem ser permanentes (originadas por polimerização interfacial) ou não permanentes (geradas por surfactantes ou “micelas reversas”). Por este método podem-se encapsular simultaneamente uma grande variedade de enzimas, células ou biomoléculas, permitindo que se realizem determinadas reações que acontecem em múltiplos passos (KLEI; SUNDSTROM & SHIM, 1985).

Já o processo de reatores de membrana, emprega membranas permeáveis ao produto final, permeáveis ou não ao substrato inicial e, obviamente, impermeáveis à enzima. Mediante uma bomba se estabelece um fluxo líquido de substrato que atravessa o reator. Em geral esta metodologia se procede inicialmente pela adsorção da enzima sobre a membrana que formará o reator. Esta adsorção pode ser realizada de suas formas: 1. mediante a passagem de uma solução tamponada de enzima através da membrana; 2. por contato contínuo de uma solução de enzima com a membrana.

1.1.2 União química

São os métodos de imobilização mais utilizados e dos que se dispõe maior informação. Deve-se procurar que a imobilização incremente a afinidade pelo substrato, diminua a inibição, amplie o intervalo de pH ótimo e reduza as possíveis contaminações microbianas. Além disso, o suporte deve ter resistência mecânica adequada às condições de operação do reator e ser facilmente separável do meio líquido para que se seja possível sua reutilização. Os suportes podem ser classificados em dois grandes grupos:

1. Suportes inorgânicos: *naturais* (argilas) ou *materiais manufaturados* (óxidos de metais ou vidro de tamanho de poro controlado, vidro não poroso, alumínio, cerâmicas etc.)

2. Suportes orgânicos: *naturais*: polissacarídeos (celulose, amido, ágar-ágar, agarose, alginatos, quitina etc.); proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc.) ou *polímeros sintéticos*: poliolefinas (poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamida, etc.) e outros tipos (álcool polivinílico, poliamidas etc.) (ARROYO, 1998).

As enzimas podem se unir a estes suportes mediante adsorção ou por união covalente.

1.1.2.1 Adsorção

Na adsorção a enzima se une a um suporte sem funcionalizar mediante interações iônicas, forças de Van der Waals e por pontes de hidrogênio. Os principais fatores que influenciam na adsorção são:

1. o pH do meio;
2. a força iônica;
3. o diâmetro do poro e,
4. a presença de íons que atuem como cofatores da enzima.

Como principais vantagens deste método podem-se destacar:

1. preparo simples;
2. baixo custo;
3. não há mudanças na especificidade da enzima e,
4. os derivados são estáveis em meios de trabalho com baixo conteúdo de água.

Os inconvenientes da adsorção são principalmente:

1. a otimização das variáveis que controlam a adsorção;
2. os derivados obtidos são pouco estáveis do ponto de vista mecânico;
3. a união ao suporte é débil (ARROYO, 1998).

1.1.2.2 União covalente

A união covalente de uma enzima a um suporte é talvez o método mais interessante do ponto de vista industrial. A metodologia se baseia na ativação de grupos químicos do suporte para que estes reajam com nucleófilos das proteínas. Dentre os 20 aminoácidos diferentes que se encontram na estrutura das enzimas, os mais empregados para a formação de ligações com o suporte são principalmente a lisina, cisteína, tirosina e histidina e, em menor escala a metionina, triptofano, arginina e ácido aspártico e glutâmico. Este método apresenta as seguintes vantagens:

1. a manipulação dos derivados imobilizados é simples;
2. a carga de enzima permanece constante depois da imobilização;
3. os derivados podem ser utilizados em reatores contínuos, empacotados, de leito fluidizado ou tanque agitado;
4. uma maior resistência à desativação pelo efeito da temperatura dos solventes orgânicos ou do pH ao ter estabilizada sua estrutura terciária.

Porém, a imobilização por ligação covalente também apresenta alguns inconvenientes:

1. é necessário conhecer a densidade de grupos reativos por unidade de superfície, já que condiciona o número de uniões enzima-suporte e sua geometria, que pode ser distorcionante e pode conduzir a derivados inativos;
2. o processo de imobilização pode alterar a estrutura do centro ativo. Para evitar esta possível alteração, realiza-se a imobilização em presença de um inibidor reversível que bloqueie o centro ativo;
3. a imobilização covalente não é aconselhável naquelas enzimas muito sensíveis a mudanças de pH, força iônica, etc.

1.2 Efeitos da imobilização

Com frequência, a imobilização altera significativamente o comportamento das enzimas. Em primeiro lugar se produzem mudanças em sua estabilidade. Em segundo, a enzima imobilizada é um sistema heterogêneo no qual todos os componentes que intervêm no processo catalítico (pH, substratos, produtos, inibidores, cofatores, ativadores, etc.) encontram-se em interface no meio de reação e na fase constituída pelo suporte com a enzima. Como conseqüência, a atividade enzimática se vê afetada por efeitos do tipo difusional, estérico e do microentorno (ARROYO, 1998)

1.2.1 Estabilidade

Geralmente se observa um incremento na estabilidade das enzimas após sua imobilização, que se deve principalmente às seguintes razões (KLIBANOV, 1983):

1. uma estabilização conformacional da enzima devido à existência de uniões multipontuais enzima-suporte. A estrutura terciária da enzima adquire maior rigidez e se faz mais resistente à inativação térmica ou química;
2. uma proteção frente às proteases no meio;
3. evita-se a agregação intermolecular ao manterem-se as moléculas da enzima retidas em uma determinada região do espaço;
4. existe uma alteração do microentorno da enzima devido a interação da enzima com o suporte.

1.2.2 Atividade enzimática

Durante a imobilização, a atividade da enzima pode diminuir e inclusive perder-se por diversas razões:

1. a união ao suporte se produz de tal forma que a passagem do substrato ao centro ativo está impedida;

2. os grupos reativos do suporte reagem com algum aminoácido que forme parte do centro ativo ou que seja essencial para a atividade catalítica da enzima;
3. a imobilização pode originar uma mudança conformacional que dá lugar a uma forma inativa;
4. as condições experimentais do processo causam a desnaturação ou desativação da enzima.

Se a perda da atividade não é total depois da imobilização, as mudanças (diminuição ou aumento da atividade enzimática) se deverão principalmente a efeitos difusionais, eletrostáticos elétricos ou do microentorno (ARROYO, 1998).

1.3 Aplicações das enzimas imobilizadas

As aplicações mais importantes das enzimas imobilizadas podem-se classificar em:

1. analíticas: biosensores;
2. médicas: tratamentos com enzimas imobilizadas;
3. industriais: na indústria química, farmacêutica, alimentícia ou de tratamento de resíduos.

1.4 Tripsina e Pepsina Imobilizadas

Vários artigos encontrados na literatura apontam métodos para imobilização das enzimas tripsina e pepsina; porém, cada artigo, busca para seu propósito uma metodologia de imobilização e estabilização do derivado. Os derivados de ambas as enzimas podem ser aplicados para amplas utilidades (BLANCO, 1989; JANG, 2006; MARKDWART, 1968; WU, 2008; HERTMEIER, 1979).

OBJETIVOS

1. Geral

- Produzir derivados de tripsina e pepsina (suporte + enzima) estáveis que possam ser utilizados posteriormente na hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino.

2. Específicos

- Utilizar diferentes suportes e metodologias para imobilizar as enzimas comerciais pepsina e tripsina;

- Realizar estudos de estabilidade dos derivados obtidos visando a obtenção de um derivado estável que possa ser reutilizado sem perda de atividade enzimática;

- Realizar ensaios de hidrólise das proteínas do soro de queijo utilizando os melhores derivados de tripsina e pepsina obtidos;

- Analisar os hidrolisados quanto ao grau de hidrólise por eletroforese e cromatografia (CLAE) e comparar os diferentes hidrolisados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

1. Derivado tripsina

O gel Sepharose 4B-CL, a Sepharose 4B-BrCN (bromocianógeno) ativada e o marcador LMW utilizado para a realização das eletroforeses foram obtidos a partir da GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia. A Tripsina (EC 3.4.21.4) de pâncreas bovino, BAPNA (benzoil-arginina-*p*-nitro anilida), benzamidina, glicidol, borohidreto de sódio foram adquiridos da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO e, o ácido dissódico Iminodiacético, da Fluka, EUA. A Tripsina utilizada nos experimentos foi uma preparação Sigma do tipo III, dialisada e liofilizada.

2. Derivado pepsina

O gel Sepharose 4B e 10B-CL, a Sepharose 4B-BrCN (bromocianógeno) ativada e o marcador LMW utilizado para a realização das eletroforeses foram obtidos a partir da GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia. A BC pepsina (P389P) foi adquirida da Biocatalystis e a benzamidina, glicidol, borohidreto de sódio foram adquiridos da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

MÉTODOS

1. Obtenção dos derivados tripsina

1.1 Ativação dos géis Sepharose

O suporte Glioxil- Sepharose 4B-CL contendo 25 μ Equivalentes de grupos glioxil/mL, foi preparado seguindo a metodologia descrita por Blanco et al. (1989). O gel BrCN foi preparado pela ativação do pó com água (relação 1g/10mL) que teve seu pH

previamente ajustado em 2,0 com uma solução de HCL. O BrCN consegue estabelecer somente ligação unipontual com a enzima a ser imobilizada; por esse motivo, é utilizado como modelo experimental comparativo para os demais suportes que fazem ligação multipontual com a enzima. O IDA-gel-glioxil foi preparado seguindo a metodologia descrita por Armisen, et al. (1999). É importante ressaltar que anteriormente à definição dos suportes relacionados acima para imobilizar a tripsina, diversos ensaios foram realizados com outros suportes.

1.2 Preparo dos derivados de tripsina

As reações foram realizadas em presença de benzamidina 3mM (inibidor competitivo da tripsina), visando prevenir autólise enzimática, a 25°C e com uma solução de tripsina 4mg/mL. O derivado glioxil-sepharose pH 8,5 foi preparado com uma solução de tripsina feita em tampão bicarbonato 100mM pH 8,5. Esta reação de imobilização ocorreu em 2 horas. Após a imobilização, o derivado foi filtrado e ressuspendido em uma solução de bicarbonato 100mM pH 10 por 22 horas.

O derivado glioxil-sepharose pH 10 foi preparado nas mesmas condições que o derivado pH 8,5, mas neste caso utilizando-se tampão pH 10. A reação de imobilização ocorreu em 24 horas de exposição solução enzimática e suporte. Já o derivado IDA-glioxil foi preparado utilizando-se um tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,0. O derivado, pronto após 21 horas de exposição enzima-suporte, foi filtrado e ressuspendido em tampão pH 10 overnight.

O último derivado, BrCN foi preparado utilizando-se a mesma solução tampão-enzima como para o derivado IDA- glioxil. Esta reação foi mantida por 15 minutos a 4°C. Após, este derivado foi filtrado e ressuspendido em uma solução de etanolamina 1M pH 8,0 por 2 horas. O derivado obtido foi então lavado e filtrado para posterior aproveitamento nas reações de hidrólise. Todas as reações de imobilização foram feitas em uma relação de 1g suporte/10mL de solução enzimática e foram controladas pela capacidade de hidrólise da suspensão e sobrenadante frente ao substrato BAPNA (N- α -benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida) 200 mM preparado em 50 mM de tampão fosfato pH 7,0 contendo 30% etanol. A reação colorimétrica se dá pela degradação do BAPNA pela tripsina com a liberação da p-nitroanilina que confere à solução coloração amarelada (JANG et al., 2006).

1.3 Redução com Borohidreto (NaBH₄)

Após serem incubados em pH 10 os derivados glioxil-Sepharose pH 10, pH 8,5 e IDA-glioxil foram adicionados de NaBH₄ sólido para a redução de possíveis grupos reativos ainda presentes, na concentração de 1mg/mL. Esta reação foi mantida por 1 hora. Depois, os derivados foram filtrados, lavados abundantemente com água destilada e novamente filtrados para posterior utilização.

1.4 Ensaio enzimáticos

A atividade dos derivados foi mensurada seguindo o aumento da absorbância em λ 405nm, que acompanha a hidrólise de BAPNA 200 mM preparado em tampão fosfato 50mM pH 7.0 contendo 30% de etanol. Os ensaios foram realizados em uma célula de 1 centímetro de passo óptico provida de agitação magnética. As medidas de absorbância foram tomadas a cada 3 segundos em um total de 130 segundos. O corte foi realizado entre 10 e 120 segundos de reação, para coleta da parte linear de formação de produto. Um branco de tripsina em presença de benzamidina foi preservado para medida de atividade durante o período experimental.

1.5 Termoestabilidade dos derivados

Os 0,2g de cada um dos derivados: glioxil-Sepharose pH 8,5; 10 e IDA-glioxil, foi submetido a ensaio de termoestabilidade a 75°C em presença de 2mL de tampão fosfato 5mM pH 7. Outro experimento foi realizado com os derivados IDA-glioxil e BrCN a 70°C. Em tempos distintos, alíquotas da suspensão eram retiradas e ensaiadas com BAPNA em pH 7,0 a 25°C.

1.6 Estabilidade dos derivados em presença de co-solventes e temperatura

0,2g de cada derivado foi adicionado de 2 mL de tampão TRIS 10 mM pH 7,0 contendo 50% de dioxano e colocados em banho de água a 50°C para prova de estabilidade. Outro experimento foi realizado utilizando-se os derivados IDA-glioxil e BrCN a 40°C por 2 horas. As análises de estabilidade foram realizadas conforme descrição acima utilizando-se BAPNA como substrato (Item 1.5).

1.7 Termoestabilidade dos derivados em pH 9,0

Os derivados glioxil-sepharose pH 8,5, 10 e BrCN foram submetidos a uma prova de estabilidade a 50°C em presença de 5 mM de tampão de bicarbonato pH 9. Os ensaios foram feitos na mesma relação (mg derivado/mL de tampão) como nos ensaios descritos no item 1.6.

1.8 Reação de hidrólise da PGA (proteína G-acilase) pelos diferentes derivados de tripsina.

A hidrólise da PGA foi utilizada para verificar a eficiência hidrolítica de cada um dos derivados preparados. Uma solução de 2mg/ml da PGA foi preparada em água destilada. 0,70 g de cada derivado (BrCN, glioxil-Sepharose pH10 e 8,5) foi adicionado a uma solução de 10 mL de PGA pH 9,0. A reação foi mantida a 37°C sob agitação constante. Amostras foram tomadas após 24 horas e fervidas com tampão de amostra para realização de eletroforese.

1.9 Reação de hidrólise de extrato de E.coli pelos diferentes derivados de tripsina.

Um extrato de E. coli contendo 2mg/mL de proteína foi utilizado como substrato para reações de hidrólise utilizando os derivados de tripsina: BRCN, glioxil sepharose pH10 e 8,5. O extrato teve seu pH ajustado para 9,0 e as reações foram realizadas a 50°C sob agitação constante. 0,7g de cada derivado (BrCN, glioxil-Sepharose pH10 e 8,5) foi adicionado de 10 mL de uma solução de extrato de E. coli. Amostras foram coletadas após 30 e 60 minutos e 24 horas de reação e fervidas com tampão de amostra para realização de eletroforese.

1.10 Hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino pelo derivado tripsina glioxil pH 8,5

O soro de queijo bovino (6mg/mL) teve seu pH ajustado com NaOH diluído para 9,0. Para a realização do ensaio 0,4 g do derivado foi incubado com 2 mL de soro e a reação foi mantida em banho a 50°C sob agitação constante. Amostras foram tomadas nos tempos 30, 60 e 120 minutos para realização de eletroforese.

1.11 SDS- PAGE dos derivados de tripsina.

0,07 g de cada derivado (BrCN, glioxil pH 8,5 e 10 e IDA-glioxil) foi adicionado a 100 μ L de tampão de ruptura e fervido. As amostras foram utilizadas para a realização de uma eletroforese SDS PAGE 15%. O intuito era observar se alguma banda de proteína da enzima se soltaria após a realização da eletroforese, o que indicaria uma debilidade da interação enzima-suporte. Um marcador de massa molar foi utilizado como referência.

1.12 SDS- PAGE dos produtos de hidrólise de E.coli, PGA e proteínas do soro de queijo bovino

Eletroforeses SDS-PAGE 12% foram realizadas para observar o grau de hidrólise dos substratos pelos diferentes derivados.

2. Obtenção dos derivados pepsina

2.1 Ativação dos géis Sepharose

O suporte glioxil-sepharose 4B-CL, foi preparado seguindo a metodologia descrita por Blanco et al. (1989). O gel BrCN foi preparado pela ativação do pó com água (relação 1g/10mL) que teve seu pH previamente ajustado em 2,0 com uma solução de HCL. O suporte glioxil-amino 10B-CL foi preparado seguindo a metodologia descrita por Guisán (1997). Assim como para a determinação dos suportes para a tripsina, vários suportes foram estudados para a pepsina anteriormente à definição dos acima especificados.

2.2 Purificação da pepsina

Uma solução de pepsina comercial (1,67g/mL) foi preparada em água destilada. Esta solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos a 24 ° C. O sobrenadante foi colocado em contato com uma resina DEAE- Sepharose Fast Flow (Ge- Healthcare) por 4

horas. O gel foi filtrado e ressuspenso em tampão fosfato 50mM pH7, contendo 200mM de NaCL para retirar a enzima que estava ligada ao gel.

2.3 Preparo dos derivados de pepsina

A pepsina, após parcial purificação para retirada de possíveis interferentes do processo de imobilização, foi diluída 1/1 com tampão fosfato 50mM pH 7,0 para o preparo dos derivados BrCN e amino-glioxil. A solução de enzima e tampão foi mantida com o gel BrCN por 15 minutos. Após este período, o gel foi filtrado e ressuspenso em uma solução de etanolamina 1M pH 8,0 por 2 horas. O derivado obtido foi então lavado e filtrado para posterior aproveitamento nas reações de hidrólise. Já para o preparo do derivado amino-glioxil, manteve-se a solução de enzima em contato com o suporte por 15 horas. Após este período o derivado foi filtrado e ressuspenso em tampão bicarbonato de sódio 100mM pH10. A reação foi mantida por 2 horas. Para o preparo do derivado glioxil pH 10, a pepsina diluída 1/1 com tampão bicarbonato 100mM pH 10 foi mantida em contato com o suporte por 24 horas. Todas as reações de imobilização foram feitas em uma relação de 1g suporte/10mL de solução enzimática.

2.4 Redução com borohidreto

Após serem filtrados, o derivado amino-glioxil e o derivado glioxil- pH10 foram adicionados de NaBH₄ sólido para a redução de possíveis grupos reativos, na concentração de 1mg/mL. Esta reação foi mantida por 1 hora. Os derivados foram então filtrados e lavados com água destilada para posterior utilização.

2.5 Ensaio enzimático

A atividade catalítica dos derivados foi medida pela diminuição do teor de proteínas em uma solução de proteína de soro de leite bovino (6mg/mL) de acordo com o método de Bradford (1976). A solução de proteína de soro de leite teve seu pH ajustado para pH 3,0 com HCL diluído. Para a realização dos ensaios 0,7 g de cada derivado foi incubado com 10 mL de soro e a reação foi mantida em banho a 40°C sob agitação constante. Amostras

foram tomadas nos tempos 0, 30 minutos e 24 horas para realização das medidas de conteúdo de proteína e realização de eletroforese.

2.6 Termoestabilidade dos derivados

Os derivados BrCN e amino-glioxil-sepharose foram submetidos a ensaio de termoestabilidade a 50°C. 0,2 g de cada derivado foi adicionado de 2 mL de tampão acetato de sódio 5mM pH 3 e colocado à temperatura de 50°C por 144 horas. Amostras dos derivados foram recolhidas nos tempos 0, 24, 48, 96 e 144 horas, filtradas e incubadas com soro de leite como descrito no item 2.5 para prova de termoestabilidade.

2.7 SDS- PAGE dos derivados de pepsina e dos produtos de hidrólise

Eletroforeses foram realizadas seguindo a metodologia utilizada nos itens 1.10 e 1.11.

3. Obtenção e análise dos hidrolisados de proteína do soro de queijo bovino utilizando-se os melhores derivados de pepsina e tripsina

3.1 Obtenção dos hidrolisados

Dois ensaios de hidrólise foram conduzidos com o intuito de se observar a máxima hidrólise das proteínas do soro de queijo. No primeiro ensaio, 0,7g do derivado pepsina amino-glioxil foi incubado com 10 mL de soro de queijo (6mg/mL) tamponado a pH 3 (tampão acetato de sódio 50mM). A reação ocorreu em banho à 50°C sob agitação por 45 minutos. Após este tempo, o derivado foi recuperado e o soro parcialmente hidrolisado foi tamponado a pH 9 (tampão carbonato 50mM) e adicionado de 0,7g de derivado tripsina glioxil pH 8,5. A reação foi mantida à mesma temperatura por mais 45 minutos. No segundo ensaio, a hidrólise foi iniciada pelo derivado tripsina em pH 9 e, após 45 minutos, recuperado o derivado, acertou-se o pH para 3 e adicionou-se o derivado pepsina. Amostras dos dois ensaios foram retiradas nos tempos 0, 45 e 90 minutos de reação para dosagem do conteúdo proteínas, realização de eletroforeses SDS- PAGE e aminogramas (CLAE).

3.2 Análise do conteúdo de proteínas

As amostras dos hidrolisados retiradas nos tempos 0, 45 e 90 minutos de reação foram submetidas à análise de proteínas restantes seguindo-se o método de Hartree (1972).

3.3 SDS- PAGE dos produtos de hidrólise

Eletroforeses SDS-PAGE 12% foram realizadas para observar o grau de hidrólise das proteínas do soro de queijo pela combinação dos derivados.

3.4 Análise do conteúdo de aminoácidos (HPLC)

50 µL de cada amostra foi injetada em aparelho de HPLC da marca Shimadzu LC 10A/C-47A com método de funcionalização pós-columna (σ -ftaldeído). As colunas utilizadas foram: principal: LC Column Shim-pack amino NA (P/N 228-18837-91) e pré-columna: Shim-pack ISC 30/S0504 (Na), (P/N 228-14206-91). O gradiente linear variou de pH 3,2 a 10 por 30 min, velocidade de fluxo de 1.0 mL/min e a detecção foi por fluorescência (Ex: λ 350 nm, Em: λ 450nm). Os dados gerados pela workstation foram tratados em Origin 5.0 para a obtenção dos aminogramas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Derivados de tripsina

A tabela 1 apresenta os resultados do percentual de enzima imobilizada em cada um dos suportes escolhidos e a atividade expressada que é definida pela razão entre a atividade observada e a atividade esperada.

Tabela 1. Percentual de imobilização e atividade expressada dos derivados de tripsina

Suporte	(%) Imobilização	Atividade expressada (%)
BrCN	15	100
Glioxil pH 10,0	> 95	75
Glioxil pH 8,5	> 95	100
IDA-glioxil	70	54

O tipo de suporte, a enzima utilizada e o meio reacional determinam um maior ou menor percentual de imobilização enzimática. É importante lembrar que, independente do percentual de enzima imobilizada, a atividade do derivado frente ao substrato será definida pela orientação e estabilidade das ligações enzima-suporte. A eletroforese apresentada abaixo (Fig. 2), demonstra os distintos derivados obtidos. O processo de obtenção de amostra para aplicação na eletroforese desnaturante consiste em adicionar tampão de amostra ao derivado e ferver por 5 minutos. Desta maneira, todas as bandas de tripsina que não estiverem covalentemente ligadas ao suporte serão desorvidas do mesmo para o sobrenadante, sendo observadas por no gel de eletroforese SDS. Fazendo-se uma comparação das bandas existentes no extrato da enzima solúvel (coluna 2) e derivados (colunas 3, 4, 5 e 6) pode-se notar que o que apresenta menor número de bandas é o da coluna 6 respectivo ao derivado glioxil pH 8,5. Isto demonstra que este derivado possui um maior número de ligações covalentes fortes entre enzima e suporte.

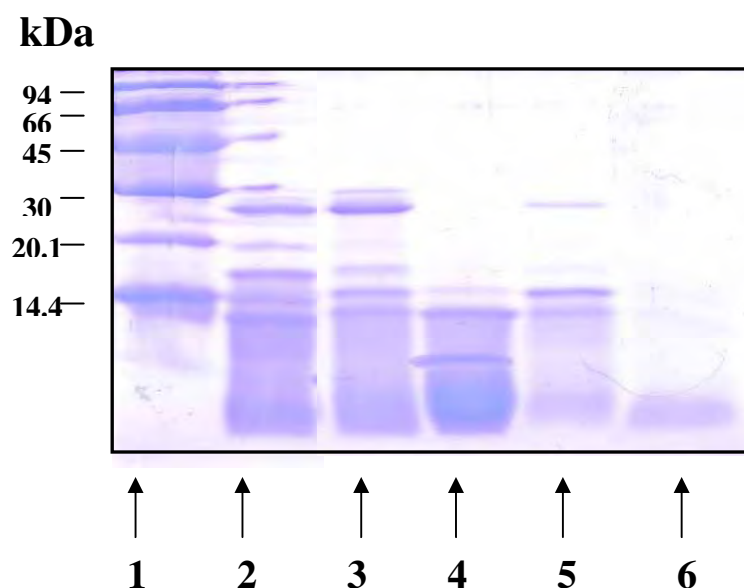


Figura 1. Análise por SDS- PAGE (15%) da adsorção da tripsina comercial em diferentes suportes. *coluna 1*. marcador de massa molar; *coluna 2*. tripsina comercial preparada (4mg/mL); *coluna 3*. derivado tripsina BrCN; *coluna 4*. derivado tripsina glioxil pH 10; *coluna 5*. derivado tripsina IDA-glioxil; *coluna 6*. derivado tripsina glioxil pH 8,5.

Abaixo são apresentados os gráficos de termoestabilidade dos diferentes derivados de tripsina: glioxil pH 8,5; glioxil pH 10; IDA-glioxil e BrCN (Figs. 2 e 3). A partir destes resultados pode-se dizer que a 75°C em pH 7,0 o derivado mais estável foi o glioxil pH 8,5 (Fig 2.), apresentando atividade residual em 16h de 70% e, a 70°C pH 7,0 ao comparar os derivados BrCN e IDA-glioxil, o mais estável foi o segundo com atividade residual em 16h de 47%.

Esta maior estabilidade do derivado glioxil pH 8,5 ocorre porque neste derivado, o primeiro passo de imobilização realizado em pH 8,5, promove uma imobilização covalente multipontual que envolve somente grupamentos amino de baixo pKa. A incubação posterior a pH 10 favorece uma imobilização mutipontual covalente intensa, entre os grupamentos amino de alto pKa da área da enzima que havia participado no primeiro passo de imobilização, aproximando grupamentos aldeído do suporte, gerando dessa maneira maior estabilidade do derivado. No derivado pH 10 a enzima se liga ao suporte pela zona mais ricas em lisinas, e no derivado IDA- glioxil a enzima é ligada ao suporte pelo lado carboxílico. As distintas orientações da enzima em relação ao suporte determinam a rigidez da ligação e, conseqüentemente, a estabilidade da enzima.

Os resultados apresentados na Fig. 3 foram somente para comprovar que o derivado menos estável à 75°C (IDA-glioxil) ainda era bastante mais estável frente ao derivado BrCN. Neste derivado a enzima se liga ao suporte unipontualmente somente por uma fração do amino terminal, sendo, portanto inestável e facilmente inativada.

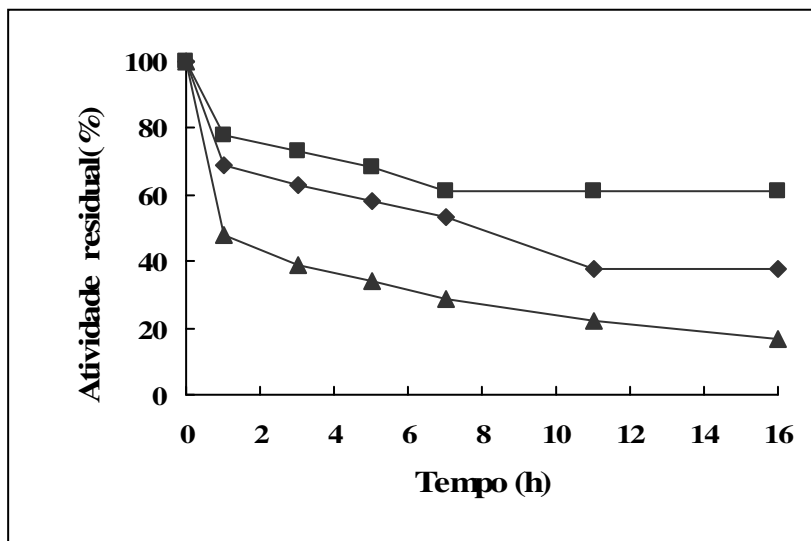


Figura 2. Termoestabilidade de diferentes derivados de tripsina. Inativação realizada à 75°C pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 5mM). Glioxil pH 10,0 (◆); Glioxil pH 8,5 (■); IDA- glioxil (▲).

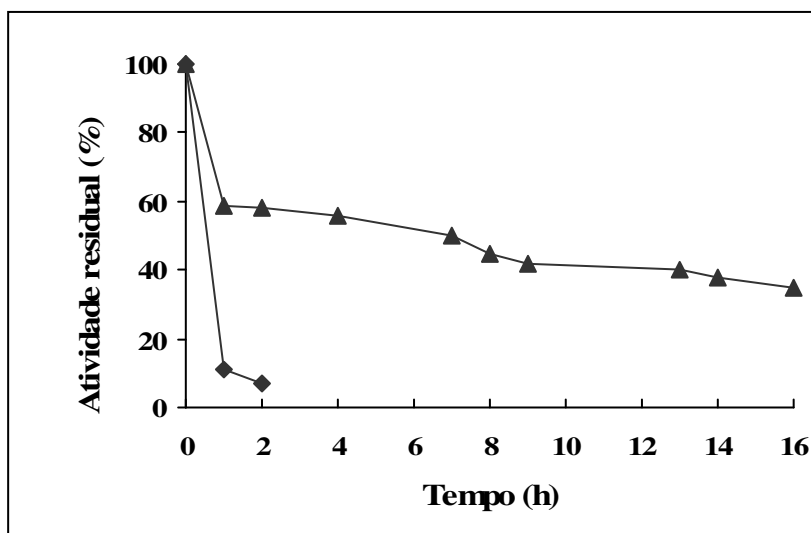


Figura 3. Termoestabilidade de diferentes derivados de tripsina. Inativação realizada à 70°C pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 5mM). BrCN (◆); IDA- glioxil (▲).

Para confirmar a rigidez da estrutura 3D do derivado mais estável (glioxil pH 8,5), realizaram-se provas de estabilidade contra co-solventes. Ao comparar os resultados obtidos neste experimento (Figs. 4 e 5) aos obtidos nas Figs. 2 e 3, notam-se semelhanças na estabilidade dos derivados. Mesmo frente à um conteúdo de 50% de dioxano, o derivado glioxil pH 8,5 apresenta em 6h (50°C, pH7), atividade residual de 89%. O derivado IDA-glioxil é o que possui menor estabilidade sob essa condições, porém, quando comparado ao derivado BrCN (40°C, pH 7) (Fig. 5) possui atividade residual em 2h de reação 18% superior.

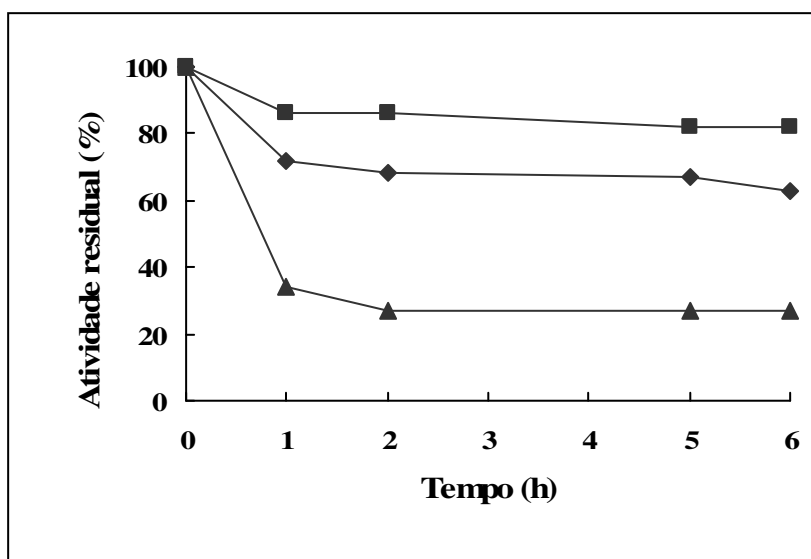


Figura 4. Estabilidade de diferentes derivados de tripsina frente à co-solventes. Inativação realizada à 50°C pH 7,0 (tampão Tris 10 mM contendo 50% de dioxano). Ensaio realizado a 24°C pH 7,0. Glioxil pH 8,5 (■); Glioxil pH 10,0 (◆); IDA-glioxil (▲).

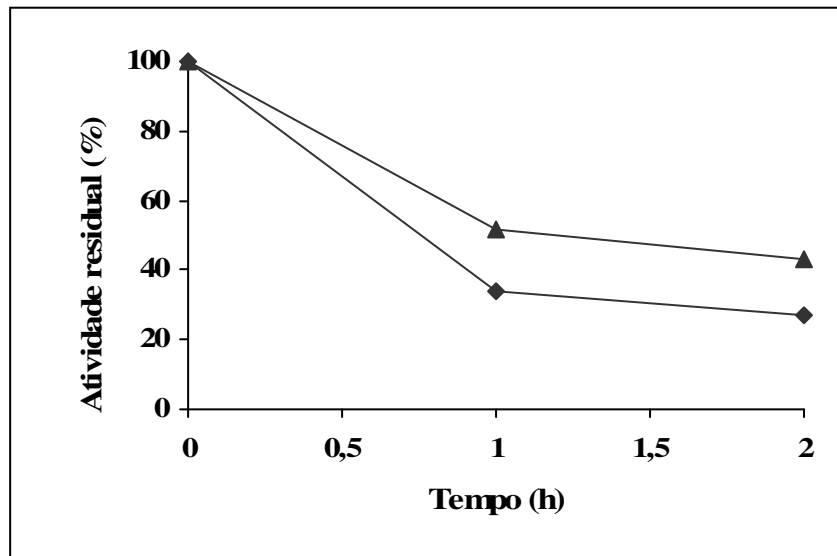


Figura 5. Estabilidade de diferentes derivados de tripsina frente à co-solventes. Inativação realizada à 40°C pH 7,0 (Tris 10 mM contendo 50% de dioxano). Ensaio realizado a 24°C pH 7,0. BrCN (◆); IDA-glioxil (▲).

Ao comparar os derivados mais estáveis (glioxil pH 8,5 e pH 10) com o BrCN sob as condições de reação 50°C e pH 9 (Fig. 6), nota-se grande diferença na atividade residual dos derivados de tripsina por ligação multipontual (glioxil pH 8,5 e 10) e BrCN (unipontual) tendo os primeiros em 500 horas (20 dias), uma atividade residual 80% maior. Nota-se também que sob temperaturas mais baixas (50°C) do que as utilizadas anteriormente para a realização das provas de estabilidade (75°C), os dois derivados melhores possuem atividade residual praticamente igual em 500 horas.

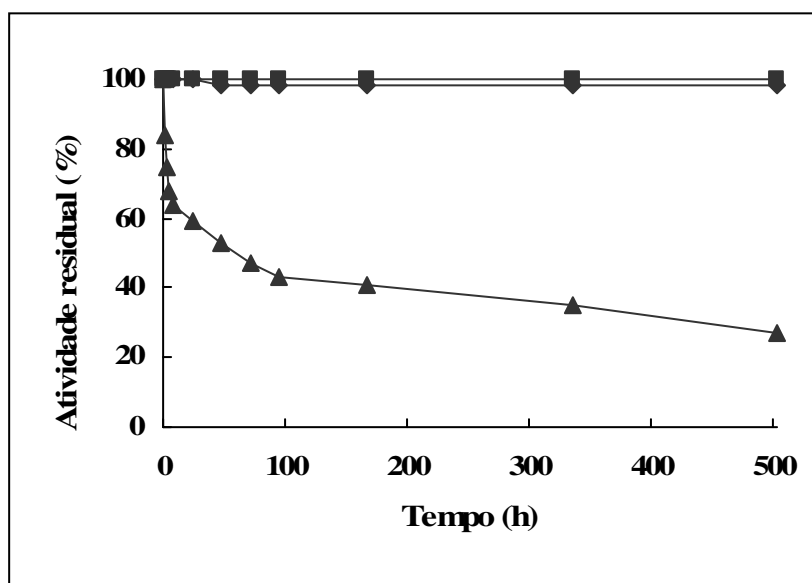


Figura 6. Termoestabilidade de diferentes derivados de tripsina. Inativação realizada à 50°C pH 9,0 (tampão bicarbonato de sódio 5mM). Glioxil pH 10,0 (◆); Glioxil pH 8,0 (■); BrCN-activated-sepharose (▲).

As amostras dos hidrolisados de uma solução de PGA (2mg/mL) pelos distintos derivados observados pela eletroforese abaixo (Fig. 7), também revelaram resultados que demonstram que, além de ser mais estável, o derivado glioxil pH 8,5 também é o que melhor hidrolisa esta proteína (coluna 5). O mesmo pode ser observado na hidrólise de um extrato de E.coli (2mg/ml) utilizado como substrato para os mesmos derivados de tripsina (Fig. 8.). Provavelmente a orientação da enzima frente ao suporte mantém o sítio de ligação bastante exposto facilitando a entrada de grandes e pequenas proteínas existentes no extrato protéico.

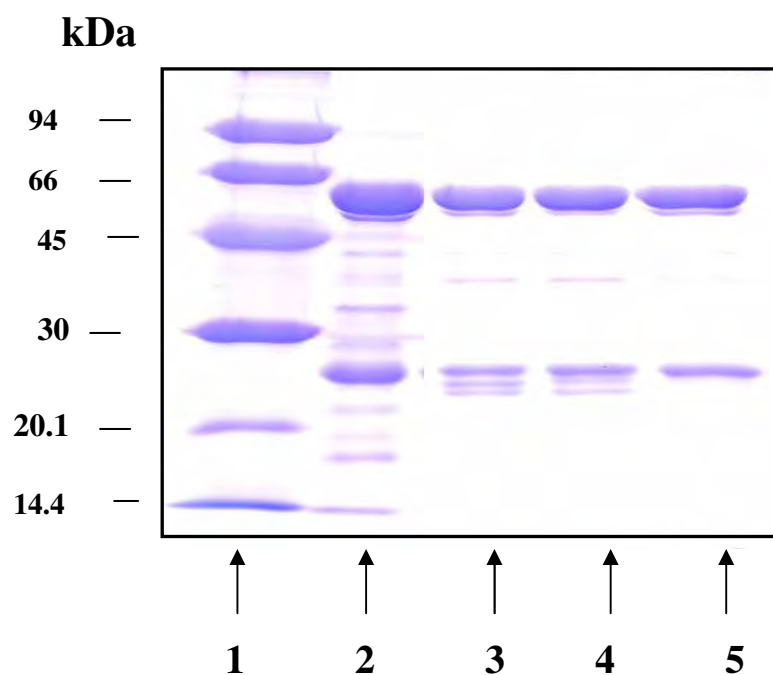


Figura 7. Análise por SDS- PAGE (12%) dos hidrolisados de PGA comercial pelos diferentes derivados. *coluna 1.* marcador de massa molar; *coluna 2.* PGA comercial (2mg/mL); *coluna 3.* hidrólise da PGA pelo derivado BrCN; *coluna 4.* hidrólise da PGA pelo derivado glioxil pH 10,0; *coluna 5.* hidrólise da PGA pelo derivado glioxil pH 8,5. A reação foi realizada à 37°C. Amostras foram retiradas 24 horas após o início da hidrólise.

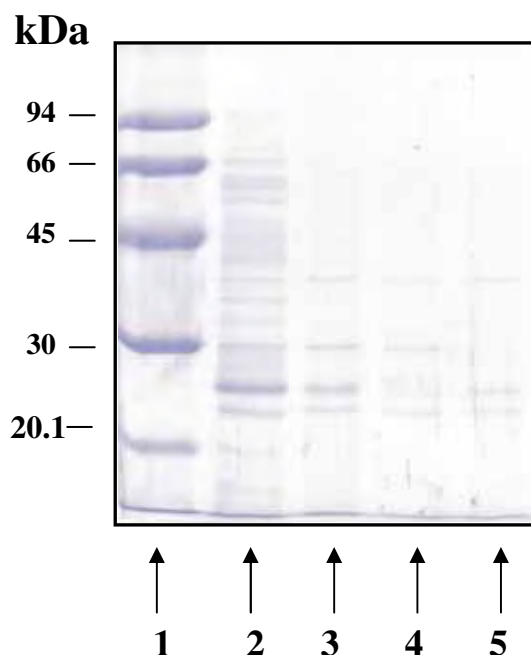


Figura 8. Análise por SDS- PAGE (12%) dos hidrolisados de extrato de *E. coli* pelos diferentes derivados. *coluna 1*. marcador de massa molar; *coluna 2*. Extrato de *E. coli* preparado (2mg/mL); *coluna 3*. hidrólise do extrato de *E. coli* pelo derivado BrCN; *coluna 4*. hidrólise do extrato de *E. coli* pelo derivado glioxil pH 10,0; *coluna 5*. hidrólise do extrato de *E. coli* pelo derivado glioxil pH 8,5. A reação foi realizada à 50°C, pH 9,0. Amostras foram retiradas 24 horas após o início da hidrólise.

Abaixo são demonstrados por eletroforese (Fig. 9) os resultados obtidos para a hidrólise das proteínas do soro de queijo pelo derivado tripsina glioxil pH 8,5. Os resultados mostram que as proteínas vão sendo hidrolisadas com o passar do tempo; porém, a soro albumina bovina ainda apresenta-se presente, em menor proporção que no início, na amostra de 120 minutos de hidrólise. A tripsina, por ser uma endopeptidase que hidrolisa ligações peptídicas em que o resíduo do lado carbonil é arginina ou lisina, se torna inespecífica para outras ligações peptídicas e, portanto, não consegue hidrolisar completamente as proteínas do soro de queijo. Haveria a necessidade para a hidrólise total, da presença de outras proteases.

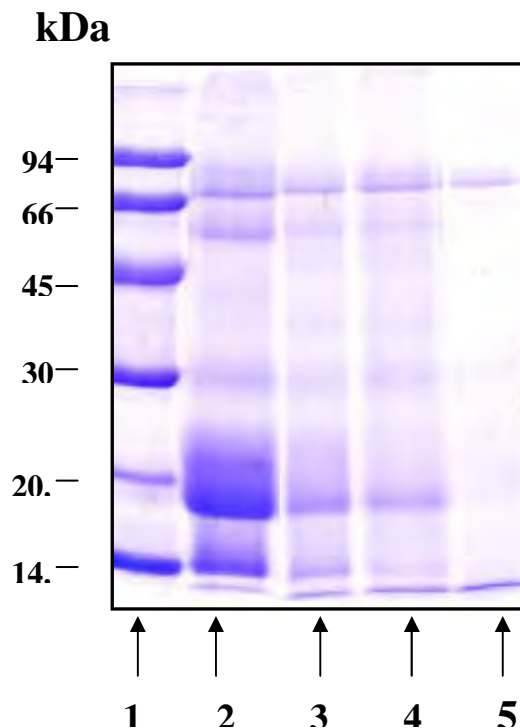


Figura 9. Análise por SDS- PAGE (12%) dos hidrolisados proteína do soro de queijo pelo derivado tripsina glioxil pH 8,5 *1.* marcador de massa molar; *coluna 2.* soro de queijo bovino (6mg/mL); *coluna 3.* 30 minutos de hidrólise; *coluna 4.* 60 minutos de hidrólise; *coluna 5.* 120 minutos de hidrólise. A reação foi realizada em pH 9,0 e a 50°C.

2. Derivados de pepsina

Abaixo são apresentados, a tabela de percentual de imobilização e atividade expressada dos derivados de pepsina (glioxil pH 10, amino-glioxil e BrCN) (Tabela 2) e a eletroforese dos derivados de pepsina (Fig. 10) respectivamente. Nota-se pela tabela que o maior percentual de pepsina foi imobilizado no suporte amino-glioxil seguido do suporte BrCN. A imobilização em amino-glioxil é iniciada pela ligação dos grupamentos carboxílicos da enzima ao suporte em pH 7,0 e em seguida, ao elevar à pH 10, estabelecem-se mais ligações enzima-suporte permitindo desta maneira uma maior estabilidade do derivado (ligação multipontual da enzima com o suporte). Como dito anteriormente, o suporte BrCN, devido às condições de reação, permite somente ligação unipontual da enzima com o suporte. Já o suporte glioxil pH 10 permite ligações multipontuais, porém, a enzima se liga ao suporte

pela zona mais rica em lisinas. De acordo com a atividade expressada, que é definida pela razão entre a atividade esperada e atividade observada, o derivado amino-glioxil e o derivado BrCN são os que apresentam melhor atividade.

A pepsina, por possuir um pH ótimo em torno de 2, possui maior quantidade de grupos ionizáveis em pH mais ácido. Isto pode explicar porque a enzima se liga em maior proporção em suportes amino-glioxil e BrCN, cujo meios de reação se dão em pHs 7,0 e 2,0 respectivamente.

A eletroforese (Fig. 10) nos dá um panorama das distintas ligações da pepsina sobre os suportes. O derivado que aparenta possuir maior estabilidade é o derivado amino-glioxil, pois apresenta um menor número de bandas de proteína desorvidas do suporte observados por SDS- PAGE (coluna 4).

Tabela 2. Percentual de pepsina imobilizada nos suportes

Suporte	(%) Imobilização	Atividade expresada (%)
BrCN	35	100
Glioxil pH 10.0	10	45
Amino-Glioxil	49	90

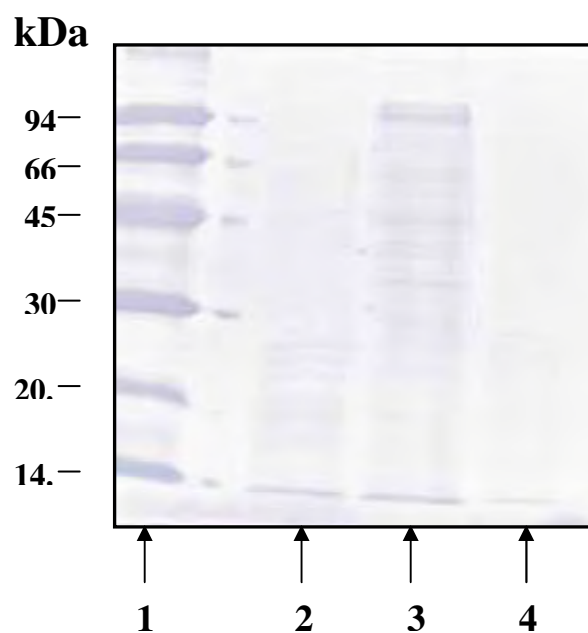


Figura 10. Análise por SDS- PAGE (12%) da adsorção da pepsina comercial em diferentes suportes. *coluna 1.* marcador de massa molar; *coluna 2.* derivado pepsina BrCN; *coluna 3.* derivado pepsina glioxil pH 10; *coluna 4.* derivado pepsina amino-glioxil.

As figuras 11 e 12 apresentam os resultados obtidos a respeito da atividade hidrolítica dos derivados de pepsina frente às proteínas do soro de queijo. Nota-se pelo gráfico que, logo nos primeiros 30 minutos de reação, a hidrólise pelos distintos derivados é bastante diversa. O derivado amino-glioxil hidrolisa praticamente 65% do substrato e, em 24 horas (1440 minutos), pequeno aumento na atividade hidrolítica é observado (acréscimo de 5%). O mesmo pode ser observado pela eletroforese. O derivado glioxil pH 10 aos 30 minutos de reação hidrolisa aproximadamente 18% das proteínas e em 24 horas apresenta um acréscimo de 10% na hidrólise. E por fim, ao observar os resultados obtidos com o derivado BrCN, nota-se que houve pequena proteólise aos 30 minutos de reação (aproximadamente 5%) porém, ao final de 24 horas, o total de proteínas hidrolisadas apresenta-se 5% superior em relação ao resultado obtido da proteólise pelo derivado glioxil pH 10. A eletroforese correspondente (Fig. 12) apresenta os mesmos resultados obtidos no gráfico. Isto significa que provavelmente a orientação da pepsina sobre o suporte amino-glioxil permite boa exposição do sítio de ligação, favorecendo dessa maneira a hidrólise de pequenas e grandes proteínas do soro de queijo.

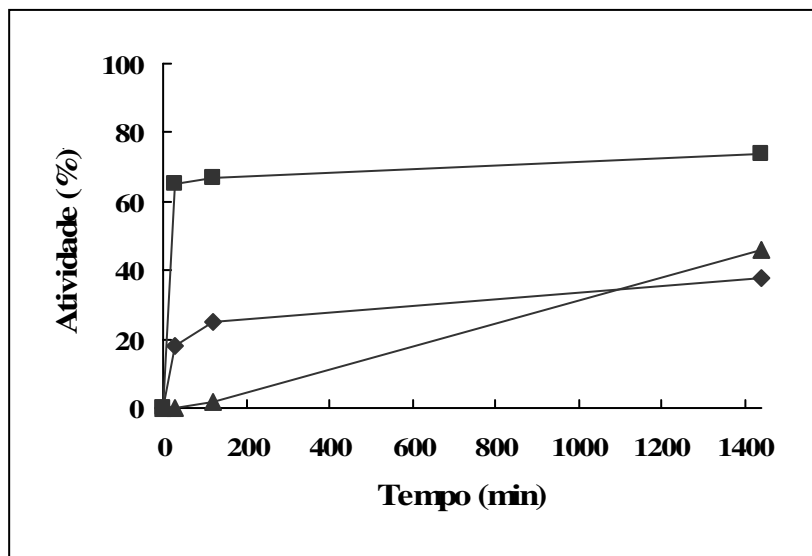


Figura 11. Atividade hidrolítica de diferentes derivados de pepsina preparados. Reação realizada em presença de proteínas do soro de queijo bovino (6mg/mL) a 40°C, pH 3,0 (Tampão acetato de sódio 50mM). Glioxil pH 10,0 (◆); Amino-glioxil (■); BrCN (▲).

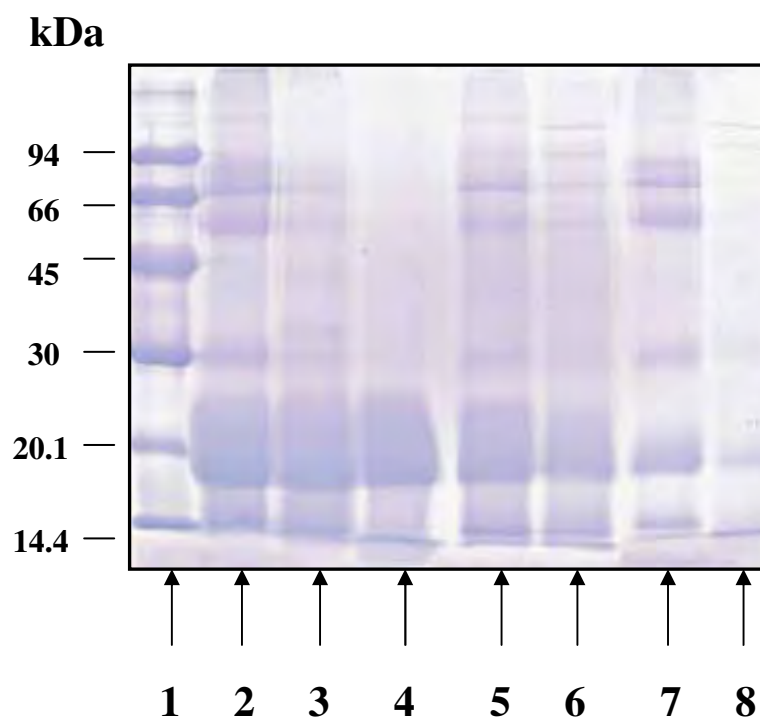


Figura 12. SDS-PAGE 12% das proteínas do soro de queijo (6mg/mL) por distintos derivados de pepsina. *coluna 1.* marcador de massa molar; *coluna 2.* soro de queijo bovino (6mg/mL); *coluna 3.* 30 minutos de hidrólise por derivado BrCN; *coluna 4.* 24 horas de hidrólise por derivado BrCN; *coluna 5.* 30 minutos de hidrólise por derivado glioxil pH 10,0. *coluna 6.* 24 horas de hidrólise por derivado glioxil pH 10,0. *coluna 7.* 30 minutos de hidrólise por derivado amino-glioxil. *coluna 8.* 24 horas de hidrólise por derivado amino-glioxil. As reações foram realizadas em pH 3,0 a 40°C.

O gráfico abaixo (Fig. 13) compara a estabilidade dos derivados de pepsina amino-glioxil e BrCN em 140 horas (aproximadamente 6 dias) em pH 3, 50°C. Em 50 horas de reação (2 dias) os derivados apresentam grande diferença na atividade residual. Enquanto o derivado mais estável (amino-glioxil) possui atividade residual de 88%, o BrCN apresenta-se com atividade residual 50% inferior. As demais horas subsequentes não alteraram a atividade de ambos.

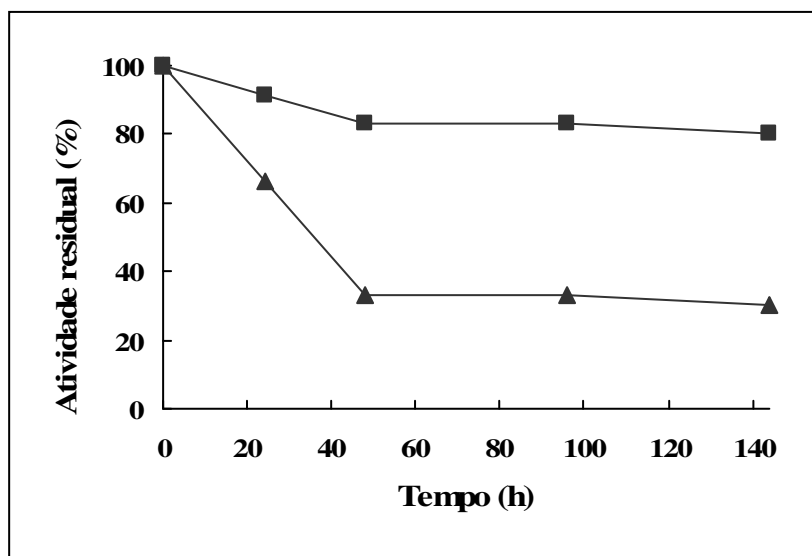


Figura 13. Estabilidade de diferentes derivados de pepsina. Inativação realizada em 50°C, pH 3,0 (tampão acetato de sódio 5mM). Ensaio realizado em presença de solução de soro de queijo (6mg/mL) a 40°C pH 3,0. Amino-glioxil (■); BrCN (▲).

3. Análise dos hidrolisados das proteínas do soro de queijo pelos derivados pepsina e tripsina

A análise dos resultados obtidos com a dosagem de proteínas do soro de queijo restantes do processo de hidrólise pela combinação dos derivados pepsina e tripsina e tripsina e pepsina (Fig. 14), revela que a primeira combinação (pepsina-tripsina), em um mesmo tempo de hidrólise (90 minutos) produz uma quantidade 2317% superior de hidrolisados frente à segunda combinação (tripsina-pepsina). Esta diferença se deve principalmente ao fato de que a pepsina, sendo uma protease que hidrolisa ligações peptídicas entre os L-aminoácidos com melhor ação na tirosina e fenilalanina seguidas por ácido glutâmico e cisteína ou citina ou com maior rapidez entre aminoácidos aromáticos possui amplas zonas de hidrólise, enquanto a tripsina é específica para ligações peptídicas em que o resíduo do lado carbonil é arginina ou lisina. O derivado pepsina atuando primariamente, libera vários peptídeos menores que depois sofrem ação do derivado tripsina produzindo dessa maneira, uma grande quantidade de aminoácidos e peptídeos de cadeia pequena. Os mesmos resultados podem ser observados pelos aminogramas e tabela de área total de aminoácidos apresentados em seqüência (Figs. 15 e 16 e Tabela 3.).

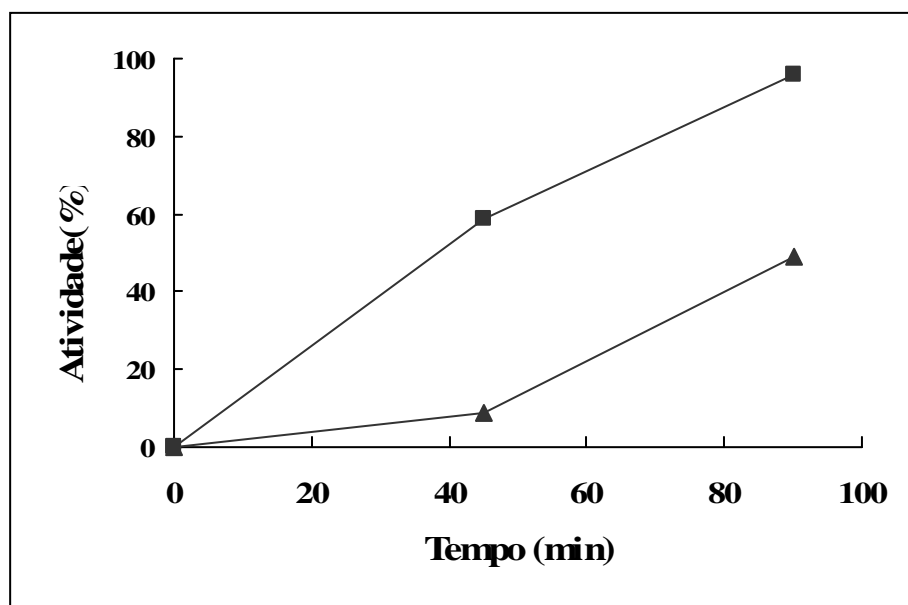


Figura 14. Atividade hidrolítica (%) da combinação dos derivados amino-glioxil pepsina e glioxil pH 8,5 tripsina frente às proteínas do soro de queijo (6mg/mL). Ensaio realizado em 50°C, pH 3,0 inicial para derivado pepsina e pH 9,0 para derivado tripsina. Hidrólise iniciada pelo derivado pepsina amino-glioxil (pH 3) e após 45 minutos, recuperado o derivado, hidrólise pelo derivado tripsina Glioxil pH 8,5 (reação em pH 9,0 por mais 45 minutos) (■); Hidrólise iniciada pelo derivado tripsina glioxil pH 8,5 (pH 9) e após 45 minutos, recuperado o derivado, hidrólise pelo derivado pepsina amino-glioxil (reação em pH 3,0 por mais 45 minutos) (▲). O tempo total de reação foi de 90 minutos.

Tabela 3. Área total de aminoácidos obtidos por análise em HPLC (aminograma) dos hidrolisados das proteínas do soro de queijo.

Hidrolisados	Área total Aminoácidos
Proteínas do soro de queijo hidrolisadas por derivado pepsina (45 minutos de reação) (Fig 2.)	2.110.099
Subsequente hidrólise das proteínas do soro de queijo, hidrolisadas pelo derivado pepsina, agora pelo derivado tripsina (90 minutos de reação) (Fig 3.)	62.813.852
Proteínas do soro de queijo hidrolisadas por derivado tripsina (45 minutos de reação) (Fig 4.)	2.339.457
Subsequente hidrólise das proteínas do soro de queijo, hidrolisadas pelo derivado tripsina, agora pelo derivado pepsina (90 minutos de reação) (Fig 5.)	2.710.165

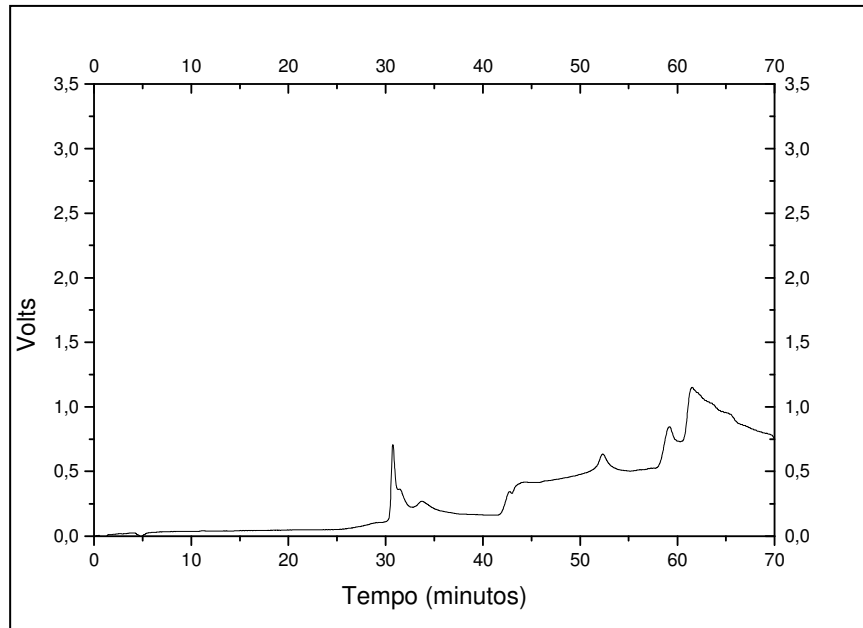


Figura 15. Aminograma do hidrolisado obtido pela ação do derivado pepsina amino-glioxil em pH 3,0 50°C (45 minutos de reação) frente às proteínas do soro de queijo (6mg/mL).

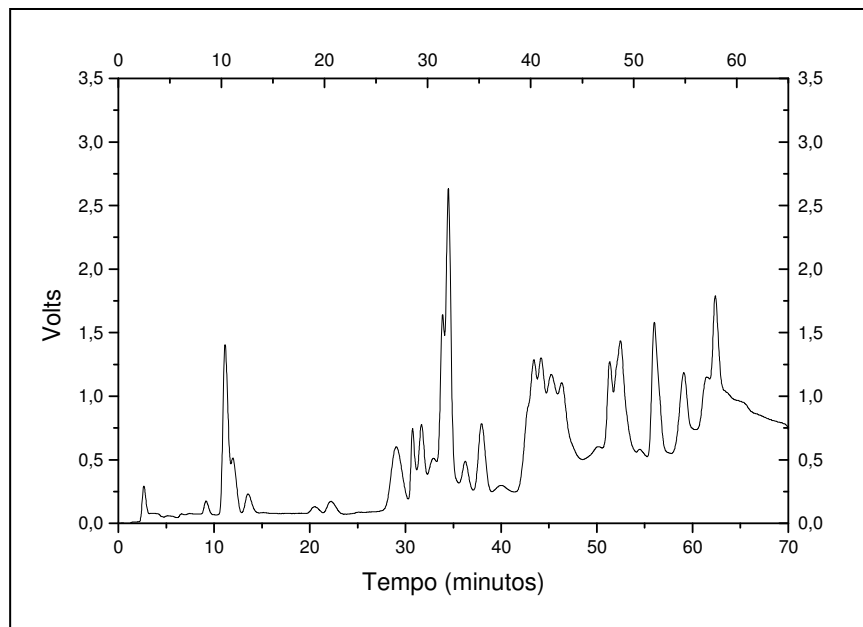


Figura 16. Aminograma do hidrolisado obtido pela ação do derivado tripsina glioxil pH 8,5 em seqüência à hidrólise realizada pelo derivado pepsina (pH 9,0 50°C -90 minutos de reação) frente às proteínas do soro de queijo (6mg/mL).

Nota-se a partir das Figuras 15 e 16 e da Tabela 3. que, quando a hidrólise das proteínas do soro de queijo é iniciada pelo derivado pepsina, a área de aminoácidos observada é pequena (2.110.099); porém, após ação do derivado tripsina a área de aminoácidos aumenta 29 vezes sugerindo que nesta amostra, há grande quantidade de aminoácidos. Já, ao analisar as amostras de aminoácidos presentes nos hidrolisados iniciados pelo derivado tripsina seguido do derivado pepsina (Figs. 17 e 18), nota-se uma área de 2.339.457 de aminoácidos para os primeiros 45 minutos de reação seguido de um incremento de apenas 1,2 vezes na área total. Nesta amostra há uma quantidade de área relativa à presença de aminoácidos, 23 vezes inferior à obtida na análise representada pela Fig 16.

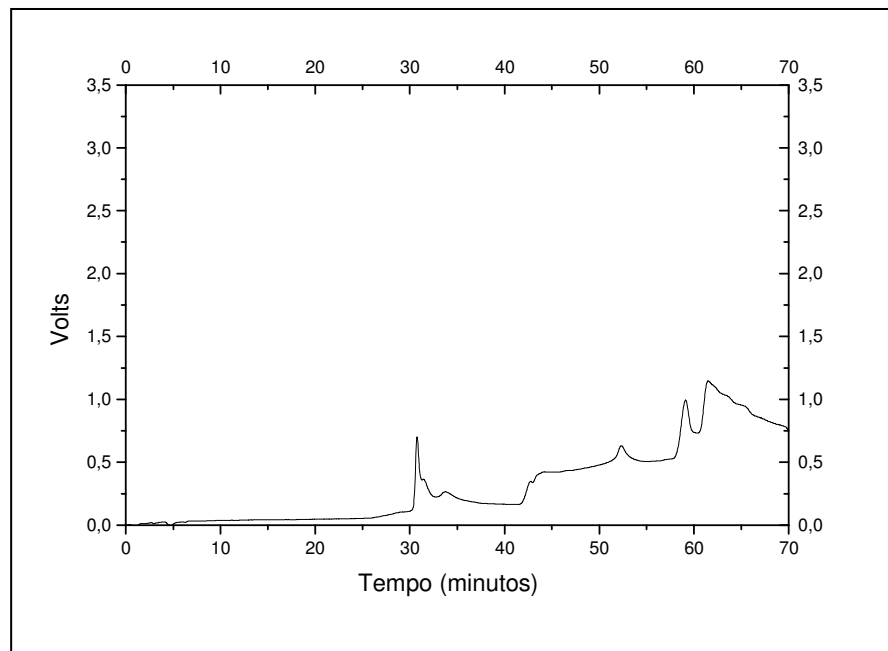


Figura 17. Aminograma do hidrolisado obtido pela ação do derivado tripsina glioxil pH 8,5 em pH 9,0 50°C (45 minutos de reação) frente às proteínas do soro de queijo (6mg/mL).

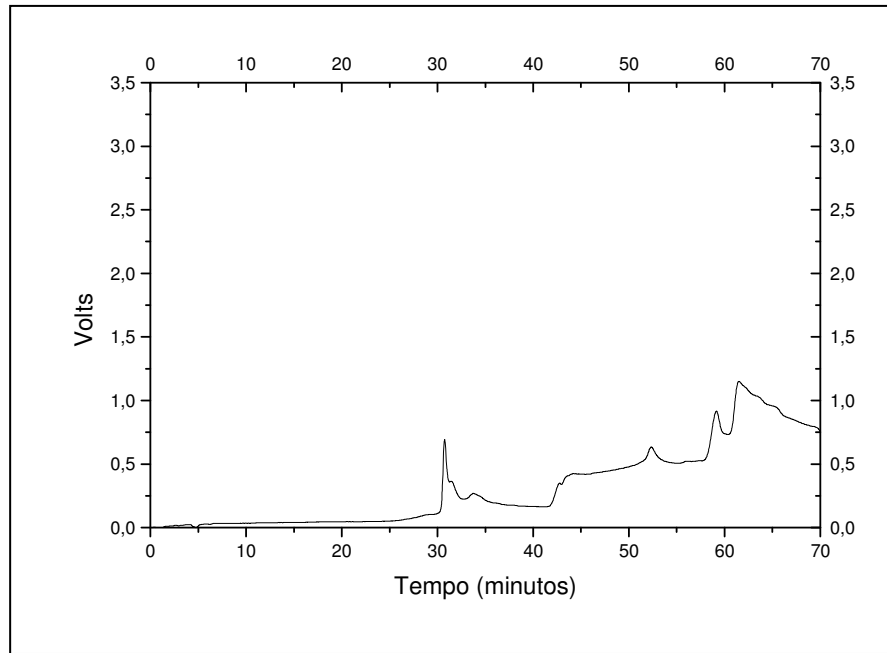


Figura 18. Aminograma do hidrolisado obtido pela ação do derivado pepsina amino-glioxil em seqüência à hidrólise realizada pelo derivado tripsina pH 3,0 50°C (90 minutos de reação) frente às proteínas do soro de queijo (6mg/mL).

A eletroforese apresentada abaixo (Fig 19.) reforça os resultados obtidos e apresentados pela Tabela 3 e Figuras 15, 16, 17 e 18. Nota-se na coluna 3 (45 minutos de hidrólise pela pepsina) que ainda há presença de SBA (soro albumina bovina) na amostra hidrolisada pelo derivado pepsina. Já na coluna 4, nenhuma banda de proteína é observada sugerindo que nesta amostra há uma hidrólise total das proteínas do soro em aminoácidos e possíveis peptídeos de pequena massa molar que não foram hidrolisados pela ação dos derivados de endopeptidases (pepsina- tripsina). As amostras representadas pelas colunas 5 e 6 revelam que em ambas as amostras ainda há a presença de proteínas do soro não hidrolisadas.

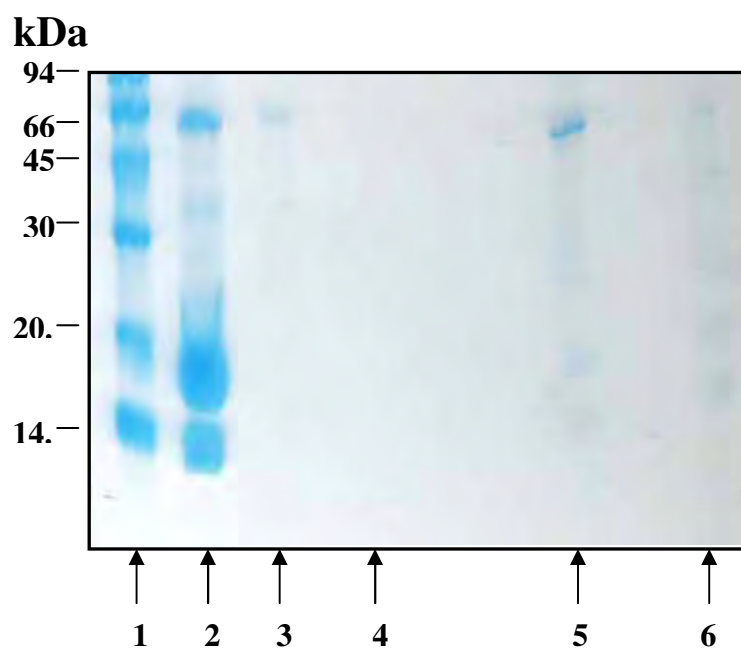


Figura 19. SDS-PAGE 12% do produto de hidrólise das proteínas do soro de queijo (6mg/mL) pela combinação dos derivados de pepsina e tripsina. *coluna 1.* marcador de massa molar; *coluna 2.* soro de queijo bovino (6mg/mL); *coluna 3.* 45 minutos de hidrólise pelo derivado amino-glioxil pepsina; *coluna 4.* 90 minutos de hidrólise pelo derivado glioxil pH 8,5 tripsina; *coluna 5.* 45 minutos de hidrólise pelo derivado glioxil pH 8,5 tripsina. *coluna 6.* 90 minutos de hidrólise pelo derivado amino-glioxil pepsina.

CONCLUSÃO

CAPÍTULO 1

- Cinco diferentes hidrolisados foram obtidos pela hidrólise das proteínas do soro de queijo pelas enzimas solúveis pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase;
- A temperatura que mais favoreceu a hidrólise das proteínas do soro foi a de 50°C;
- A adição das enzimas em tempos diferentes de reação também favoreceu o grau de hidrólise;
- Os hidrolisados obtidos no tempo de 120 minutos de reação tiveram um grau de hidrólise superior em comparação aos hidrolisados obtidos no tempo de 40 minutos de reação;
- Os melhores hidrolisados foram aqueles obtidos por hidrólise sob as condições 5 (2,55 U totais de aa em 120 minutos) e 3 (1,63 U totais de aa em 120 minutos) respectivamente;
- O hidrolisado obtido sob a condição 3 apresentou quantidade considerável de peptídeos de pequeno tamanho (oligo, di e tripeptídeos) quando comparado ao hidrolisado obtido sob a condição 5, que continha maior quantidade de aminoácidos;
- Nenhuma das condições a que foi submetido o soro de queijo foi capaz de produzir 100% de aminoácidos livres.

CAPÍTULO 2

- Todos os animais submetidos à suplementação com as proteínas e hidrolisados do soro de queijo bovino apresentaram aumento significativo na massa muscular e massa óssea em relação ao controle em $p < 0.05$;
- O grupo suplementado com as proteínas parcialmente hidrolisadas (G3) foi o que obteve maior aumento na massa muscular e massa óssea, diferindo significativamente dos outros dois grupos suplementados com proteínas sem hidrólise (G2) e com maior teor de aminoácidos (G4) respectivamente;
- O grupo 3 foi o que apresentou a menor dosagem de triglicérides, inclusive em relação ao controle, apesar de não diferir significativamente deste grupo. Houve diferença significativa na dosagem de triglicérides do grupo 3 em relação ao grupo 4;
- O cálcio sérico do grupo 3 foi significativamente maior em relação ao grupo controle e grupo 4, sugerindo maior biodisponibilidade desse mineral ao organismo para utilização na construção de massa óssea.

CAPÍTULO 3

- Derivados de pepsina e tripsina estáveis foram obtidos após vários ensaios de imobilização dessas enzimas sob diferentes suportes;
- O derivado de tripsina mais estável foi o imobilizado sob agarose com funcionalização glioxil em pH inicial de 8,5 (tampão bicarbonato de sódio 100mM), seguido de fortalecimento das uniões estáveis em pH 10,0 (tampão bicarbonato de sódio);
- A atividade expressada do derivado tripsina glioxil pH 8,5 foi de 100%; atividade residual de 65% em pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 5mM) a 75°C por 16 horas; atividade residual de 80% a 40°C, pH 7,0 por 6 horas frente à um conteúdo de 50% de dioxano e atividade residual de 98% a 50°C, pH 9,0 (tampão bicarbonato de sódio 5mM) por 500h (20 dias);
- O derivado tripsina glioxil pH 8,5 também foi o que melhor hidrolisou uma solução comercial de PGA (2mg/mL) e extrato de E.coli (2mg/mL) em 50°C pH 9,0 e em 120 minutos de reação hidrolisou todas as pequenas proteínas do soro de queijo restando somente a SBA (soro albumina);
- O derivado de pepsina mais estável foi o imobilizado sob agarose com funcionalização amino e glioxil em pH inicial de 7,0 (tampão fosfato de sódio 50mM), seguido de fortalecimento das ligações em pH 10,0 (tampão bicarbonato de sódio 100mM);
- A atividade expressada do derivado pepsina amino-glioxil foi de 90%; atividade residual de 90% em pH 3,0 (tampão acetato de sódio 5 mM) a 50°C por 140 horas (5 dias);
- Este derivado de pepsina também foi o que produziu maior quantidade de hidrolisados do soro de queijo (70%) em 1400 minutos a 40°C em pH 3,0;
- A hidrólise das proteínas do soro de queijo pelo melhor derivado pepsina (amino-glioxil) a 50°C pH 3,0 por 40 minutos, seguido da adição do melhor derivado tripsina (glioxil pH 8,5) sob mesma temperatura em pH 9,0 por mais 40 minutos, produziu uma área total de aminoácidos de 62.813.852 observado por CLAE, sugerindo hidrólise praticamente total das proteínas do soro até aminoácidos nesta amostra.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 01/2007 – Animais em Pesquisa

Interessado: DANIELA PARREIRA MARQUES

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Título do Projeto: Aplicação de hidrolisado das proteínas do soro de leite bovino no preparo de suplemento: minimização da sarcopenia e suas conseqüências em ratos idosos

Parecer nº 16/2007 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Aplicação de hidrolisado das proteínas do soro de leite bovino no preparo de suplemento: minimização da sarcopenia e suas conseqüências em ratos idosos", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 27 de abril de 2007.

Profa. Dra. MARIA VIRGINIA C. SCARPA
Coordenadora do CEP

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ- Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Disponível em:<
www.abiq.com.br>. Acesso em: 05 out. 2009.

ARMISÉN, P.; MATEO, C.; CORTÉS, E et al. Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate supports. **J. Chromatogr. A**, v. 848, n.1-2, p.61-70, 1999

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharm.**, Madrid, v.2, n.39, p.23-39, 1998.

BARÓ, L.; JIMÉNEZ, J.; MARTINEZ-FÉREZ, A. et al. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. **Ars Pharm.**, v. 42, n.3-4, p.135- 145, 2001.

BAUTISTA, A. Simply blue safe stain out performs the competition in protein staining. **Expressions**, v.10, n.4, p.6-7, 2003.

BLANCO, R.M.; CALVETE, J.J.; GUISÁN, J.M. et al. Immobilization-stabilization of enzymes: variables that control the intensity of the trypsin (amine)- agarose (aldehyde) multipoint attachment. **Enzyme Microb. Technol.**, v.1, p.353-359, 1989.

BLANCO, R.M.; GUISÁN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme Microb. Technol.**, v.1, p.360-366, 1989.

BLOCK, J. D.; MERCHERS, M.; MORTIER, L. et al. Monitoring nutritional quality of milk powders: capillary electrophoresis of the whey protein fraction compared with other methods. **Int. Dairy J.**, v.13, p. 87- 94, 2003.

BONNEFOY, M. Sarcopenia, muscular function and prevention. **Nutr. Clin. Métabol.** France, v. 8, n. 4., p.175- 180, 2003.

BRADFORD, M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMPBELL, W., CRIM, M.C.; DALLAL, G.E. et al. Increased protein requirements in elderly people: New data and retrospective reassessments. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.60, p.501-509, 1994.

CORSI, M. K.; SILVA, C.R.N.; GIORDANO, R.C. Análise de processo de recuperação de soro de queijo através da produção controlada de hidrolisado protéico. 1999. 36f. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

CUSTÓDIO, M.F. Hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite: caracterização cinética e condições ótimas de pH e temperatura. 2001. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

CUSTÓDIO, M.F.; GOULART, A.J.; MARQUES, D.P. et al. Hydrolysis of cheese whey proteins with trypsin, chymotrypsin and carboxypeptidase A. **Rev. Alim. e Nutr.**, v.16, n.2, p. 105-109, 2005.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.121, p.404-427, 1964.

DRI- Dietary Reference Intakes: Dietary guidance: Food and Nutrition information center. USDA, 2006.

FAO- Food and Agriculture Organization. Disponível em:<www.fao.org>. Acesso em: 28 set. 2009.

FAULKNER, J.A.; LARKIN, L. M.; CLAFLIN, D.R. et al. Age- related changes in the structure and function of skeletal muscles. **Proceed. Austral. Phys. Socie.**, n. 38, p.69-75, 2007.

FIATARONI, M.A.; O'NEILL, E. F.; RYAN, N. D. et al. Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. **N. Engl. J. Med.** v.330, n.18 p.1796- 1802, 1994.

FRENHANI, P.B.; BURINI, R.B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. **Arq. Gastroenterol.**, v.36, n.4, p.227-237, 1999.

FUENTE, M. A; HEMAR, Y.; TAMEHANA, M. et al. Process- induced changes in whey proteins during the manufacture of whey proteins concentrate. **Int. Dairy J.**, v. 12, n.4, p.361-369, 2002.

FURLANETTI, A.M.; PRATA, L.F. Variação dos teores de GMP (glicomacropéptídeo) livre e total no leite bovino durante a lactação. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.3, 2003.

FURTADO, M.A.M; GOMES, J.C.; SILVA, C.A.S. et al. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína láctea co- precipitada. **Ciênc. Agrotec.**, v.25, n.3, p.625-639, maio/jun.,2001.

GALVÃO, C. M.; SILVA, A.F.S.; CUSTÓDIO, M.F. et al. Controlled hydrolysis of cheese proteins using trypsin and α -chymotrypsin. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.91-93, n. 1-9, p.761-776, 2001.

GONZÁLEZ- TELLO, P.; CAMACHO, E.; JURADO, M. et al. Enzymatic hydrolysis of whey proteins.II. Molecular- Weight Range. **Biotechnol. Bioengen.**, v.44, n.4, p.529-532, 1994.

GREEN, J.H.; KRAMER, A. Food processing waste management., 98p., 1979. Westport. **Apostila**, Westport, 1994.

GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; PAÉZ- DUEÑAS, M.P. et al. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. **Ars Pharm.**, Granada, v. 41, n. 1, p. 79- 89, 2000.

GUISÁN, J.M. Immobilization os enzymes actiong on macromolecular substrates. In : Bickerstaff G.F. **Immobilization of enzymes and cells**. New Jersey: Human Press, 1997. p. 266-275.

HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev. Nutr.**, v. 19, n. 4, 2006.

HARTEMEIER, W. Immobilized pepsin: properties and use to prevent haze formation in beer and wine. **Biotechnol. Letters**, v.1, n.5, p. 225- 230, 1979.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v.48, p.422-427, 1972.

HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L.K. et al. Electrophoretic characterization of the protein products formed during heat treatment of whey protein concentrate solutions. **J. Dairy Res.**, v.65, p.79-91, 1998.

HOLLOSKY, J.O. Workshop on sarcopenia: muscle atrophy in old age. **J. Gerontol.**, v.50, p. 1-151, 1995.

IBGE- **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em:< <http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 28 set. 2009.

IRELAND, P. Effect of dietary calcium and age on jejunal calcium absorption in humans studied by intestinal perfusion. **J. Clin. Invest.**, v.52, p.2672- 2681, 1973.

JANG, S.; KIM, D.; CHOI, J. et al. Trypsin immobilization on mesoporous silica with or without thiol functionalization. **J. Porous Mater**, v. 13, n.3, p. 385-391, 2006.

JÚNIOR, R. S. Inteligência computacional aplicada à automação da hidrólise enzimática de soro de queijo em reator contínuo. 2003. 162f. Tese (Doutorado em Engenharia)- Departamento de Engenharia Bioquímica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003

KATSANOS, C.S.; CHINKES, D.L.; PADDON- JONES, D. et al. Whey protein ingestion in elderly persons results in greater muscle protein accrual than ingestion of its constituent essential amino acid content. **Nutr. Res.** v.28, p. 651- 658, 2008.

KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S. Solid phase biochemistry. **Plata Medica**, v.53, p.559-562 1983.

KIM, J.S.; WILSON, J.M.; LEE, S.R. Dietary implications on mechanisms of sarcopenia: roles of protein, amino acids and antioxidants. **J. Nut. Biochem.**, v.27, n.1, p.1-13, 2009.

KLEI, H.E.; SUNDSTROM, D.W.; SHIM, D. Immobilization of enzymes by microencapsulation. In: Woodward. **Immobilization of cells and enzymes: a practical approach**, 1985. p. 49-54.

KLIBANOV, A.M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. **Sci.**, v.219, n.4585, p. 722-727, 1983.

KOSIKOWSKI, F.U. Greater utilization of whey powder for human consumption and nutrition. **J. Dairy Sci.**, v.50, n.8, p.1343-1345, 1967.

KOSIKOWSKI, F.U. Whey utilization and whey products. **J. Dairy Sci.**, v.62, p.1149-1160, 1979.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T₄. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAYMAN, D. K. Dietary guidelines should reflect new understandings about adult protein needs. **Nutr. Met.**, v.6, n.12, p.1-6, 2009.

LOURENÇO, E. J. Tópicos de proteínas de Alimentos. **Proteínas do leite bovino**. Jaboticabal: Funep, 2000. p.179- 231.

MAHAN, L.K; ESCOTT- STUMP, S. **Alimentos nutrição e dietoterapia**. 9ed., Rio de Janeiro, 1998. 1179p.

MANRICH, A. ; GALVAO, C. ; JESUS, C. et al. Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. **Int. J. Biol. Macrom.**, v. 43, p. 54-61, 2008.

MARDON, J.; ZANGARELLI, A.; WALRAND, S. et al. Impact of energy and casein or whey protein intake on bone status in a rat model of age-related bone loss. **Br. J. Nutr.**, v.99, n.4, p.764-772, 2008.

MARKWARDT, F.; LANDANN, H.; WALSMANN, P. Comparative Studies on the Inhibition of Trypsin, Plasmin and Thrombin by Derivatives of Benzylamine and Benzamidine. **European J. Biochem.**, v.6, p.502-506, 1968.

MARQUES, D.P. Separação e hidrólise das proteínas do soro do leite: alternativas para o reaproveitamento deste resíduo. 2005. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

MARQUES, D.P.; CUSTÓDIO, M.F.; GOULART, A.J. et al. Separação das proteínas do soro do leite por DEAE-Trisacryl. **Rev. Alim. Nutr.**, v.16, n.1, p.17-20, 2005.

MARTÍN, R.M.B. Inmovilizacion y estabilizacion de tripsina. Su uso en sintesis de enlaces peptidicos. 1988. 198f. Tese de Doutorado- Faculdade de Farmácia- Universidade Complutense de Madrid, 1988.

MARTIN, W. Oral health in the elderly. **Geriatric Nutrition: The Health Professionals Handbook**. Gaithersburg, Aspen, 1991. p.304-319.

MATÉ, J.I.; KROCHTA, J.M. α -Lactoglobulin separation from whey protein isolate on a large scale. **J. Food Sci.**, v.59, n.5, p.1111-1114, 1994.

MCDONALD, C.E.; CHEN, L.L. The Lowry modification of the folin reagent for determination of proteinase activity. **Anal. Biochemistry.**, v.10, p.175-177, 1965.

MEDEIROS, A.C.; ROCHA, K.B.F.; DANTAS FILHO, A.M. et al. Repercussões do tempo operatório em pulmões de ratos idosos. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n.1, p. 40-44, 2003.

MENEGUELLO, M.O.; COSTA ROSA, L.F.B.P. Efeito da restrição calórica e do exercício aeróbio em Linfócitos e macrófagos de ratos envelhecidos. **Rev. Paul. Educ. Fis.**, v.16, n.1, p. 16-26, 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, p. 426-428, 1959.

MILLER, J.W.; ROSENBERG, I.H. Nutritional factors in physical and cognitive functions of elderly people. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.55, p. 1937S-1943S, 1992.

MONTI, J.C.; JOST, R. Emulgateurs peptidiques obtenus par l'hydrolyse enzymatic partielle de la protéine sérique du lait. **La Lait.**, v.62, p.521-530, 1982.

MONTI, J.C.; JOST, R. Solubilization of cheese whey protein by tripsin and a process to recover the active enzyme from digest. **Biotech. Bioeng.**, v.20, p.1173-1185, 1978.

MONTI, R.; BASILIO, C.A.; TREVISAN, H.C.; CONTIERO, J. Purification of papain from fresh látex of *Carica papaya*. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.43, n.5, p.01-507, 2000.

MORLEY, J.E. et al. Sarcopenia: from the Chicago meetings. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 137, p. 231-243, 2001.

MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Crit. Rev. Food Sci.**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.

MORR, C.V. Functional characteristics of whey protein concentrates. **J. Dairy Sci.**, v.38, n.2 p.1173-1185, 2006.

MOUGIOS, V. Muscle contraction. In: **Exercise Biochemistry (org.)**. Human Kinetics, 2006. p, 105-119.

NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. **Electrophoresis.**, v. 9, p. 255- 256, 1988.

NISSEN, S. **Modern Methods in Protein Nutrition and Metabolism**. San Diego, 1992. 345p.

NOVAK, L.P. Aging, total body potassium, fat free-mass, and cell mass in males and females between ages 18-85 years. **J. Gerontol.**, v.27, n.4, p. 438-443, 1972.

PACHECO, M.B. Efeito de um hidrolisado de proteínas do soro de leite e de seus peptídeos na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos. **Rev. Nutr.** v.19, n.1, p. 47-55, 2005.

PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE PRODUTOS LÁCTEOS. Funcionais e Nutracêuticos, 2008. Disponível em:< http://www.insumos.com.br/funcionais_e_nutraceuticos/materias/81.pdf>. Acesso em: 07. out. 2009.

PEREA, A. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: Applications in industrial whey bioconversion processes. **Enzyme Microb. Technol.**, Spain, v. 15, p. 418-423, 1993.

PEREA, A.; UGALDE, U. Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. **Enzyme and Microb. Technol.**, Spain, n.18, p. 29- 34, 1996.

PETERSON, G.L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, rosebrough, Farr and randall. **Anal. Biochem.**, v.100, p.201-220, 1979.

PHILIPP, S. T. Pirâmide Alimentar adaptada: Guia para a escolha dos alimentos. **Rev. Nutr.** Campinas, v. 12, n.1, p. 65-80, 1999.

PORTO, C.C. **Semiologia médica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 6 ed., 2009. 1340p.

RICHARDS, N. S. P. S. Rational use of milk whey (Port.). **Indústria de Laticínios**, p.67-69, 1997.

SABINO, A.W.; MENDONÇA, D.B.; RODRIGUES, D. S. et al. Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. **Biomacromol.**, v. 9, p. 2170-2179, 2008.

SAMPAIO, I. B. M. Delineamento estatístico em pesquisa com seres humanos e animais. In: Simpósio COEP/CETEA, Minas Gerais, 2005.

SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J.R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicerídeos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.39, n.4, 2003.

SCOPES, K. R. **Protein Purification**. 3 ed. New York: Springer, 1994. 380p.

SHAH, N.P. Effects of milk- derived bioactives: An overview. **Braz. J. Nutr.**, v. 84, p. S3-S10, 2000.

SILVA, M. C. O processo de envelhecimento no Brasil: desafios e perspectivas. **Textos sobre envelhecimento.**, Rio de Janeiro, v.8, n.1, 2005.

SILVA, T. A. A.; JUNIOR, A. F.; PINHEIRO, M. M. et al. Sarcopenia associada ao envelhecimento: Aspectos etiológicos e opções terapêuticas. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46, n.6, p. 391-397, 2006.

SILVESTRE M.P.C. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. **Food Chem.**, v.60, n.2, p.263- 271, 1997.

SOUZA JR, R.; LOPES, G. P. ; TARDIOLI, P.W. et al. Kinetic Model for Whey Protein Hydrolysis by alcalase Multipoint-Immobilized on agarose Gel Particles. **Braz. J. Chem. Engin.**, Campinas, SP, Brasil, v. 21, n. 02, p. 147-154, 2004.

SOUZA, E.M.T., ARRUDA, S.F.; BRANDÃO, P.O. et al. Electrophoretic analysis to detect and quantify whey in milk and dairy beverages. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 1-9, 2000.

STANTON, C.; FITZGERALD, R.J.; DONNELLY, W.J. et al. Development of technologies for separation and functional improvement of individual milk protein fractions. **The Dairy Prod. Res. Centre.**, Moorepark, Fermoy, 2002. Disponível em: <www.tegasc.ie/research/reports/dairyproduction/4216/eopr-4216.htm> Acesso em: 04 set. 2009.

STURM, K.; MACINTOSH, C.G.; PARKER, B.A. et al. Appetite, Food Intake, and plasma concentrations of cholecystokinin, ghrelin, and other gastrointestinal hormones in undernourished older women and well-nourished young and older women. **J. Clin. Endocr. Metabol.** v.88, n.8, p.3747-3755, 2003.

TARDIOLI, P. W; SOUZA JR, R. ; GIORDANO, R.C. et al. Kinetic model of the hydrolysis of polypeptides catalyzed by alcalase immobilized on 10%-glyoxyl-agarose . **Enzym. Microbial. Technol.**, Reino Unido, v. 36, n. 4, p. 555-564, 2005.

TARDIOLI, P.W. Design of New Immobilized- Stabilized Carboxipeptidase A Derivative for Production of Aromatic Free Hydrolysates of Proteins. **Biotechnol. Prog.**, Madrid, n. 19, p. 565- 574, 2003.

TARDIOLI, P.W. Hydrolysis of proteins by Immobilized stabilized Alcalase- Glyoxil Agarose. **Biotechnol. Prog.**, Madrid, n. 19, p. 352- 360, 2003.

TONON, C.R.; MELLO, M.A.R.; DIAS, T.F.; ANARUMA, C.A. Teor Protéico da dieta e crescimento muscular em ratos submetidos ao treinamento anaeróbio. **Motriz**, v. 7, n.2, p. 69-74, 2001.

WU, Z.; JIANG, G. Purification and Characterization of Trypsin-like Enzymes from *Neomysis Japonica* using Bapna as substrate. **Int. J. Peptide Res. Therap.**, v.14, n.2, p. 75-80, 2008.

