

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO MESQUITA FILHO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

DEFESA DE DOUTORADO

Proteínas do soro de queijo: hidrólise e formulação de suplemento alimentar para ratos Wistar

Ozeni Amorim Barbosa

Co-Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Goulart

Orientador:

Prof. Dr. Rubens Monti

Araraquara, SP

2013

Ozeni Amorim Barbosa

**Proteínas do soro de queijo: hidrólise e
formulação de suplemento alimentar para
ratos Wistar**

**Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” para obtenção do título de
Doutor em Alimentos e Nutrição, área de
Ciência dos Alimentos.**

Prof. Dr. Rubens Monti

ARARAQUARA

2013

Ficha Catalográfica

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

Barbosa, Ozeni Amorim
B238p Proteínas do soro de queijo: hidrólise e formulação de suplemento alimentar para ratos Wistar / Ozeni Amorim Barbosa. – Araraquara, 2012
93 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
Coorientador: Antonio Jose Goulart

1. Biodisponibilidade. 2. Dialisabilidade. 3. Peptídeos bioativos. 4. Proteínas do soro do queijo. 5. Suplementação de dieta. I. Monti, Rubens, orient. II. Goulart, Antonio Jose, coorient. III. Título.

CAPES: 50700006

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
Capítulo 1: Revisão de literatura	18
1. Características do soro de queijo	18
2. Proteínas do soro: características e propriedades funcionais	19
2.1. β -Lactoglobulina	20
2.2. α -Lactoalbumina	20
2.3. Soro Albumina Bovina	21
2.4. Imunoglobulinas (Ig's)	21
2.5. Glicomacropéptido	22
2.6. Lactoferrina e lactoperoxidase	22
3. Peptídeos bioativos - "PBAs"	22
4. Dialisabilidade	23
Capítulo 2: Avaliação in vitro da biodisponibilidade das proteínas do soro de queijo e de seus hidrolisados	26
1. INTRODUÇÃO	26
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Material	29
3.2. Metodologia	29
3.2.1. Preparação do soro	29
3.2.2. Dosagem de gordura	29
3.2.3. Dosagem de açúcar redutor	30
3.2.4. Dosagem de proteínas totais	30
3.2.5. Hidrólise Enzimática das proteínas do soro de queijo	30
3.2.6. Análise dos hidrolisados por SDS-PAGE e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE	32
3.2.6.1. Análise dos hidrolisados por SDS-PAGE	32
3.2.6.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE	32
3.2.7. Dialisabilidade	32
3.2.7.1. Método enzimático in vitro para determinação da proteína dialisada	32
3.2.7.2. Tratamento das membranas de diálise	33
3.2.7.3. Determinação da acidez dos digestos gástricos dos hidrolisados	34
3.2.7.4. Simulação da digestão gástrica e intestinal dos hidrolisados	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Dosagem de açúcar redutor no soro de queijo	38

4.2. Dosagem de proteínas totais das amostras de soro de queijo não hidrolisado (NH), com médio teor de hidrólise (MTH) e alto teor de hidrólise (ATH) em diferentes estágios da digestão gastrointestinal in vitro	38
4.3. Caracterização do perfil peptídico após a digestão gastrointestinal in vitro do soro de queijo não hidrolisado (NH), com médio teor de hidrólise (MTH) e alto teor de hidrólise (ATH)	40
4.4. Caracterização das proteínas e dos digestos gastrointestinais de amostras do soro de queijo não hidrolisado (NH), com médio teor de hidrólise (MTH) e alto teor de hidrólise (ATH) através de SDS-PAGE	42
4.4.1. SDS-PAGE – Soro de queijo não hidrolisado (NH)	42
4.4.2. SDS-PAGE – Soro de queijo com médio teor de hidrólise (MTH)	44
4.4.3. SDS-PAGE – Soro de queijo com alto teor de hidrólise (ATH)	45
4.5. Caracterização de aminoácidos de digestos gastrointestinal do soro de queijo não hidrolisado (NH), com médio teor de hidrólise (MTH) e com alto teor de hidrólise (ATH) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	46
4.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE do soro de queijo não hidrolisado (NH)	46
4.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE do soro de queijo com médio teor de hidrólise (MTH)	56
4.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE do soro de queijo com alto teor de hidrólise (ATH)	60

Capítulo 3: Administração in vivo de suplemento alimentar à base de proteínas de soro de queijo e de seus hidrolisados: análises bioquímicas.

1. INTRODUÇÃO	69
2. OBJETIVOS	70
2.1. Objetivo Geral	70
2.2. Objetivos Específicos	70
3. MATERIAL E MÉTODOS	70
3.1. Material	70
3.1.1. Animais	70
3.1.2. Suplemento	71
3.2. Análise do protocolo experimental pelo comitê de ética	71
3.3. Métodos	71
3.3.1. Administração dos hidrolisados das proteínas do soro de queijo como suplemento nutricional	71
3.3.2. Análise da massa muscular (peso), ingestão de água e ração: períodos de manutenção e experimental	72
3.3.3. Suplementação	72
3.3.4. Ambiente de contenção dos animais e limpeza das contenções	72
3.3.5. Estabelecimento do tamanho da amostra, número de grupos experimentais e administração do suplemento alimentar	73
3.3.6. Sacrifício dos animais	74
3.3.7. Extração de sangue, órgãos, músculos e ossos	74
3.3.8. Análise sanguínea – Exames bioquímicos	75
3.3.9. Análise da massa do fêmur, cálcio ósseo, proteína do músculo gastrocnêmio	75
3.3.10. Análise estatística dos dados	76
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76

4.1. Massa muscular (peso), ingestão de água e consumo de ração suplementada com proteínas integrais do soro de queijo e proteínas com médio e alto teor de hidrólise	76
4.2. Análises: Proteína do músculo gastrocnêmio e cinzas do fêmur direito	77
4.3. Exames bioquímicos	77
4.3.1. Glicemia em jejum e Cálcio ósseo	78
4.3.2. Triglicérides, Colesterol total e HDL.	79
4.3.3. Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT).	80
4.3.4. Creatinina e Ureia	82
4.3.5. Proteínas totais e Albumina sérica	83
4.3.6. Fósforo e Cálcio sérico	83
4.3.7. Músculos: Soleus, Tibial e EDL	84
5. CONCLUSÕES	86
6. REFERÊNCIAS	88

Lista de Ilustrações

Ilustração 1.	Hidrólises das proteínas do soro de queijo (Marques, 2009 adaptado por Barbosa, O. A.).....	31
Ilustração 2.	Procedimento para determinação do número de equivalentes em mols para titulação do digesto gástrico.....	34
Ilustração 3.	Protocolo utilizado na simulação in vitro da digestão gastrointestinal através da técnica da dialisabiliidade.....	36
Ilustração 4.	Obtenção dos digestos gástricos e intestinais.....	37

Lista de Figuras

Capítulo 2

Figura 1.	Análise por SDS-PAGE 15 % do soro de queijo não hidrolisado (NH) e das amostras retiradas durante a digestão gastrointestinal: DG-NH (digesto gástrico); DI _{ext} NH (digesto intestinal externo); DI _{int} NH (digesto intestinal interno); P (padrão de massa molar).....	43
Figura 2.	Onde P representa o padrão de massa molar (1,5 µL); NH - soro não hidrolisado (20 µL); DI _{ext} MTH - Digesto gastrointestinal externo (30µL); DI _{int} MTH - digesto gastrointestinal interno (30 µL).....	44
Figura 3.	Onde P representa padrão de massa molar (1,5 µL); NH: Soro de queijo não hidrolisado (20 µL); DI _{ext} ATH: Digesto intestinal externo (30 µL); DI _{int} ATH: Digesto intestinal interno (30 µL).....	45
Figura 4.	CLAE do soro de queijo não hidrolisado (NH), “A” representa a área sob a curva e as demais condições de coluna e solventes utilizados foram descritas no texto.....	47
Figura 5.	CLAE do soro de queijo não hidrolisado após a digestão gástrica (DG-NH). “A” representa a área sob a curva e as demais condições de coluna e solventes utilizados foram descritos no texto.....	48
Figura 6.	CLAE do soro de queijo não hidrolisado após a digestão intestinal externa (DI _{ext} NH). “A” representa a área sob a curva e as demais condições de coluna e solventes utilizados foram descritos no texto....	49
Figura 7.	CLAE do soro de queijo não hidrolisado após digestão gastrointestinal interna (DI _{int} NH). “A” representa a área sob a curva e as demais condições de coluna e solventes utilizados foram descritas no texto.....	50
Figura 8.	Análise dos padrões de aminoácido por CLAE. Foram injetados 50 µL da amostra (100 nM para cada aminoácido).....	53
Figura 9.	Análise dos aminoácidos do digesto gastrointestinal externo (DI _{ext} NH). Foram injetados 50 µL da amostra.....	54
Figura 10.	Análise do digesto gastrointestinal interno (DI _{int} NH) por CLAE.....	55
Figura 11.	Análise dos padrões de aminoácidos (pad11122010c) por CLAE.....	57
Figura 12.	Análise do digesto gastrointestinal externo do soro com médio teor de hidrólise (DI _{ext} MTH) por CLAE.....	58
Figura 13.	Análise do digesto gastrointestinal interno (DI _{int} MTH) por CLAE.....	59
Figura 14.	Análise do digesto gastrointestinal externo do soro com alto teor de hidrólise (DI _{ext} ATH) por CLAE.....	61
Figura 15.	Análise do digesto gastrointestinal externo do soro com alto teor de hidrólise (DI _{int} ATH) por CLAE.....	62

Capítulo 3

Figura 1.	Análise dos resultados obtidos nas dosagens de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em ratos com dieta suplementada com proteínas de soro de queijo integrais e com médio e alto teor de hidrólise.....	81
Figura 2.	Gráfico das médias de dosagens de fósforo e cálcio sérico em ratos com dieta suplementada com proteínas de soro de queijo integrais e com médio e alto teor de hidrólise.....	84

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1.	Dosagem de proteínas em diferentes estágios da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> do soro de queijo NH.....	39
Tabela 2.	Dosagem de proteínas em diferentes estágios da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> dos soros de queijo MTH.....	39
Tabela 3.	Dosagem de proteínas em diferentes estágios da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> do soro de queijo ATH.....	40
Tabela 4.	Quantificação de peptídeos e aminoácidos do soro de queijo não hidrolisado (NH) após a digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	41
Tabela 5.	Quantificação de peptídeos e aminoácidos do soro de queijo com médio teor de hidrólise (MTH) após a digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> .	41
Tabela 6.	Quantificação de peptídeos e aminoácidos do soro de queijo com alto teor de hidrólise (ATH) após a digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	42
Tabela 7.	Áreas das curvas apresentadas nas Figuras 4, 5, 6 e 7.....	51
Tabela 8.	Área total referente aos aminogramas apresentados nas figuras 8, 9 e 10.....	56
Tabela 9.	Resumo dos aminogramas obtidos utilizando-se os suplementos dialisabilidade com e sem as enzimas gastrointestinais.....	64
Tabela 10.	Concentração determinadas de aminoácidos nas diferentes amostras de soro (Não hidrolisado – NH, com médio teor de hidrólise - MTH e com alto teor de hidrólise) os quais sofreram ação das enzimas gastrointestinais e a absorção pela membrana (dialisabilidade), obtidas a partir de aminogramas.....	65
Tabela 11.	Concentração de aminoácidos determinadas nas amostras de soro com médios e altos teores de hidrólise (MTH e ATH) com diferentes tratamentos (com ou sem ação das enzimas gastrointestinais) e somente absorção pela membrana de diálise, obtidas a partir de aminogramas.....	67

Capítulo 3

Tabela 1.	Médias de massa muscular e ingestão de água dos animais.....	76
Tabela 2.	Médias das análises de proteínas do músculo gastrocnêmio direito e cinzas do fêmur direito dos animais.....	77
Tabela 3.	Perfil glicêmico e quantificação de cálcio ósseo em ratos Wistar alimentados com dieta suplementada com proteínas integrais e hidrolisados de proteínas com alto e médio teor de hidrólise.....	79
Tabela 4.	Perfil lipídico de ratos Wistar alimentados com dieta suplementada com proteínas integrais e hidrolisados de proteínas com alto e médio teor de hidrólise.....	80
Tabela 5.	Análise dos resultados obtidos nas dosagens de creatinina e ureia em ratos com dieta suplementada com proteínas de soro de queijo integrais e com médio e alto teor de hidrólise.....	82
Tabela 6.	Médias de dosagens de proteínas totais e albumina sérica em ratos com dieta suplementada com proteínas de soro de queijo integrais e com médio e alto teor de hidrólise.....	83
Tabela 7.	Resultados das médias da matéria seca dos músculos soleus, tibial e EDL em ratos em ratos com dieta suplementada com proteínas de soro de queijo integrais e com médio e alto teor de hidrólise.....	85

Lista de abreviaturas

ACN -	Acetonitrila
AIN 93M -	American Institute of Nutrition
AST -	Aspartato aminotransferase
ALT -	Alanina aminotransferase
ATH -	Alto Teor de Hidrólise
BCAAS -	Aminoácidos de cadeia ramificada
CCK -	Colecistocinina
CLAE -	Cromatografia líquida de alta eficiência
DBO -	Demanda Biológica de Oxigênio
DG -	Digesto Gástrico
DG-ATH	Digesto Gástrico com Alto Teor de Hidrólise
DG-MTH	Digesto Gástrico com Médio Teor de Hidrólise
DNS -	Ácido dinitrosalicílico
DRI -	Dietary Reference Intakes
FAO -	Food Agriculture Organization
GMP -	Glicomacropéptido
HDL -	High-density lipoprotein
IBGE -	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kDa -	Kilodaltons
MTH -	Médio Teor de Hidrólise
NH -	Não Hidrolisado
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PB -	Proteína Bruta
TFA -	Ácido trifluoracético
TGO -	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP -	Transaminase glutâmica pirúvica

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, acima de tudo, por se fazer sempre presente na minha vida, dando-me coragem nos momentos difíceis e persistência para vencer mais esse desafio;

Ao meu orientador Prof. Dr. Rubens Monti e co-orientador Dr. Antonio José Goulart pela orientação, apoio, confiança e pelas valiosas contribuições para realização deste trabalho e para meu crescimento profissional;

Ao Instituto Federal do Triângulo Mineiro – IFTM, Campus Uberaba-MG, que me proporcionou mais essa conquista profissional;

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas – DAN e aos professores do programa pelo conhecimento adquirido nesses três anos;

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite e pelas contribuições ao trabalho;

Ao meu pai Olintho e minha mãe Valdeci, meus irmãos Bianca, Othon e Olintho que foram sempre meus grandes incentivadores nessa conquista, por todo apoio, carinho e compreensão pelos momentos ausentes. Amo vocês!;

Aos meus amados sobrinhos Maria Eduarda, Taiane, Othinho e Renan que são as verdadeiras riquezas da minha vida. Amo vocês!;

Aos meus cunhados Fátima, Vânia e Rodolfo pela torcida e carinho;

À Dra Thais Borges, grande responsável pelo “início” desse doutorado. Não sei como teria sido sem a sua preocupação e ajuda.;

As minhas queridas amigas e companheiras Vera, Cléia, Estelamar e Marlene;

Aos amigos do “Laboratório mais feliz” da UNESP, em especial a Ju, Thais, Ana e Antonio pelo carinho e acolhida;

As “Meninas” da república: Jaqueline, Paula, Luana e, em especial a Renata e a Vânia pela preciosa ajuda ao final do experimento;

As técnicas de laboratório Lica, Adriana e Valéria pela enorme ajuda no experimento;

A Mariana Monti e Carolina Martins Jordão Miranda, acadêmicas do Curso de Medicina Veterinária da UNESP – Campus Jaboticabal;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O soro proveniente da fabricação de queijo tem sido utilizado para fins diversos, sendo uma importante fonte proteica de baixo custo apresentando alta percentagem de aminoácidos essenciais. Nesse contexto, a hidrólise de suas proteínas melhora a biodisponibilidade e permite que peptídeos bioativos formados sejam absorvidos. O objetivo desse estudo foi verificar a biodisponibilidade *in vitro* das proteínas do soro de queijo e seus hidrolisados com diferentes teores de hidrólise e o efeito da suplementação da dieta de ratos wistar adultos com esses hidrolisados. As soroproteínas foram submetidas a tratamento com as proteases pepsina, quimotripsina, carboxipeptidase-A e tripsina em pH e temperatura específicos, produzindo suplementos com médio (MTH) e alto (ATH) teor de hidrólise. A biodisponibilidade dos hidrolisados foi analisada por meio da simulação da digestão gástrica e duodenal. Os peptídeos e aminoácidos foram analisados por CLAE e o perfil proteico por SDS-PAGE. O perfil sérico, cálcio ósseo e a proteína muscular dos animais foram avaliados após suplementação com proteínas integrais e hidrolisados de alto e médio teor por um período de 43 dias. A biodisponibilidade de aminoácidos foi maior nos hidrolisados MTH e ATH após a simulação da digestão gastrointestinal, indicando que a hidrólise das soroproteínas pode aumentar a absorção destes compostos. O perfil sérico dos ratos apresentou alterações significativas principalmente em relação à glicemia após suplementação da dieta, sendo que os animais que receberam o suplemento MTH apresentaram uma grande redução nesse parâmetro e também excelente resultado em relação ao HDL, cálcio sérico e massa muscular. Embora de forma menos expressiva, os animais que receberam o suplemento ATH apresentaram resultados satisfatórios para fósforo sérico e proteínas totais. Desta forma, o suplemento MTH apresentou melhores resultados em relação à biodisponibilidade quando utilizado na suplementação da dieta dos ratos, sendo que seu excelente desempenho em relação à glicemia, HDL, cálcio sérico e massa muscular está relacionado a uma maior concentração de peptídeos, que podem apresentar importantes propriedades bioativas.

Palavras chave: biodisponibilidade, dialisabilidade, peptídeos bioativos, proteínas do soro do queijo, suplementação de dieta.

SUMMARY

The whey from cheese production has been used for various purposes and it is an important low cost protein source with high proportion of essential amino acids. In this context, the hydrolysis of its proteins improves the bioavailability and allows the absorption of bioactive peptides formed. The aim of this research was to determine the *in vitro* bioavailability of whey proteins and their hydrolysates with different hydrolysis levels and the effect of supplementing the diet of adult Wistar rats with these hydrolysates. Whey proteins were subjected to treatment with proteases pepsin, trypsin, chymotrypsin, and carboxypeptidase A in specific pH and temperature, producing supplements with medium (MTH) and high (ATH) content of hydrolysis. The hydrolysates bioavailability was analyzed by simulating the gastric and duodenal digestion. Peptides and amino acids were analyzed by HPLC and protein profile by SDS-PAGE. The animals serum profile, bone calcium and muscle protein were evaluated after supplementation with integral proteins, high and medium hydrolyzed levels over a period of 43 days. The amino acid bioavailability was greater in hydrolysates MTH and ATH after simulating gastrointestinal digestion, indicating that the hydrolysis of whey proteins may increase the absorption of these compounds. The serum profile of the rats showed significant changes mainly related to glucose after dietary supplementation, and the animals that received the MTH supplement showed a large reduction in this parameter and also excellent results compared to HDL, serum calcium and muscle mass. The animals that received the ATH supplement showed satisfactory results for serum phosphorus and total protein. Thus, MTH supplement showed better results in terms of bioavailability and when used how supplement, and its excellent performance with respect to glucose, HDL, serum calcium and muscle mass can be related to a higher concentration of peptides, which can provide important bioactive properties.

Keywords: bioavailability, dialyzability, bioactive peptides, whey protein, dietary supplementation

INTRODUÇÃO

Entre 2000 e 2008, enquanto a produção mundial de leite de vaca cresceu em média 2,1% ao ano, no Brasil esse crescimento foi de 4,0% ao ano. Em 2008, o Brasil produziu 27.579.383 litros de leite (FAOSTAT, 2010). Grande parte desse leite é destinada a produção de queijos e, segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias Queijo – ABIQ, em 2009 no Brasil foram produzidas aproximadamente 700 mil toneladas de queijo.

Segundo Richards (2002), o descarte do soro, um subproduto da fabricação de queijos, ainda representa uma preocupação por sua alta capacidade de poluição ambiental, mas por outro lado, por possuir uma qualidade indiscutível no fornecimento de proteína de alto valor biológico devido à presença de aminoácidos essenciais, já é considerado como um coproduto e matéria-prima de baixo custo em diversas aplicações industriais como, por exemplo, o soro em pó, proteína do soro, lactose, ácido lático, vinagre e alimentos como concentrado proteico (CPS) e isolado proteico do soro (IPS) (TORRES, 2005; SIQUEIRA et al., 2002; PACHECO et al., 2005).

A composição do soro varia em função do queijo produzido, mas, em média, é constituído basicamente de 93% de água e 7% de matéria seca; deste total 71% são de lactose, 10% de proteína bruta (PB), 12% de gordura e 11% de sais minerais (LIZIEIRE e CAMPOS, 2000).

As proteínas do soro somam aproximadamente 20% das proteínas totais do leite, sendo os 80% restantes representados pelas caseínas. Elas são definidas como proteínas que permanecem solúveis após a coagulação das caseínas em pH 4,6 a 20°C. As principais proteínas do soro são a α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulinas, albumina sérica bovina (BSA) e glicomacropéptido. Presentes em menor quantidade, mas comercialmente importantes estão a lactoferrina e a lactoperoxidase (DOULTANI, TURHAN e ETZEL, 2004).

A hidrólise enzimática de polímeros em alimentos, como as proteínas, é um processo suave que ocorre em uma série de estágios sem a degradação de outros componentes do meio e que permite o controle da funcionalidade do produto final através da especificidade das enzimas utilizadas (MONTI e JOST, 1978). Como exemplo dessas enzimas, 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 a relação nitrogênio amino/nitrogênio total (GUADIX et al., 2000).

O processo de hidrólise das proteínas tem sido utilizado para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando, particularmente, as características de absorção das proteínas e procurando mantê-las na conformação original o tanto quanto possível (PACHECO et al., 2005).

Segundo Antunes (2003), numerosas pesquisas vêm demonstrando as qualidades nutricionais das proteínas solúveis do soro de queijo. Além de ser reaproveitado por hidrólise, o soro de queijo pode sofrer um processo de separação ou purificação de suas proteínas e constituir, dessa forma, outros subprodutos como, por exemplo, marcadores de massa molecular, podendo ainda, ser aplicado na formulação de alimentos com propriedades funcionais (ex: α -lactoalbumina que tem atividade opiácea ou β -lactoglobulina que tem atividade anti-hipertensiva e opiácea) (BARÓ et al., 2001 e COSTA et al., 2005). 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).

Quando se fala em nutrição, a biodisponibilidade de nutrientes é uma condição importante, pois seu metabolismo pode variar conforme as condições gastrointestinais, os diferentes tipos de alimentos e os compostos presentes nestes. Tais fatores são muito importantes, uma vez que a combinação entre os alimentos pode influenciar a biodisponibilidade de nutrientes essenciais para a saúde (ROMARIS-HORTAS et al., 2011); BERMEJO et al., 2002). Ainda segundo esses autores, sabe-se que nem todas as substâncias ingeridas apresentam a mesma facilidade de absorção e digestão, uma vez que a disponibilidade de nutrientes depende da integração de vários processos, tais como: digestão, absorção, transporte, utilização e eliminação. De maneira bem geral, a biodisponibilidade de aminoácidos e pequenos peptídeos, podem ser definidos como a proporção ou extensão de suas utilizações pelo sistema biológico.

Dentro desse contexto e visando a sustentabilidade do meio ambiente e ao mesmo tempo promover uma melhor aplicabilidade do soro de queijo, esse trabalho teve como objetivo principal a obtenção, em escala laboratorial, de hidrolisados com médio e alto teor

de hidrólise das proteínas contidas neste coproduto, utilizando-se para isso enzimas proteolíticas comerciais. Após a obtenção desses hidrolisados, os mesmos foram submetidos a ensaios de dialisabilidade, onde as amostras foram submetidas à digestão gastrointestinal e seus produtos absorvidos em membrana de diálise com poro controlado. Após estas etapas do experimento, alíquotas foram submetidas à análise de proteínas pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972), análises por eletroforese em condições desnaturantes – SDS PAGE e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As proteínas do soro de queijo integrais e seus hidrolisados foram administrados por um período de 43 dias a ratos Wistar machos com idade de 3-4 meses e peso de 150-200 g adquiridos do biotério da UNESP- Campus Botucatu. Após esse período os ratos foram eutanasiados, observando-se para que todos os procedimentos fossem cuidadosamente realizados conforme normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e com aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo parecer N°34/2010. Após a coleta do sangue, também foram extraídos de cada animal, os músculos soleus, Extensor Digitorum Longus (EDL), tibial e gastrocnêmio, os ossos fêmures, rins e fígado, acondicionados de forma apropriada até a análise histológica dos mesmos, com o objetivo de verificar as possíveis alterações causadas pelo suplemento nutricional administrado a esses animais.

CAPÍTULO 1
Revisão de Literatura

CAPÍTULO 1: Revisão de literatura

1. Características do soro de queijo

O soro de queijo, considerado como um subproduto da indústria queijeira é constituído aproximadamente de 93 % de água e somente 6,9 % de matéria seca. Dessa matéria seca, 5 % de lactose; de 0,7 % a 0,9 % de proteínas, 0,3 a 0,5 % de gordura; 0,2 % de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas (GONZÁLEZ-MARTINNEZ et al., 2002; ABREU, 2005 e CALDEIRA et al., 2010). A composição e o tipo de soro produzido na indústria de laticínios variam em função dos processos tecnológicos empregados, do leite utilizado e do tipo de queijo fabricado (FURTADO e POMBO, 1979; MARWAHA e KENNEDY, 1988). Os principais tipos de soro são: soro doce o qual é obtido por coagulação enzimática e o soro ácido obtido por coagulação ácida (KOSIKOWSKI, 1979). O soro de queijo é considerado um dos principais poluentes da indústria de laticínios, e quando descartado diretamente em rios ou esgoto público, fato que a legislação ambiental não permite, causa sérios danos ao meio ambiente (Resolução CONAMA Nº 357/05). De acordo com Serpa et al., (2009), dependendo do processo utilizado em sua elaboração, este subproduto apresenta uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) entre 30.000 a 60.000 mg de O₂/L e uma demanda química de oxigênio (DQO) de 50.000 a 80.000 mg de O₂/L. Dessa forma, uma destinação incorreta do soro de queijo pode provocar sérios problemas ambientais como a poluição das águas e o comprometimento da estrutura físico-química do solo, porém, de acordo com Ribeiro (2000) o soro, que antes era visto como um subproduto da indústria de laticínios e com uma alta capacidade poluidora, pode ser considerado como uma matéria prima rica e nobre do ponto de vista nutricional, por seu alto teor de proteínas e vitaminas. Produtos tais como soro em pó, proteína do soro, queijo, lactose, ácido láctico, álcool, vinagre, probióticos e alimentos especiais (concentrado proteico, bebidas etc.) podem ser obtidos a partir dessa matéria prima.

2. Proteínas do soro: características e propriedades funcionais

As proteínas do soro do queijo apresentam uma estrutura globular contendo algumas pontes dissulfeto, que lhes conferem estabilidade estrutural. O soro contém as seguintes proteínas: β -lactoglobulina (BLG), α -lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glicomacropeptídeos (GMP), lactoferrina e lactoperoxidase. Essas frações podem variar em tamanho, massa molecular e função, fornecendo às proteínas do soro características especiais (KINSELLA, 1989; AIMUTIS, 2004).

As soroproteínas contêm alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada como valina, leucina e isoleucina. Segundo Walzenr et al.,(2002) e Ha e Zemel et al. (2003), a alta concentração do aminoácido leucina é de grande interesse pois tem sido atribuído a ele a função de iniciador da síntese proteica muscular. Além disso, também apresenta em excesso os aminoácidos metionina, isoleucina, lisina e treonina, o que torna as proteínas do soro como efetivos suplementos alimentares quando comparados a proteínas vegetais, onde se apresentam deficientes nestes aminoácidos (WALZENR et al., 2002).

As soroproteínas apresentam todos os aminoácidos essenciais em excesso, exceto pelos aromáticos fenilalanina e tirosina, os quais não aparecem em quantidade excessiva, mas atendem as recomendações estabelecidas pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (Food and Agriculture Organization/World Health Organization - FAO/WHO, 2010). Ainda segundo Sgarbieri (2004), o soro de queijo apresenta elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina. De acordo com Perea e Ugalde (1996), as proteínas de maior concentração e que representam o componente de maior valor agregado por kg de soro são as α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, correspondendo a 55% das proteínas.

Correspondendo a cerca de 20% das proteínas do leite, as soroproteínas são altamente digeríveis e por isso, muito rapidamente absorvidas pelo organismo, o que estimula a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais, de igual modo, os seus derivados são também mais facilmente digeríveis que qualquer outra proteína láctea (SGARBIERI, 2004; ABREU 2005).

2.1. β -Lactoglobulina

A β -lactoglobulina (β -Lg) em relação à quantidade apresentada (45,0%-57,0%) do conteúdo proteico total é considerada a principal proteína do soro. Dentre as soroproteínas, apresenta a maior concentração no leite bovino (3,2 g/L). Possui peso molecular de 18,4 kDa, o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo, portanto, absorvida no intestino delgado. Apresenta o maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), com cerca de 25,0% e é uma importante carreadora de retinol (pró vitamina A) materno para o filhote, função encontrada apenas nos animais, uma vez que essa proteína não está presente no leite humano. Por apresentar elevado valor nutricional e funcional, tem sido muito utilizada como ingrediente de novos alimentos e bebidas. Nos últimos anos, tem sido alvo de muitos estudos devido as atividades bioativas de seus peptídeos (DE WIT, 1998; HARAGUSHI, 2006, MADUREIRA, 2007, HERNÁNDEZ-LEDESMA, 2008).

2.2. α -Lactoalbumina

Em termos quantitativos a α -lactoalbumina (α -La) é a segunda principal proteína do soro de queijo bovino e a principal do leite humano. Representa de 15 % a 25 % do conteúdo total do soro, com peso molecular de 14,2 kDa é de rápida e fácil digestão. Possui quantidades expressivas dos aminoácidos lisina, leucina, treonina e cistina. Dentre as fontes proteicas alimentares, apresenta o maior teor do aminoácido triptofano (6%). A α -La é precursora da biossíntese de lactose no tecido mamário além de possuir a capacidade de se ligar a minerais, como cálcio e zinco, afetando de maneira positiva a sua absorção. Possui ação opióide (antagonista) e de inibição de ECA (enzima conversora de angiotensina) atuando no controle da hipertensão arterial (SHAH, 2000; LÖNNERDAL, 2003; SHANNON et al., 2003; FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS, 2012).

2.3. Soro Albumina Bovina

A soro albumina bovina (BSA) corresponde a cerca de 10% das proteínas do soro de queijo. Formada por uma cadeia polipeptídica constituída de aproximadamente 580 resíduos de aminoácidos. É um polipeptídeo de alto peso molecular (66 kDa), com pI em pH 4,7 a 4,8, rica em cistina (aproximadamente 6%), e relevante precursor da síntese de glutathione, um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, distribuído em todas as células do organismo humano e animal. Desempenha função metabólica como antioxidante celular, protegendo contra efeitos deletérios de radicais livres. Possui afinidade por ácidos graxos livres e outros lipídeos, favorecendo seu transporte na corrente sanguínea (BRINK, 1996; SALZANO, 2002; HARAGUSHI, 2006 e MARQUES, 2009).

2.4. Imunoglobulinas (Ig's)

São proteínas encontradas no soro sanguíneo e em outros fluidos corporais. Elas aparecem em concentração elevada no colostro e servem para transmitir imunidade passiva aos recém-nascidos. Produzidas pelos linfócitos B, as imunoglobulinas (Ig's) possuem elevado peso molecular, são glicoproteínas monômeros ou polímeros de uma molécula de quatro subunidades, onde, duas são leves, de massas moleculares de 20 kDa e duas são pesadas, de massas moleculares 50 a 70 kDa, ligadas por pontes dissulfetos. Apresentam diversas propriedades físicas, químicas e imunológicas. Conhecidas como anticorpos, são divididas em cinco grupos designados IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. No leite bovino, estão presentes essencialmente as classes IgG, IgM e IgA, sendo a IgG a principal, constituindo cerca de 80% do total, No leite humano, a IgA constitui a principal imunoglobulina com cerca de 90%. Suas principais ações biológicas residem na imunidade passiva e atividade antioxidante. Embora com funções próprias, são globalmente proteínas que se ligam de forma específica ao antígeno mediando dessa forma, a resposta imunológica (KORHONEN et al. 2000; HURLEY, 2003; LÖNNERDAL, 2003).

2.5. Glicomacropeptídeo

O glicomacropeptídeo (GMP) possui 64 resíduos de aminoácidos e massa molar de 6,75 kDa, encontrado no soro de queijo doce, é um composto biologicamente ativo, liberado a partir da κ -caseína pela ação da quimosina durante a coagulação do queijo. Apresenta alta carga negativa, que favorece a absorção de minerais pelo epitélio intestinal, e, assim como a fração β Lg, possui alto teor de aminoácidos essenciais (47%) (SHANNON et al., 2003).

2.6. Lactoferrina e lactoperoxidase

A lactoferrina e a lactoperoxidase são duas outras proteínas do soro que aparecem em pequena proporção no leite bovino, 0,1g/L e 0,03g/L, respectivamente. A lactoferrina, com massa molar de 80 kDa e ponto isoelétrico de 9,4, é capaz de ligar e transportar o ferro. Tem função antimicrobiana, antioxidativa, anticarcinogênica, antiinflamatória e regula o crescimento celular.

A lactoperoxidase com massa molar de 78 kDa e ponto isoelétrico de 9,6, possui amplas ações sendo a principal a de promover efeito antioxidante (FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS, 2012).

3. Peptídeos bioativos - “PBAs”

Além de sua importância nutricional, as proteínas do soro contêm várias sequências de aminoácidos com propriedades bioativas. A hidrólise dessas frações pode liberar peptídeos conhecidos como peptídeos biologicamente ativos (PBAs). Muitos deles já foram isolados e caracterizados, tendo sido observadas funções de modular respostas fisiológicas no organismo animal, como atividades imunomoduladora, antimicrobiana, opióide, antiviral, antiolesterolêmica, anticoagulante, antihipertensiva, anticoagulante, moduladora dos fatores de crescimento celular e antioxidantes (PIHLANTHO-LAPPALA, 2001;

GAUTHIER e POULOT, 2003; SGARBIERI, 2004; PACHECO et al., 2005; SINHA et al., 2007; SAINT-SAUVEURA et al., 2008). Além dos estudos envolvendo identificação e condições para a liberação dos peptídeos bioativos, há também estudos mostrando que estes peptídeos exercem varias atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* e que alguns deles possuem propriedades multifuncionais (FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS, 2012).

Para obtenção de hidrolisados de proteínas com elevada qualidade nutricional e propriedades desejáveis, a hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens em relação à hidrólise química, como por exemplo: controle do grau de hidrólise, especificidade, condições moderadas de ação, enzimas com custo moderado e disponibilidade comercial em larga escala, dentre outras, além do controle das condições hidrolíticas, como pH, temperatura, enzima, tempo de hidrólise, tipo e concentração do substrato (BIASUTTI, 2008). De acordo com Pattarin et al. (2010), para obtenção de peptídeos bioativos do soro do queijo, a hidrólise enzimática é geralmente considerada o método mais indicado, pois ela pode minimizar o impacto do pH e uso de temperatura extremas que podem levar à desnaturação proteica e perda de suas funções biológicas.

4. Dialisabilidade

Os termos bioacessibilidade e biodisponibilidade são muitas vezes utilizados como sinônimos, embora eles se refiram a conceitos diferentes. Bioacessibilidade se refere à fração de um contaminante/composto que é liberado a partir da matriz dos alimentos no trato gastrointestinal, disponível para a absorção intestinal. No entanto, biodisponibilidade se refere à parte de uma substância liberada a partir de alimentos que são absorvidos pelo intestino, e pode, por conseguinte entrar na circulação sistêmica (INTAWONGSE e DEAN, 2006). Segundo esses mesmos autores, estudos de biodisponibilidade podem ser realizados tanto *in vivo* como *in vitro*. Os estudos *in vivo* são menos comuns porque são difíceis de realizar, eticamente controversos e caros, já os métodos *in vitro* são simples, rápidos, baratos e precisos.

De maneira bem geral, a biodisponibilidade de aminoácidos e pequenos peptídeos, podem ser definidos como a proporção ou extensão de suas utilizações pelo sistema

biológico. Sabe-se que nem todas as substâncias ingeridas apresentam a mesma facilidade de digestão e absorção. Para estimar a biodisponibilidade de traços de elementos, de pequenos peptídeos e aminoácidos na nutrição humana, métodos *in vivo* e *in vitro* têm sido desenvolvidos. O método *in vitro* tem sido preferido para investigar a biodisponibilidade de metais, por ser um método baseado na simulação da digestão gástrica e intestinal (ROMARÍS-HORTAS et al., 2011).

A liberação de aminoácidos e peptídeos de pequena massa molecular na proporção recomendada depende da qualidade das proteínas e também das enzimas utilizadas na reação de hidrólise. Além de depender da composição do hidrolisado, podem também ser modulados pela biodisponibilidade, que por sua vez, está relacionada com alguns fatores como digestibilidade, qualidade dos aminoácidos, alguns efeitos metabólicos específicos, assim como, outros constituintes do alimento. Além disso, em pacientes alérgicos, a presença da proteína íntegra pode induzir uma reação imunomediada, ou seja, o estímulo do sistema imunológico causando algum tipo de hipersensibilidade. Em virtude dessa condição, a hidrólise enzimática parece ser o método mais adequado para a preparação de peptídeos feitos sob medida devido a sua grande disponibilidade comercial e custo moderado (POTIER e TOMÉ, 2008).

CAPÍTULO 2

Avaliação in vitro da

biodisponibilidade das proteínas do

soro de queijo e de seus hidrolisados

CAPÍTULO 2: Avaliação *in vitro* da biodisponibilidade das proteínas do soro de queijo e de seus hidrolisados

1. INTRODUÇÃO

As proteínas do leite se subdividem em duas frações: as caseínas que correspondem a 80% do total das proteínas do leite e as proteínas do soro que representam 20% do total. “Conhecidas como whey protein, elas são extraídas da porção aquosa do leite, gerada durante o processo de fabricação do queijo”. (HARAGUSHI et al., 2006).

As soroproteínas, como também são conhecidas, além de apresentarem todos os aminoácidos essenciais (FAO/WHO, 2010), apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina. Essas proteínas possuem um elevado valor biológico, devido ao seu alto conteúdo em aminoácidos livres essenciais, especialmente os de cadeia ramificada (SGARBIERI, 2004).

Para obtenção de hidrolisados de proteínas com elevada qualidade nutricional e propriedades desejáveis, a hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens em relação à hidrólise química, como por exemplo: controle do grau de hidrólise, especificidade, condições moderadas de ação, enzimas com custo moderado e disponibilidade comercial em larga escala, dentre outras, além do controle das condições hidrolíticas, como pH, temperatura, enzima, tempo de hidrólise, tipo e concentração do substrato (BIASUTTI, 2008).

Quando se busca prever a biodisponibilidade de compostos específicos presentes em alimentos, a dialisabilidade tem sido uma metodologia bastante utilizada, por ser uma técnica simples, rápida e bastante confiável, uma vez que pode anteceder a métodos *in vivo*, que são demorados, normalmente empregam técnicas caras e são de difícil execução (ARGYRI et al., 2009).

Os minerais, além de serem essenciais para a realização de inúmeros processos enzimáticos, exercerem funções na síntese de macronutrientes e em processos fisiológicos no organismo humano, porém, seu aproveitamento está diretamente relacionado aos componentes presentes nos alimentos. A biodisponibilidade de minerais pode ser definida

pela medida da proporção do total do elemento contido no alimento que é utilizado para a manutenção das funções normais do organismo (HARVEY, 2001).

Os métodos *in vitro* de avaliação da biodisponibilidade de minerais são relativamente simples, rápidos e baratos, relacionando-se com a biodisponibilidade *in vivo* e constituem-se numa simulação da digestão gástrica e duodenal, seguida de diálise. A proporção do elemento difundida através da membrana semipermeável, durante o processo, representa sua dialisabilidade, após um período de equilíbrio, sendo utilizado como estimativa da biodisponibilidade do nutriente (PUSHPANJALI e KHOKHAR, 1996; CHIPLONKAR et al., 1999). Para a biodisponibilidade de ferro e o zinco existe correlação significativa entre os métodos *in vitro* e *in vivo*, visto que os métodos *in vitro* reproduzem as condições do sistema digestório humano e são capazes de predizer os mecanismos de absorção de nutrientes (NARASINGA-RAO, 1994 e KAHYAOGU, 2006).

Nas últimas décadas, inúmeros estudos têm sido realizados sobre a biodisponibilidade de minerais e de outros micronutrientes presentes em alimentos e/ou algumas dietas específicas, cuja determinação tenha sido feita por métodos *in vitro* e *in vivo*. São alguns exemplos: Torre et al., (1991) ao estudarem os efeitos das fibras alimentares utilizando frações isoladas de fibra, para avaliar a disponibilidade de ferro, cálcio e zinco, por métodos *in vitro* e *in vivo*; Torre et al. (1995), ao estudarem as interações de Fe^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{3+} em dietas enterais através de métodos *in vitro*, simulando condições digestivas em diferentes concentrações de fibra solúvel e insolúvel nas dietas em diferentes pHs; Toba et al., (1999) ao compararem os efeitos dos componentes do leite na biodisponibilidade do cálcio, nos ratos em crescimento; Oliveira e Osório, (2005) ao estudarem sobre como o consumo de leite de vaca na primeira infância pode aumentar a incidência de anemia ferropriva em crianças, devido o alimento apresentar baixa biodisponibilidade e densidade para o ferro, excesso de proteínas e cálcio, além de poder interferir na absorção do ferro proveniente de outros alimentos; Ma et al., (2005) ao avaliarem o quanto a dieta chinesa, rica em cereais e leguminosas, como trigo, arroz, milho e soja interferiria na biodisponibilidade de cálcio, ferro e zinco. Gupta et al., (2006) ao avaliarem a biodisponibilidade de cálcio e ferro em vegetais folhosos, pelo método *in vitro* de diálise; Perales et al., (2006) ao avaliarem o efeito da biodisponibilidade do cálcio, ferro e zinco em amostras fortificadas ou não com cálcio, de leite de vaca, através dos métodos *in*

vitro do dialisado e do cultivo celular Caco-2; Perales et al., (2006) ao avaliarem a biodisponibilidade de zinco em fórmulas infantis, pelo método *in vitro* de diálise. Observa-se, nos trabalhos citados, que o estudo da biodisponibilidade em sua maioria avalia a absorção de minerais. Nesse estudo, o objetivo foi a avaliação da biodisponibilidade de proteínas *in vitro* e *in vivo* de nutrientes presentes nos suplementos a base de proteínas integrais e de hidrolisados com médio e alto teor de hidrólise, por meio da simulação da digestão gastrointestinal e da administração oral desses suplementos a ratos wistar jovens, por meio de exames bioquímicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a biodisponibilidade *in vitro* de nutrientes presentes nos suplementos a base de proteínas integrais e de hidrolisados com médio e alto teor de hidrólise, por meio da simulação da digestão gastrointestinal.

2.2. Objetivos Específicos

- Quantificar proteínas, lipídeos totais e lactose no soro de queijo.
- Obtenção de hidrolisados com médios e altos teores de hidrólise através de ensaios enzimáticos com enzimas proteolíticas comerciais.
- Analisar por meio de eletroforeses em condições desnaturantes (SDS PAGE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a eficiência das hidrólises.
- Simular experimentos de digestão gastrointestinal *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Proteínas do soro de queijo e hidrolisados obtidos no laboratório, através de hidrólise enzimática com enzimas proteolíticas comerciais.

3.2. Metodologia

3.2.1. Preparação do soro

Produtos químicos, salvo indicação em contrário, todos os reagentes utilizados foram das marcas Mallinckrodt, Merck®, Sigma® e Synth.

O soro de queijo foi produzido a partir do leite B (Cooperativa Dy Letto) e renina comercial de *Aspergillus niger* da marca Estrela a 0,6 % v/v e CaCl₂ 0,5 mol/L, 0,5 %. Essa mistura foi mantida em banho-maria sem agitação a 35 °C durante 60 min. Decorrido o tempo de coagulação, os sólidos foram separados através de filtração simples com gaze. O soro produzido foi dialisado por 48 horas em câmara fria a 8° C, com constante agitação contra água destilada para a remoção de lactose. Após a diálise, foi adicionado ao soro, caulim na proporção 0,6 g de caulim/30 mL de soro, para retirada da gordura. Logo após procedeu-se a filtração em funil de Buchner provido de papel filtro (CUSTÓDIO, 2001). O soro dialisado e filtrado foi armazenado em frascos identificados, e congelados a -18° C até o momento dos ensaios.

3.2.2. Dosagem de gordura

Para a determinação de gordura no soro utilizou-se o método de Gerber, que se baseia na quebra da emulsão do leite pela adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico, na

centrifugação e posterior leitura direta no lactobutirômetro (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

3.2.3. Dosagem de açúcar redutor

A concentração de açúcar redutor (lactose) foi determinada pelo método de Miller (1959), que consiste em uma reação colorimétrica de oxirredução do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) na presença de açúcares redutores, ocorrendo mudança de cor, com leitura em $\lambda=540$ nm.

Para a determinação da concentração de açúcar redutor no soro do queijo, foi utilizado diagrama de calibração de lactose, onde determinou coeficiente de extinção molar de $0,605 (\mu\text{mols}/0,25 \text{ mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2.4. Dosagem de proteínas totais

Os métodos utilizados para dosagem de proteínas totais foram:

- Método de Lowry, modificado por Hartree (1972). A soro albumina bovina foi utilizada como padrão. Leituras foram feitas em $\lambda = 660$ nm. O coeficiente de extinção determinado foi de $2,7406 (\mu\text{g/mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$.
- Método colorimétrico de Bradford (1976), A soro albumina bovina foi utilizada como padrão. Leituras feitas em $\lambda = 595$ nm. O coeficiente de extinção determinado foi de $0,025 (\mu\text{g/mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2.5. Hidrólise Enzimática das proteínas do soro de queijo

A metodologia utilizada para produção do suplemento nutricional a partir da hidrólise das proteínas do soro de queijo filtrado e dialisado foi a mesma descrita por Marques (2009), utilizando-se para isso as enzimas proteolíticas: pepsina (EC 3.4.23.1 -

1290 U.mg proteína-1), quimotripsina (EC 3.4.21.1 - 55 U.mg proteína-1), tripsina (EC 3.3.1. - 1300 U.mg proteína-1 e carboxipeptidase-A, além dos reagentes ácido ascórbico e hidróxido de amônio, utilizados para ajuste de pH. Os hidrolisados com alto e médio teores de hidrólises foram produzidos em pH e temperaturas específicos conforme a Ilustração 1, a seguir .

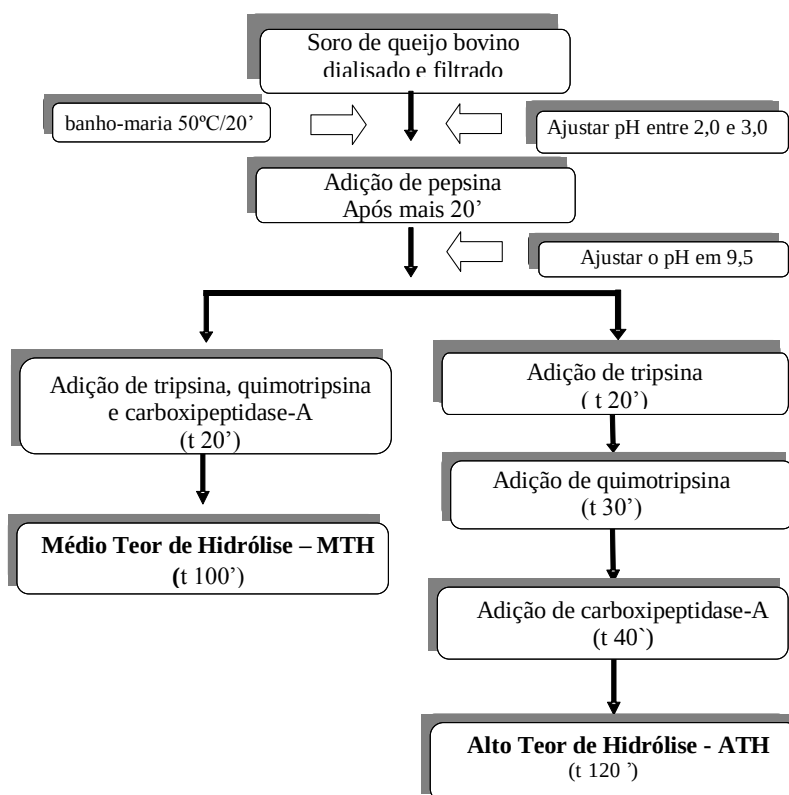


Ilustração 1. Hidrólises das proteínas do soro de queijo (Marques, 2009 adaptado por Barbosa, O. A.).

3.2.6. Análise dos hidrolisados por SDS-PAGE e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

3.2.6.1. Análise dos hidrolisados por SDS-PAGE

Os hidrolisados foram analisados por SDS-PAGE (10-12% v/v) com base no método de Laemmli (1970), sendo a coloração do gel realizada com Brilliant blue G-coloidal com base no método NEUHOFF (1988).

3.2.6.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

Para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em todas as condições de hidrólise foram retiradas amostras aos 40 e 120 minutos de reação. Estas amostras foram fervidas por 3 minutos e congeladas para posterior aplicação. Alíquotas de 20 µL foram injetadas. A análise em CLAE utilizou uma coluna de fase reversa Nucleosil 18 (25 x 0.46 cm; 5 µm; 300 Å) com gradiente linear de 5 – 95% do solvente B Acetonitrila (ACN) e 0.036% TFA (ácido trifluoroacético) por 30 min, com fluxo de 1,0 mL/min e detecção no UV em $\lambda=220$ nm. Os dados gerados pela “Workstation” foram tratados no Origin 5.0 para a obtenção dos gráficos. As análises foram realizadas no laboratório de Análise de peptídeos - Departamento de Bioquímica e Química Tecnológica do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, SP. Para as análises de aminoácidos foi empregado método de derivatização.

3.2.7. Dialisabilidade

3.2.7.1. Método enzimático *in vitro* para determinação da proteína dialisada

Como uma etapa prévia de estudos de avaliação da biodisponibilidade, os métodos *in vitro* são relativamente simples, rápidos e baratos, relacionando-se com a biodisponibilidade *in vivo*. Constituem-se numa simulação da digestão gástrica e duodenal, seguida de diálise, com controle das condições de temperatura, pH e tempo de hidrólise,

utilizando enzimas digestivas comerciais. A proporção do elemento difundido através da membrana semipermeável durante o processo representa sua dialisabilidade, após um período de equilíbrio, sendo utilizado como estimativa da biodisponibilidade do nutriente (MILLER et al., 1981; BOUNOUS e KONGSHAVN, 1985; LUTEN et al., 1996;; BERMEJO et al., 2002; ARGYRI et al., 2009; ROMARIS-HORTAS et al., 2011).

Para a determinação da porcentagem de proteínas, e dos hidrolisados a serem dialisados, utilizou-se o método de Miller (1981) modificado por Luten et al. (1996), que envolve a simulação da digestão gastrointestinal (gástrica e duodenal), seguida da determinação dos hidrolisados dialisáveis e absorvidos (McDonald e Chen, 1965). As amostras de soro de queijo utilizadas para desenvolvimento desta metodologia no laboratório de Enzimologia foram: soro com proteínas integrais ou não hidrolisadas (NH), soro com proteínas com médio teor de hidrólise (MTH) e soro com proteínas com alto teor de hidrólise (ATH).

3.2.7.2. Tratamento das membranas de diálise

Para a simulação da digestão intestinal foram utilizadas membranas de diálise Sigma® com o diâmetro de exclusão do poro com corte entre 12.000 a 14.000 Da, onde por difusão de pequenos peptídeos e aminoácidos, há a simulação da parede intestinal.

As membranas foram cortadas em um comprimento de 25 cm, lavadas e submersas por 30 minutos em água milli-Q, sendo este processo repetido por cinco vezes. A seguir as membranas foram submersas em uma solução de sulfito de sódio 0,3% (p/v) a 80 °C por 1 minuto. Após esse processo, elas foram novamente tratadas em água milli-Q a 60 °C por 2 minutos. Depois de transcorrer o tempo indicado, a água foi descartada e as membranas foram adicionadas numa solução de ácido sulfúrico a 0,2% (v/v) onde permaneceram por 2 minutos. Com a retirada do ácido, as membranas foram lavadas com água milli-Q a 80 °C para depois serem guardadas em frascos contendo 20% de etanol (v/v) em temperatura de 4 °C até o momento de seu uso, antes porém, elas foram lavadas interna e externamente por dez vezes com água milli-Q.

3.2.7.3. Determinação da acidez dos digestos gástricos dos hidrolisados

Em amostras de 20 g dos digestos gástricos, determinou-se, através de titulação, o número de equivalentes em mols de NaOH necessários para atingir o pH de 7,5. A acidez titulável foi definida como a quantidade em mililitros de NaOH 0,5 mol/L necessários para atingir o pH de 7,5 (Ilustração 2)

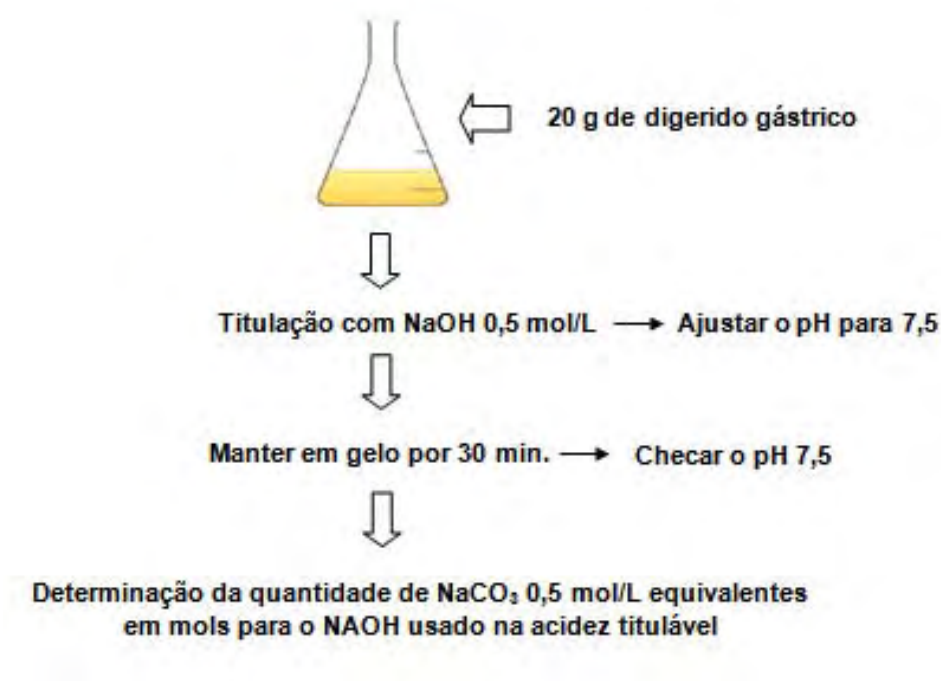


Ilustração 2. Procedimento para determinação do número de equivalentes em mols para titulação do digesto gástrico.

3.2.7.4. Simulação da digestão gástrica e intestinal dos hidrolisados

Utilizando-se quatro béqueres de 250 mL, pesou-se 95 g de cada amostra de soro de queijo (NH, MTH e ATH), para o branco foi utilizada a mesma quantidade de água milli-Q. O pH do soro de queijo não hidrolisado e de seus hidrolisados foram ajustados para 2,0 com HCl 6 mol/L. Com a estabilização do pH, foram adicionados 3 g da solução de pepsina com 1290 U mg⁻¹ prot (0,48 g de pepsina – em 3 mL de HCl 0,1 mol/L) e completado o

volume com água milli-Q até atingir 100 g. Os béqueres foram protegidos com Parafilm® e incubados a 37 °C em banho de água com agitação controlada (140 rev/min) por um período de duas horas. Transcorrido este tempo, os frascos contendo os digestos gástricos foram incubados em gelo por 10 minutos para cessar a atividade enzimática.

Amostras de 20 g de cada digesto gástrico dos soros (NH, MTH e ATH) foram colocadas em béqueres de 250 mL e a seguir, foram adicionados segmentos da membrana de diálise contendo 25 g de solução NaHCO_3 0,5 mol/L apresentando os mesmos equivalentes em mols de NaOH 0,5 mol/L (previamente determinado com NaOH para a acidez titulável) em NaHCO_3 0,5 mol/L. Após a adição das membranas com NaHCO_3 , os béqueres foram incubados a 37 °C por 30 minutos e então aferiu-se a leitura de pH. Em pH 5,0 ou próximo disso, adicionou-se em cada béquer 5 g da solução de pancreatina-extrato biliar (20 mg de pancreatina e 125 mg de extrato biliar) em 5 mL de solução de NaHCO_3 0,5 mol/L, simulando a digestão intestinal. Os béqueres foram protegidos com Parafilm® e incubados a 37 °C com agitação de 140 rev/min, por um período de 120 minutos para completar a digestão e conseqüentemente, proporcionar a difusão de pequenos peptídeos e aminoácidos livres para o interior da membrana de diálise. Transcorrido este tempo o digesto externo (DI_{ext}) e o digesto absorvido na membrana de diálise (digesto interno- DI_{int}) foram separados e os pH's aferidos. As membranas foram lavadas com água milli-Q, secas em papel de filtro e pesadas, para comparação com o peso inicial. As soluções dos digestos externos e internos foram estocadas a -18 °C, em tubos plásticos de 10 mL até o momento em que se procedeu a determinação de pequenos peptídeos por SDS-PAGE e análises de aminoácidos em CLAE. A Ilustração 3 mostra o procedimento deste experimento.

- Após a digestão gastrointestinal dos soros NH, MTH e ATH, foram realizados ensaios com o objetivo de caracterização dos Digestos Gástricos (DG) e Digestos Intestinais (DI):
- Digesto Gástrico Não Hidrolisado, Digesto Gástrico Médio Teor de Hidrólise (DG-MTH): Digesto Intestinal Externo e Interno ($\text{DI}_{\text{ext}}\text{MTH}$ e $\text{DI}_{\text{int}}\text{MTH}$).
- Digesto Gástrico Alto Teor de Hidrólise (DG-ATH): Digesto Intestinal Externo e Interno ($\text{DI}_{\text{ext}}\text{ATH}$ e $\text{DI}_{\text{int}}\text{ATH}$).

Após esses ensaios foram realizadas dosagens de proteínas pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972) e de pequenos peptídeos e aminoácidos pelo método de McDonald e Chen, (1965), além de análises por SDS-PAGE e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.

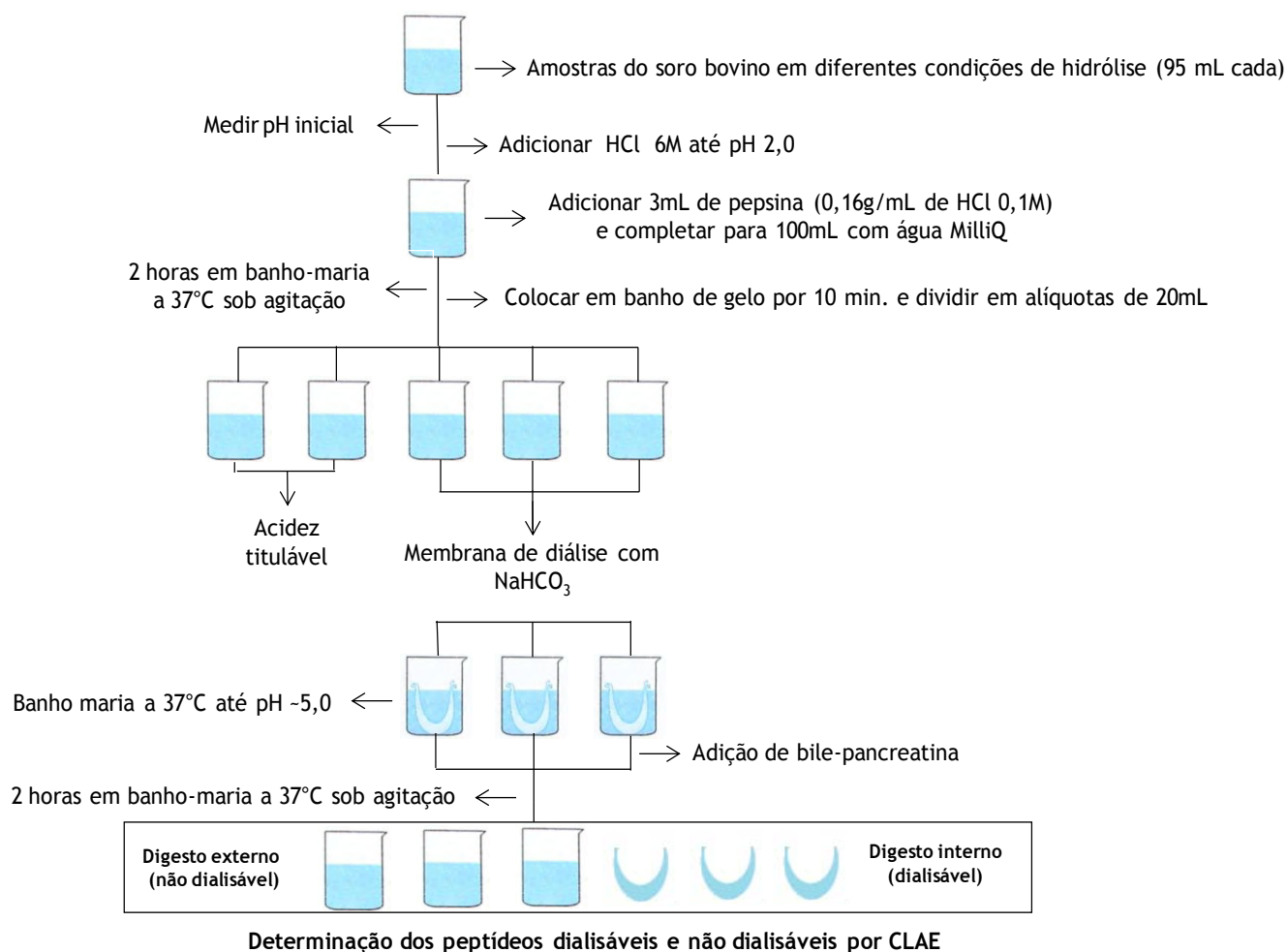


Ilustração 3. Protocolo utilizado na simulação in vitro da digestão gastrointestinal através da técnica da dialisabilidade.

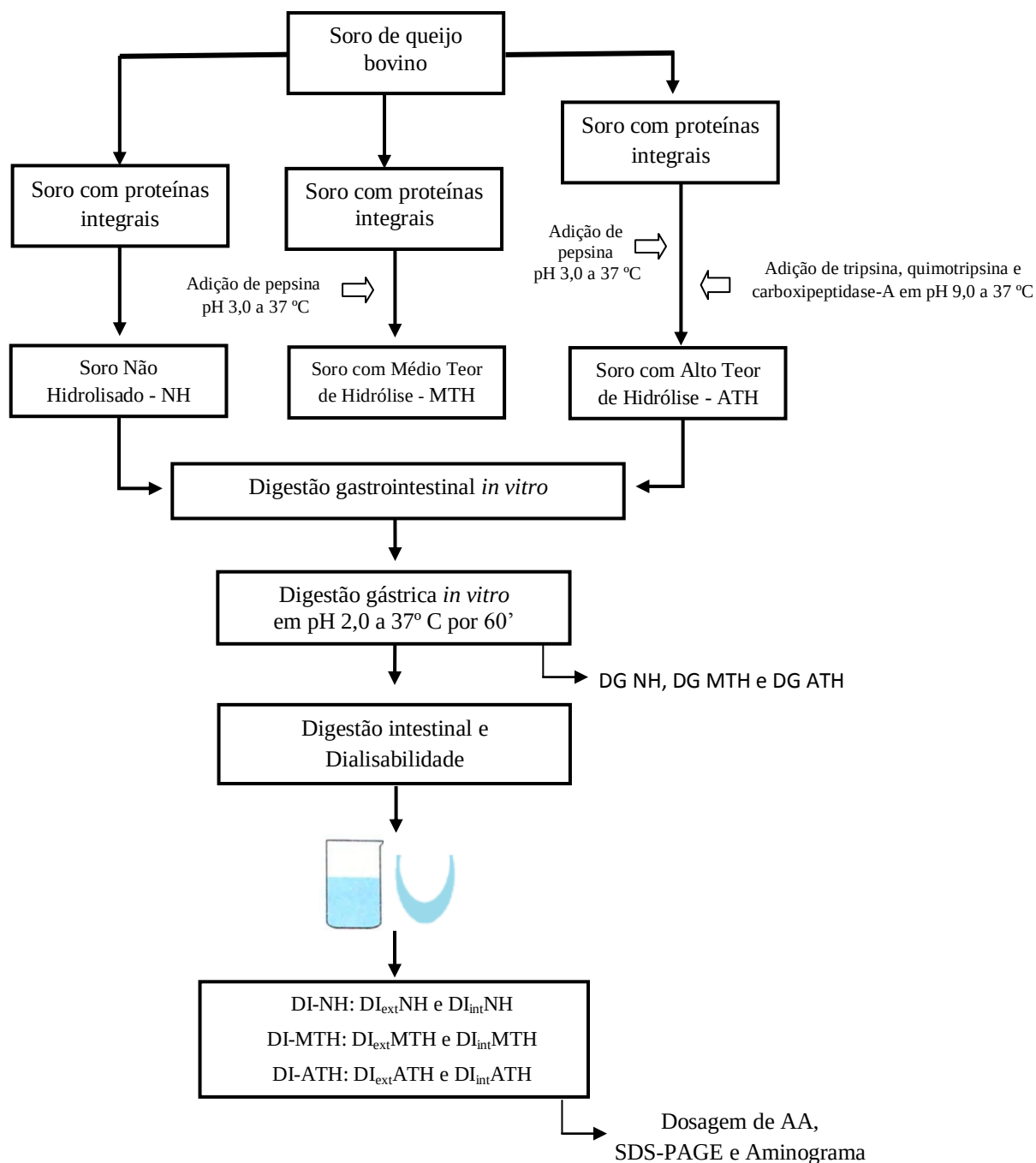


Ilustração 4. Obtenção dos digestos gástricos e intestinais

Legenda:

DI-NH: digesto intestinal não hidrolisado

DI_{ext}NH: digesto intestinal não hidrolisado externo

DI_{int}NH: digesto intestinal não hidrolisado interno

DI-MTH: digesto intestinal com médio teor de hidrólise

DI_{ext}MTH: digesto intestinal com médio teor de hidrólise externa.

DI_{int}MTH: digesto intestinal com médio teor de hidrólise interno

DI-ATH: digesto intestinal com alto teor de hidrólise

DI_{ext}ATH: digesto intestinal com alto teor de hidrólise externo

DI_{int}ATH: digesto intestinal com alto teor de hidrólise interno.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Dosagem de açúcar redutor no soro de queijo

A dosagem de açúcares redutores antes do início do ensaio que avalia a biodisponibilidade das proteínas do soro de queijo é necessária, uma vez que os açúcares são interferentes na determinação de proteínas, pois reagem com o cobre presente no reagente, resultando em falso positivo (LEA e HANNAN, 1949; LEA e HANNAN, 1950; ZAIA et al., 1998).

A curva padrão foi feita utilizando lactose e com o valor do coeficiente de extinção molar foi possível determinar a concentração deste açúcar na amostra de soro não hidrolisado (NH), antes da diálise. O valor determinado apresentou redução de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, indicando uma redução de 95% da lactose presente no soro de queijo. Desta forma, as amostras apresentaram-se livres da interferência nas dosagens de proteínas, peptídeos e aminoácidos.

4.2. Dosagem de proteínas totais das amostras de soro de queijo não hidrolisado (NH), com médio teor de hidrólise (MTH) e alto teor de hidrólise (ATH) em diferentes estágios da digestão gastrointestinal *in vitro*

Para a determinação de proteínas totais foi utilizado o método de Lowry modificado por Hartree (1972). As amostras foram diluídas 20 vezes para o soro NH e 50 vezes para os soros MTH e ATH. Foram realizadas análises antes da digestão *in vitro*, após a primeira etapa da digestão (digestão gástrica), como também do digesto intestinal externo e do produto que se apresentava no interior da membrana de diálise (digesto intestinal interno), de amostras do soro de queijo NH, MTH e ATH. As Tabelas 1, 2 e 3, a seguir, resumem os resultados obtidos.

A literatura mostra que este método é usado para detectar proteínas, porém, grandes peptídeos também dão reações positivas. Portanto, os valores apresentados na Tabela 1 são altos em relação às dosagens de proteínas nativas do soro de queijo, porém, mostram

claramente que houve hidrólise pela enzima proteolítica pepsina e que este produto fez aumentar os valores obtidos.

Tabela 1. Dosagens de proteínas em diferentes estágios da digestão gastrointestinal *in vitro* dos soros de queijo não hidrolisado (NH).

<i>Amostras de soro de queijo NH (diluição de 20x)</i>	<i>Concentração de proteínas (g/L)</i>
Antes da digestão gástrica	5,44 ± 0,18
Após a digestão gástrica	5,45 ± 0,16
Digesto intestinal externo (DI _{ext})	4,41 ± 0,11
Digesto intestinal interno (DI _{int})	2,14 ± 0,06

Obs: todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores apresentados foram obtidos através das médias aritméticas.

As dosagens do digesto gastrointestinal externo (DI_{ext}MTH), mostrado na Tabela 2, apresentaram valores menores, o que faz sentido, uma vez que, as enzimas proteolíticas intestinais hidrolisam a maior parte dos grandes peptídeos, liberando uma quantidade maior de aminoácidos livres. Os resultados obtidos no digesto gastrointestinal interno (DI_{int}MTH) apresentaram valores ainda menores do que o DI_{ext}MHT, mostrando que houve absorção na dialisabilidade, porém, nem todos os peptídeos que estão no lado externo à membrana de diálise foram absorvidos, o que sugere ter ocorrido uma diferença grande de concentração nas partes externa e interna a membrana de diálise.

Tabela 2. Dosagem de proteínas em diferentes estágios da digestão gastrointestinal *in vitro* dos soros de queijo MTH.

<i>Amostras de soro de queijo MTH (diluição de 50x)</i>	<i>A_{660nm}</i>	<i>Concentração de proteínas (g/L)</i>
Digesto gastrointestinal externo (DI _{ext} MTH)	0,718	2,10
Digesto gastrointestinal interno (DI _{int} MTH)	0,228	0,68

Obs: todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores apresentados foram obtidos através das médias aritméticas.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados para dosagens de proteínas do digesto gastrointestinal do soro ATH, como também ocorrido com o soro MTH, os valores são altos em relação às dosagens de proteínas nativas do soro de queijo, mas mostraram claramente que houve hidrólise pelas enzimas proteolíticas e que este produto (aminoácidos e pequenos peptídeos) fez aumentar os valores obtidos. As dosagens do digesto gastrointestinal externo ($DI_{ext}ATH$) apresentaram valores menores, o que está correto, uma vez que, as enzimas proteolíticas intestinais hidrolisam a maior parte dos possíveis pequenos peptídeos que foram liberados durante todo processo de hidrólise e digestão. Os resultados obtidos no digesto gastrointestinal interno ($DI_{int}MTH$) apresentam valores ainda menores do que o $DI_{ext}ATH$, mostrando que houve absorção na dialisabilidade, porém, esta absorção de aminoácidos apresenta mais eficiente em relação a absorção do $DI_{int}MTH$.

Tabela 3. Dosagem de proteínas em diferentes estágios da digestão gastrointestinal *in vitro* do soro de queijo ATH.

<i>Amostras de soro de queijo ATH (diluição de 50x)</i>	<i>A_{660nm}</i>	<i>Concentração de proteínas g/L</i>
Digesto gastrointestinal externo ($DI_{ext}ATH$)	1,165	1,74
Digesto gastrointestinal interno ($DI_{int}ATH$)	0,551	0,82

Obs: todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores apresentados foram obtidos através das médias aritméticas.

4.3. Caracterização do perfil peptídico após a digestão gastrointestinal *in vitro* do soro de queijo não hidrolisado (NH), com médio teor de hidrólise (MTH) e alto teor de hidrólise (ATH)

As análises de peptídeos e aminoácidos foram feitas com as amostras iniciais (antes da digestão), as formadas logo após os terminos das digestões gástrica e intestinal, bem como dos conteúdos que se apresentavam no exterior (pH 7,8) e interior (pH 8,0) da membrana de diálise. A quantificação dos peptídeos e aminoácidos presentes nestas amostras foi feita pelo método de McDonald e Chen (1965) e os resultados estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6, a seguir.

Observa-se na Tabela 4, a seguir, que houve um aumento ao longo da digestão, dos valores das Unidades Totais de peptídeos e aminoácidos, o que indicou que a hidrólise estava sendo concretizada. Este aumento foi gradual, demonstrando que após a digestão gástrica, o aumento foi de 5,5 vezes devido à ação da pepsina na hidrólise das proteínas do soro de queijo, enquanto que, após a ação das enzimas intestinais o aumento foi de 3,4 vezes. Os resultados apresentados mostram também que após a digestão intestinal, a quantidade absorvida no interior da membrana de diálise foi 0,6 menores do que a quantidade externa a membrana, indicando boa difusão do hidrolisado. Em literatura encontram-se vários trabalhos semelhantes que apresentaram resultados de dialisabilidade de íons ferro, zinco, iodine, inclusive em formulações infantis (BERMEJO et al., 2002; ARGYRI et al., 2009; ROMARIS-HORTAS et al., 2011).

Tabela 4. Quantificação de peptídeos e aminoácidos do soro de queijo não hidrolisado (NH) após a digestão gastrointestinal *in vitro*.

<i>Amostras de soro de queijo não hidrolisado (NH)</i>	<i>A_{770nm}</i>	<i>U totais de peptídeos e aminoácidos</i>
Antes da digestão (NH)	0,087	0,038
Digesto intestinal externo (DI _{ext} NH)	0,479	0,210
Digesto intestinal interno (DI _{int} NH)	0,301	0,130

Obs: todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores apresentados foram obtidos através das médias aritméticas.

Os resultados apresentados a seguir na Tabela 5, mostram que os valores determinados para o DI_{int}MTH são referentes aos aminoácidos e pequenos peptídeos, absorvidos no interior da membrana de diálise. Observa-se que a absorção foi de 2,4 vezes menores do total dosado no lado externo da membrana, pelo método utilizado.

Tabela 5. Quantificação de peptídeos e aminoácidos do soro de queijo com médio teor de hidrólise (MTH) após a digestão gastrointestinal *in vitro*.

<i>Amostras de soro de queijo com médio teor de hidrólise (MTH) (Diluído 50x)</i>	<i>A_{770nm}</i>	<i>U totais de peptídeos e aminoácidos</i>
Digesto gastrointestinal externo (DI _{ext} MTH)	0,617	0,270
Digesto gastrointestinal interno (DI _{int} MTH)	0,262	0,114

Obs: todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores apresentados foram obtidos através das médias aritméticas.

Os resultados obtidos na quantificação de peptídeos e aminoácidos presentes nos digestos gastrointestinais estão apresentados na Tabela 6, a seguir, e mostram que os valores determinados para o DI_{int} ATH são referentes aos aminoácidos e possíveis pequenos peptídeos, absorvidos no interior da membrana de diálise e detectados pelo método de MacDonald e Chen (1965).

Tabela 6. Quantificação de peptídeos e aminoácidos do soro de queijo com alto teor de hidrólise (ATH) após a digestão gastrointestinal *in vitro*.

<i>Amostras de soro de queijo com alto teor de hidrólise (ATH) (Diluído 50x)</i>	<i>A_{770nm}</i>	<i>U totais de peptídeos e aminoácidos</i>
Digesto gastrointestinal externo (DI_{ext} ATH)	0,858	0,370
Digesto gastrointestinal interno (DI_{int} ATH)	0,395	0,172

Obs: todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores apresentados foram obtidos através das médias aritméticas.

4.4. Caracterização das proteínas e dos digestos gastrointestinais de amostras do soro de queijo não hidrolisado (NH), com médio teor de hidrólise (MTH) e alto teor de hidrólise (ATH) através de SDS-PAGE

A metodologia por SDS-PAGE teve como objetivo mostrar a separação de moléculas, conforme massa molar e também indicar o grau de proteólise apresentado pela digestão gastrointestinal. Os resultados serão apresentados a seguir pelas Figuras 1,2,e 3.

4.4.1. SDS-PAGE – Soro de queijo não hidrolisado (NH)

Os resultados apresentados, a seguir na Figura 1 mostram a eficiência na hidrólise das proteínas do soro de queijo durante a digestão gastrointestinal. Podem-se observar na figura as proteínas que não foram hidrolisadas e que no decorrer da digestão há o

desaparecimento de bandas proteicas, principalmente as de baixa massa molar, indicando assim, a confirmação da sua hidrólise. São observadas na amostra antes do início da digestão bandas mais nítidas quando comparadas com o estágio após a digestão gástrica. Isto indica a lise que ocorreu pela ação das enzimas proteolíticas, diminuindo assim, a quantidade de proteínas que estavam presentes na amostra. Já com o término da digestão intestinal, as bandas proteicas não foram mais detectadas na eletroforese, comprovando assim, a hidrólise das proteínas integrais e a formação de peptídeos e aminoácidos que não podem ser observados neste método, o que é comprovado pela quantificação de Unidades Totais de pequenos peptídeos e aminoácidos. Resultado semelhante ao encontrado por Mandalari et al., (2009), em ensaios como estes, onde também foi observado a diminuição do número de bandas proteicas ao longo da digestão gastrointestinal, constatando a redução da massa molar dos componentes avaliados. Nesse estudo, assim como o realizado por Kananen (2000), pode-se observar que a utilização da eletroforese SDS-PAGE mostrou ser um bom método para identificar as modificações proteicas que ocorreram durante a digestão, comprovando a hidrólise.

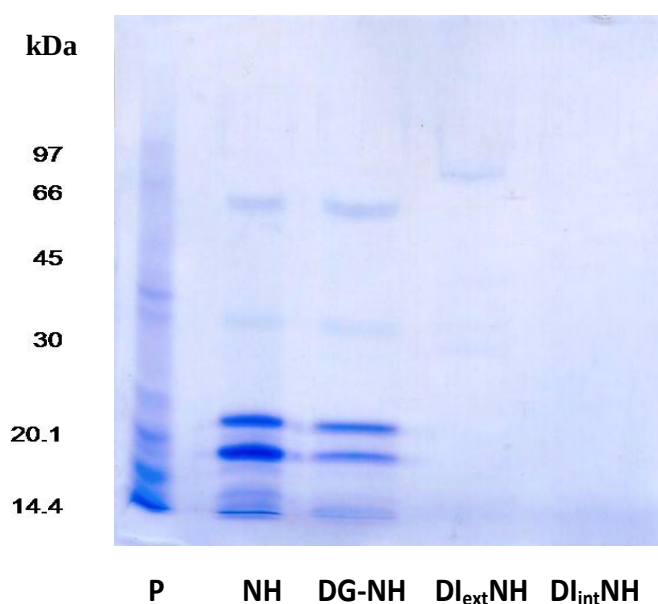


Figura 1 – SDS-PAGE 15 % do soro de queijo não hidrolisado (NH) e das amostras retiradas durante a digestão gastrointestinal: DG-NH (digesto gástrico); $DI_{ext}NH$ (digesto intestinal externo); $DI_{int}NH$ (digesto intestinal interno); P (padrão de massa molar).

4.4.2. SDS-PAGE – Soro de queijo com médio teor de hidrólise (MTH)

As análises do perfil proteico das amostras de digestos gastrointestinais do soro com médio teor de hidrólise (MTH) foram feitas através de SDS-PAGE e são apresentadas na Figura 2. Onde P representa a raia onde se aplicou padrão de massa molar (Kit Amersham Pharmacia Biotech®), na raia NH foi aplicado o soro de queijo contendo proteínas integrais; na raia DI_{ext}MTH foi aplicado amostra do digesto gastrointestinal do soro com médio teor de hidrólise. Nessa análise foi possível verificar a diminuição de proteínas e o aumento de alguns peptídeos que não foram observados no soro não hidrolisado, enquanto que na raia DI_{int}MTH não foram observados bandas proteicas e nem grandes peptídeos, confirmando assim a hidrólise total, ou seja, a presença de aminoácidos, os quais não são detectados em SDS-PAGE.

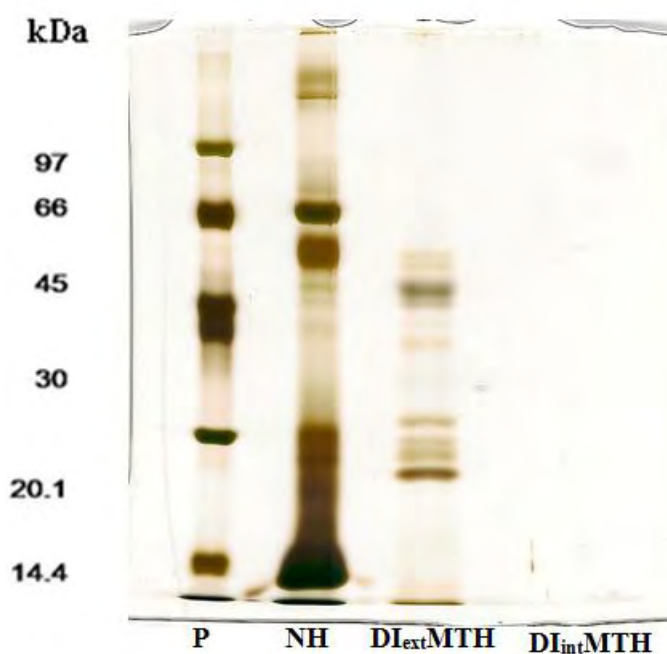


Figura 2. SDS-PAGE 15 % do soro de queijo com médio teor de hidrólise (MTH), onde P representa o padrão de massa molar (1,5 µL); NH - soro não hidrolisado (20 µL); DI_{ext}MTH - Digesto gastrointestinal externo (30 µL); DI_{int}MTH - digesto gastrointestinal interno (30 µL).

4.4.3. SDS-PAGE – Soro de queijo com alto teor de hidrólise (ATH)

As análises do perfil proteico das amostras de digestos gastrointestinais do soro ATH foram feitas através de SDS-PAGE e são apresentadas na Figura 3. Onde P, representa a raia onde se aplicou o padrão de massa molar (Kit Amersham Pharmacia Biotech®); na raia NH foi aplicado o soro de queijo com proteínas integrais e na raia foi aplicada amostra do digesto gastrointestinal do soro com alto teor de hidrólise, onde pode-se verificar a ausência de proteínas, restando apenas alguns peptídeos que não são observados no soro não hidrolisado, enquanto que a raia DI_{ext}ATH não apresentou bandas proteicas e nem grandes peptídeos, confirmando a hidrólise até pequenos peptídeos, os quais também não são detectados por SDS-PAGE.

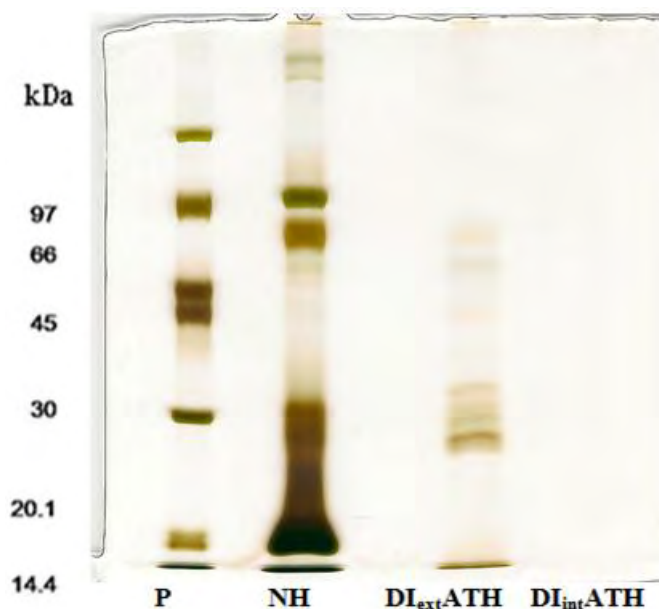


Figura 3. SDS-PAGE 15 % do soro de queijo com alto teor de hidrólise (ATH), onde P representa padrão de massa molar (1,5 µL); NH: Soro de queijo não hidrolisado (20 µL); DI_{ext}ATH: Digesto intestinal externo (30 µL); DI_{int}ATH: Digesto intestinal interno (30 µL).

4.5. Caracterização de aminoácidos de digestos gastrointestinal do soro de queijo não hidrolisado (NH), com médio teor de hidrólise (MTH) e com alto teor de hidrólise (ATH) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE foi realizada em um sistema Varian ProStar, empregando-se uma coluna de fase reversa Nucleosil C18 (25 x 0.46 cm; 5 µm; 300 Å) com eluição em gradiente linear de 5 – 95% com o solvente B (A: water, 0.045% TFA; B: ACN, 0.036% por 30 min, com fluxo de 1.0 mL.min⁻¹ e detecção em comprimento de onda de 220 nm.

4.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE do soro de queijo não hidrolisado (NH)

Segundo Erbelein (1995), a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é um método bastante fidedigno e sensível na determinação de peptídeos e aminoácidos, o que pode ser confirmado pela observação dos resultados apresentados nos quatro cromatogramas, a seguir, referentes às Figuras 4, 5, 6 e 7, nota-se a sequencia da digestão através da hidrólise das proteínas e a formação de pequenos peptídeos e aminoácidos, que é demonstrado pelo número de picos detectados e pela área das curvas apresentadas nos gráficos.

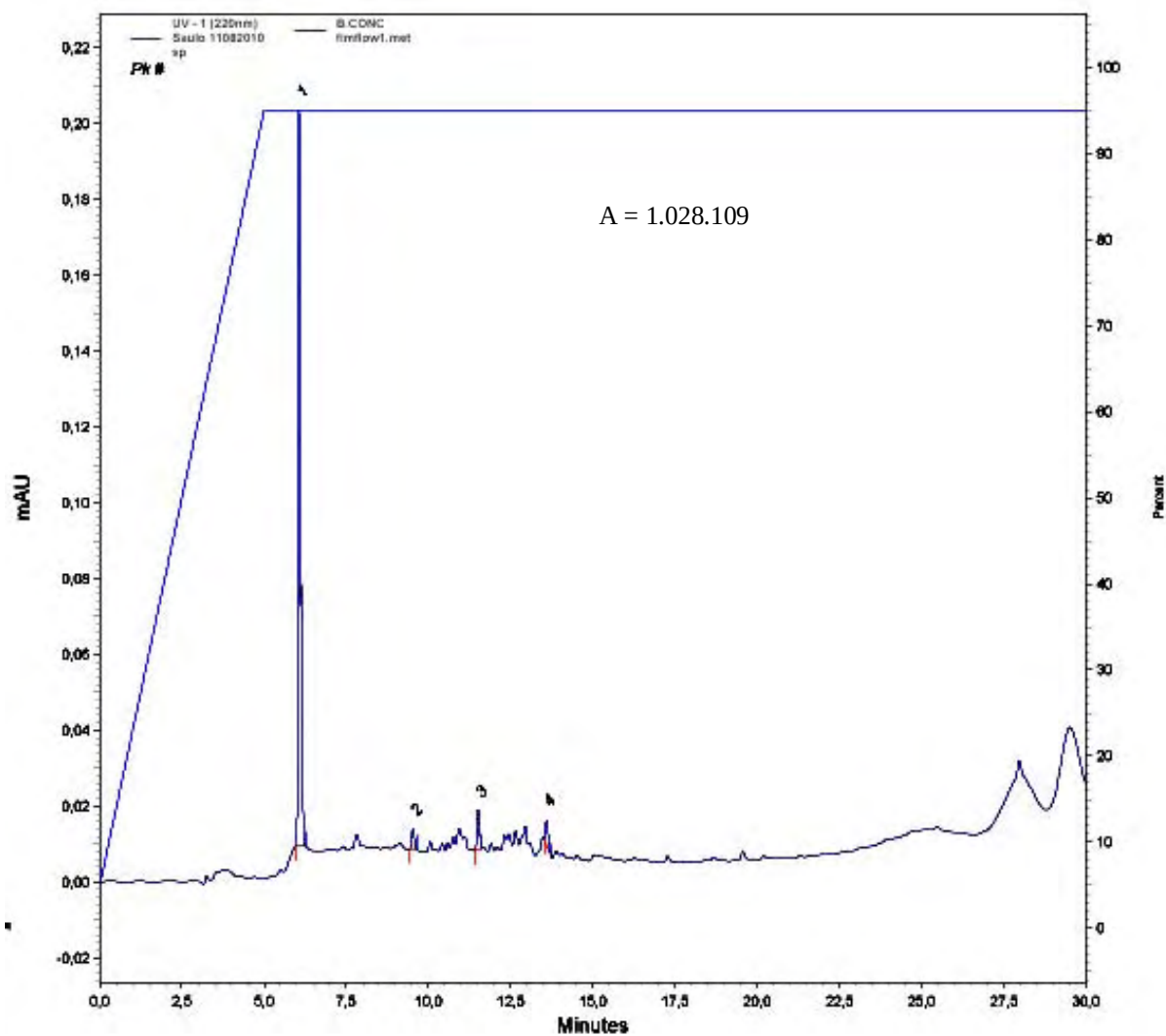


Figura 4. CLAE do soro de queijo não hidrolisado (NH). “A” representa a área sob a curva. Demais condições de coluna e solventes utilizados foram descritas no texto.

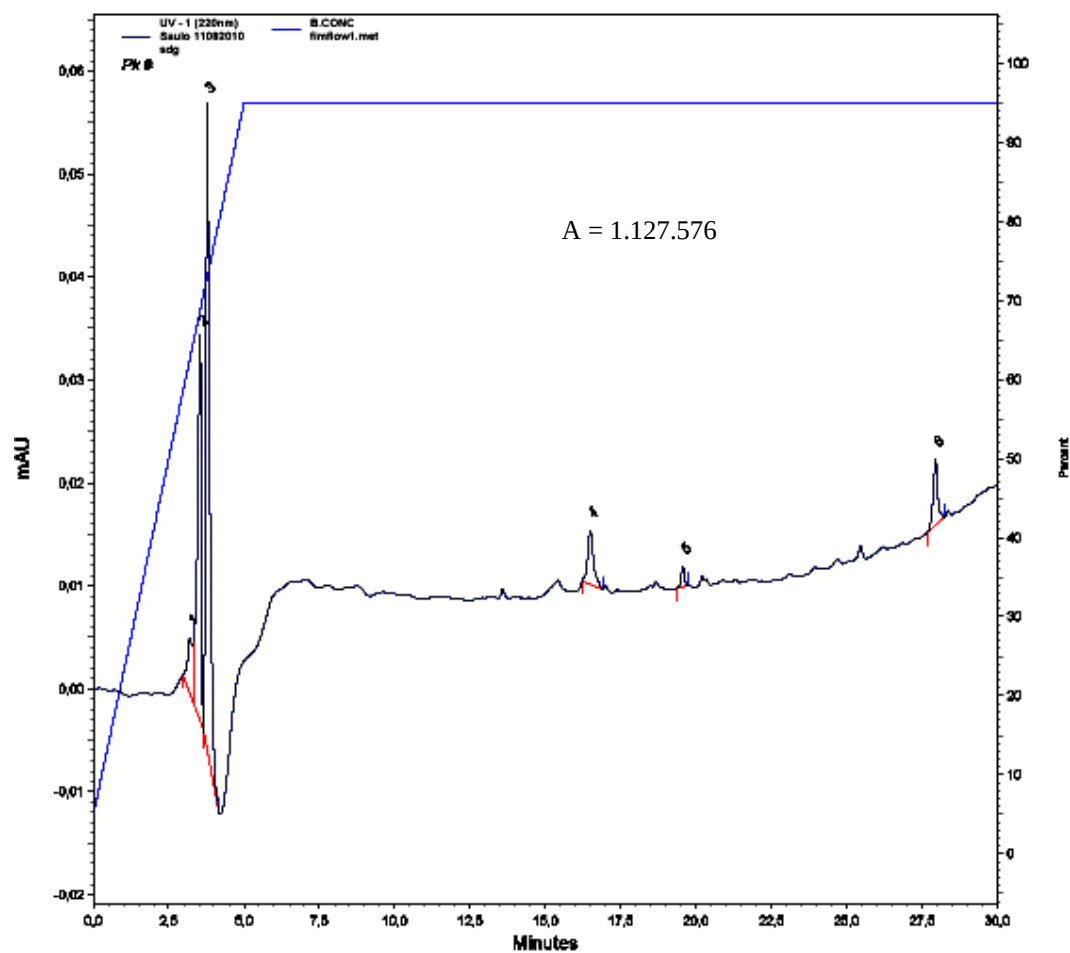


Figura 5. CLAE do soro de queijo não hidrolisado após a digestão gástrica (DG-NH). “A” representa a área sob a curva. Demais condições de coluna e solventes utilizados foram descritos no texto.

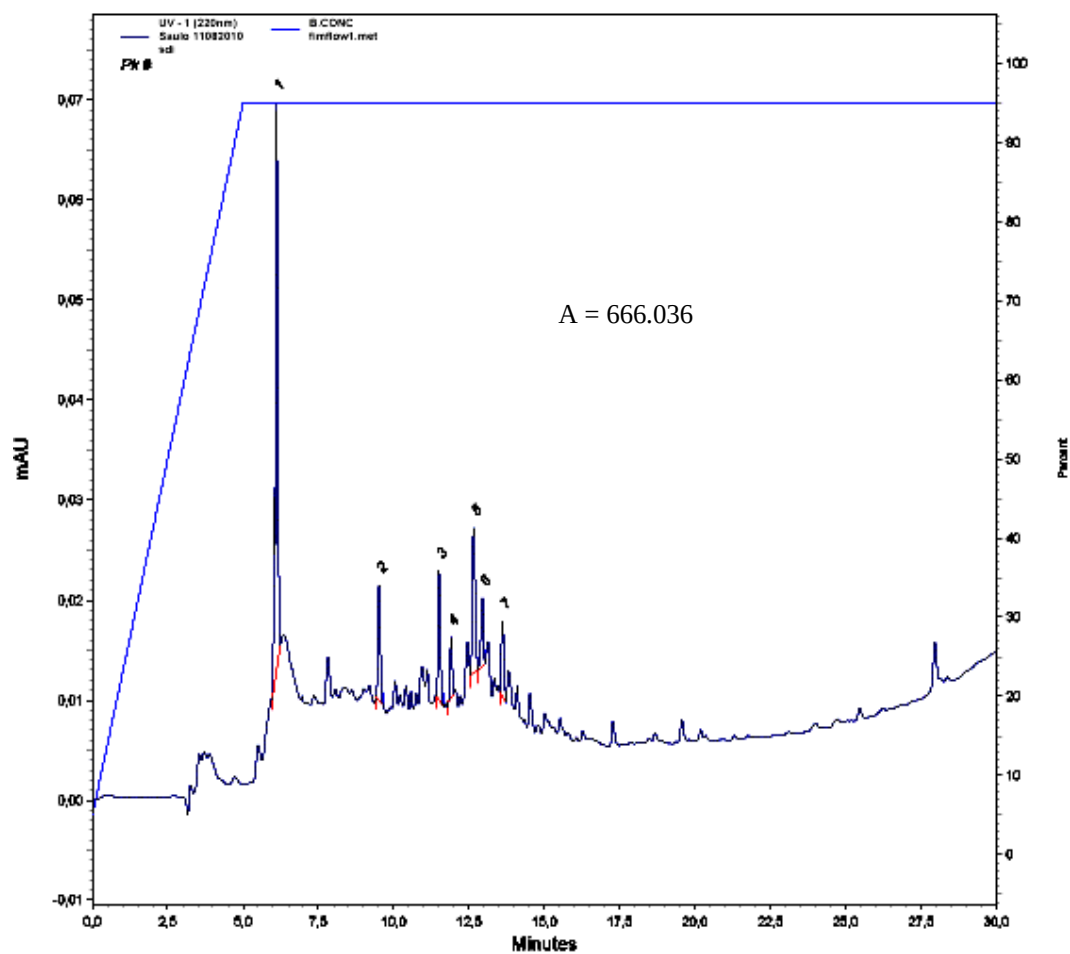


Figura 6. CLAE do soro de queijo não hidrolisado após a digestão intestinal externa ($DI_{ext}NH$). “A” representa a área sob a curva. Demais condições de coluna e solventes utilizados foram descritos no texto.

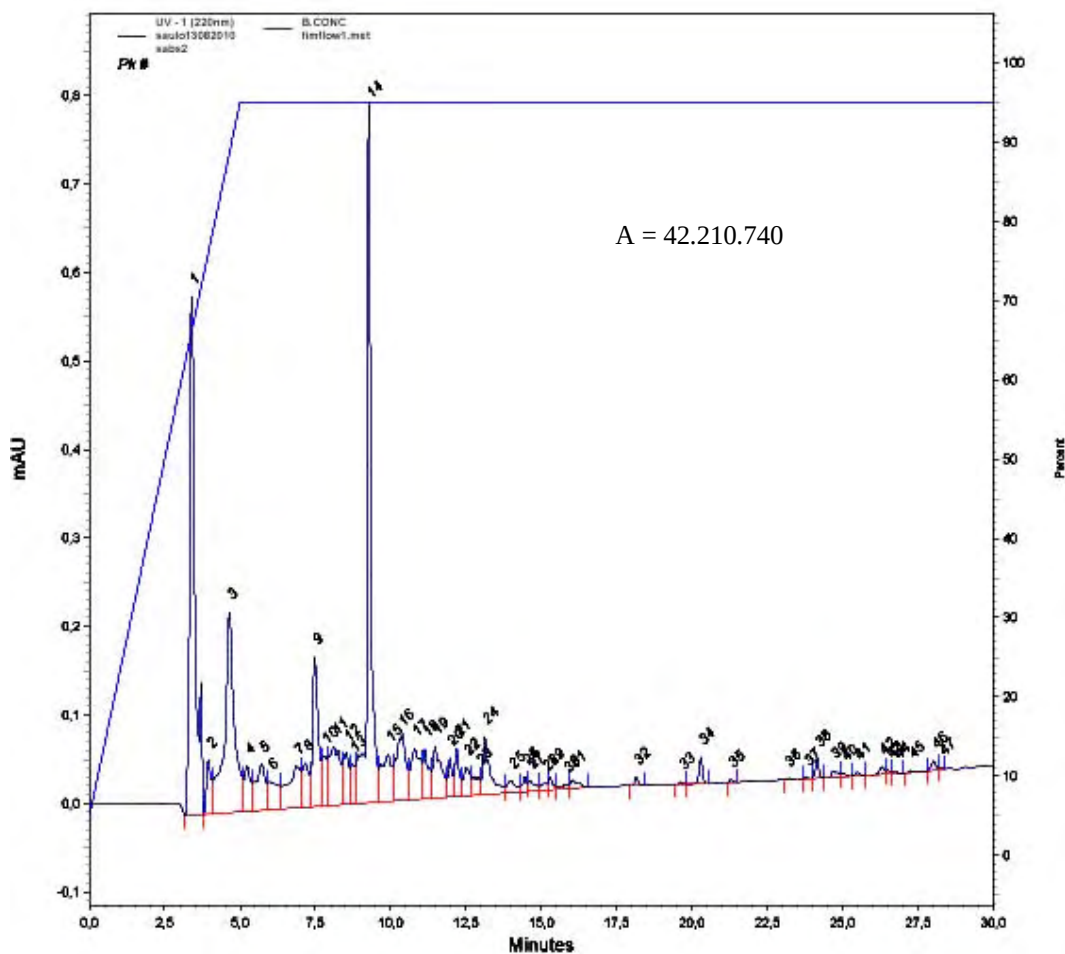


Figura 7. CLAE do soro de queijo não hidrolisado após digestão gastrointestinal interna ($DI_{int}NH$). “A” representa a área sob a curva. Demais condições de coluna e solventes utilizados foram descritas no texto.

A Tabela 7 resume os resultados de áreas das curvas obtidas para cada amostra de soro de queijo não hidrolisado, examinada por CLAE.

Tabela 7. Áreas das curvas apresentadas nas Figuras 4, 5, 6 e 7.

<i>Amostras de soro de queijo não hidrolisado (NH)</i>	<i>Área unidade ?</i>
Figura 4 - soro não hidrolisado (NH)	1.028.109
Figura 5 - digestão gástrica (DG-NH)	1.127.576
Figura 6 - digestão gastrointestinal externo (DI _{ext} NH)	666.036
Figura 7- digestão gastrointestinal interno (DI _{int} NH)	42.210.740

Os resultados obtidos nas cromatografias mostram que a digestão gastrointestinal *in vitro* promoveu de forma eficiente a lise das proteínas. A amostra inicial continha uma pequena quantidade de peptídeos e, após a digestão gástrica realizada pela enzima pepsina, essa quantidade aumentou. De acordo com Nakano et al. (2002), a pepsina, é uma protease que age preferencialmente sobre ligações peptídicas formadas pelo aminogruppo dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, isso justifica o aumento na concentração de peptídeos. Os produtos principais da ação dessa enzima são grandes peptídeos e poucos aminoácidos. Isso explica o leve aumento sob a área da curva após a digestão gástrica, conforme resumido na Tabela 7. Já após a digestão intestinal, houve um aumento considerável de pequenos peptídeos, o que é demonstrado pelos valores da área descritos nos cromatogramas. Um dado bastante relevante e interessante sobre estes resultados é a visualização, através dos valores das áreas das curvas e do número de picos nas cromatografias, da quantidade de pequenos peptídeos no interior da membrana de diálise. Foi observada uma grande diferença quando comparado os dois valores de DI_{ext}NH e DI_{int}NH, Isso mostra que o método foi efetivo para a constatação da dialisabilidade de peptídeos e aminoácidos frente a um ensaio que estima *in vitro* a digestão gastrointestinal.

De acordo com Mota (2004), a utilização da técnica de CLAE em fase reversa demonstra bastante confiabilidade na detecção de peptídeos após hidrólise, fornecendo dados sobre a extensão hidrolítica. O perfil cromatográfico da lise e formação de peptídeos

pode ser usado como uma impressão digital das enzimas durante o procedimento experimental. Ainda de acordo com Elgar (2000), o método de CLAE em fase reversa é preciso, sensível e confiável, sendo um processo que aperfeiçoa a separação de componentes do soro de queijo. Além disso, estas informações que demonstraram a heterogeneidade dos peptídeos podem futuramente ser adicionadas a resultados de outros métodos, como por exemplo, a Espectrometria de Massas.

Os aminoácidos do digesto gastrointestinal externo e interno-NH foram separados por CLAE e comparados com o aminograma padrão de aminoácidos conforme apresentados nas Figuras 8, 9 e 10, a seguir. Os resultados apresentados na Figura 8 são referentes ao padrão de aminoácidos, podendo-se observar vários picos com uma área total de 130.773.136. A seguir realizou-se a análise dos aminoácidos presentes no digesto gastrointestinal externo (DI_{ext}^{NH}) como mostrado na Figura 9, ainda nessa figura, observou-se a presença de vários picos dos diferentes aminoácidos presentes no digesto gastrointestinal externo (DI_{ext}^{NH}), resultando em uma área total de 142.782.976. Na Figura 10, pode se observar o resultado do aminograma do digesto gastrointestinal interno (DI_{int}^{NH}).

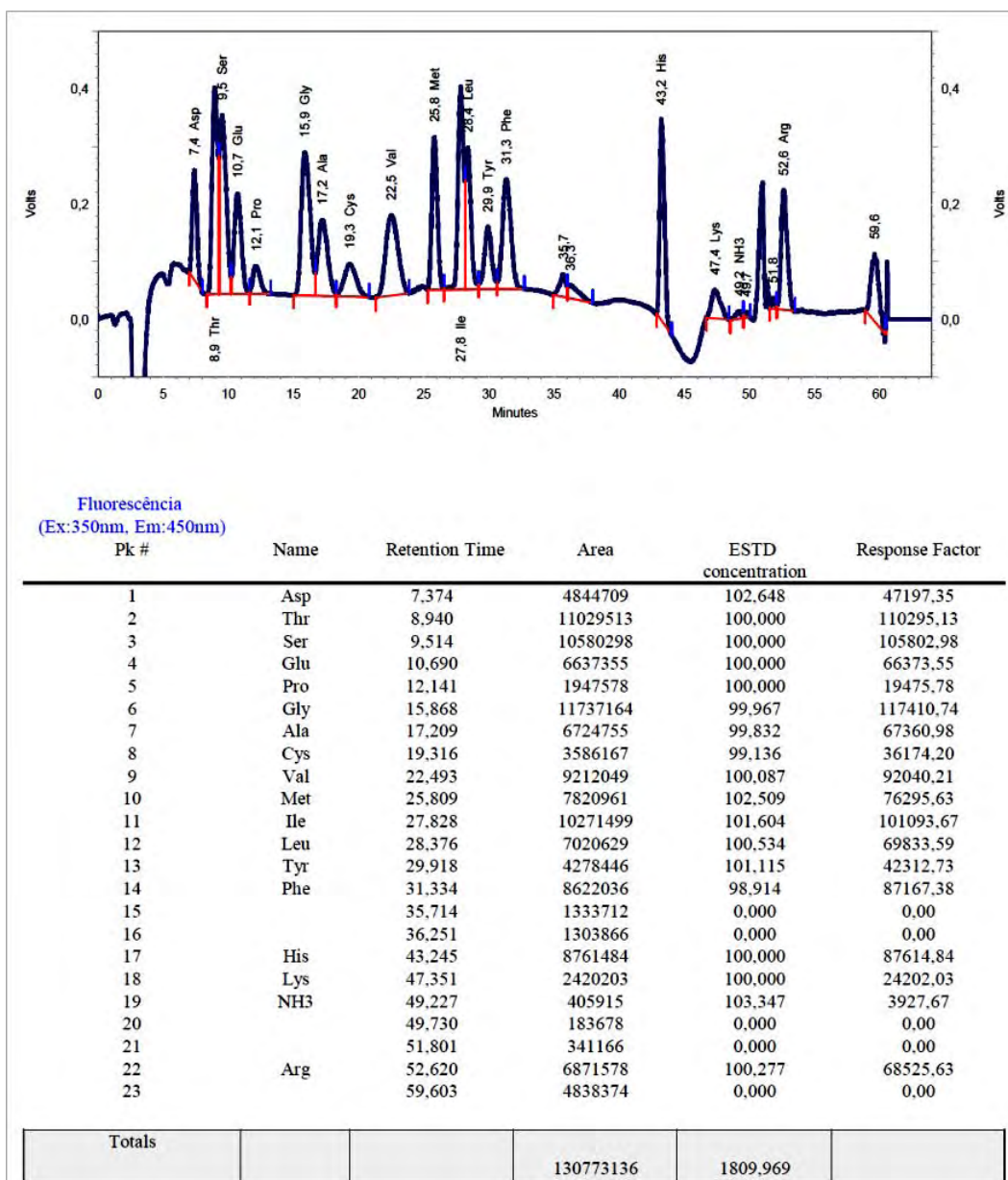


Figura 8. Análise dos padrões de aminoácido por CLAE. Foram injetados 50 µL da amostra (100 nM para cada aminoácido).

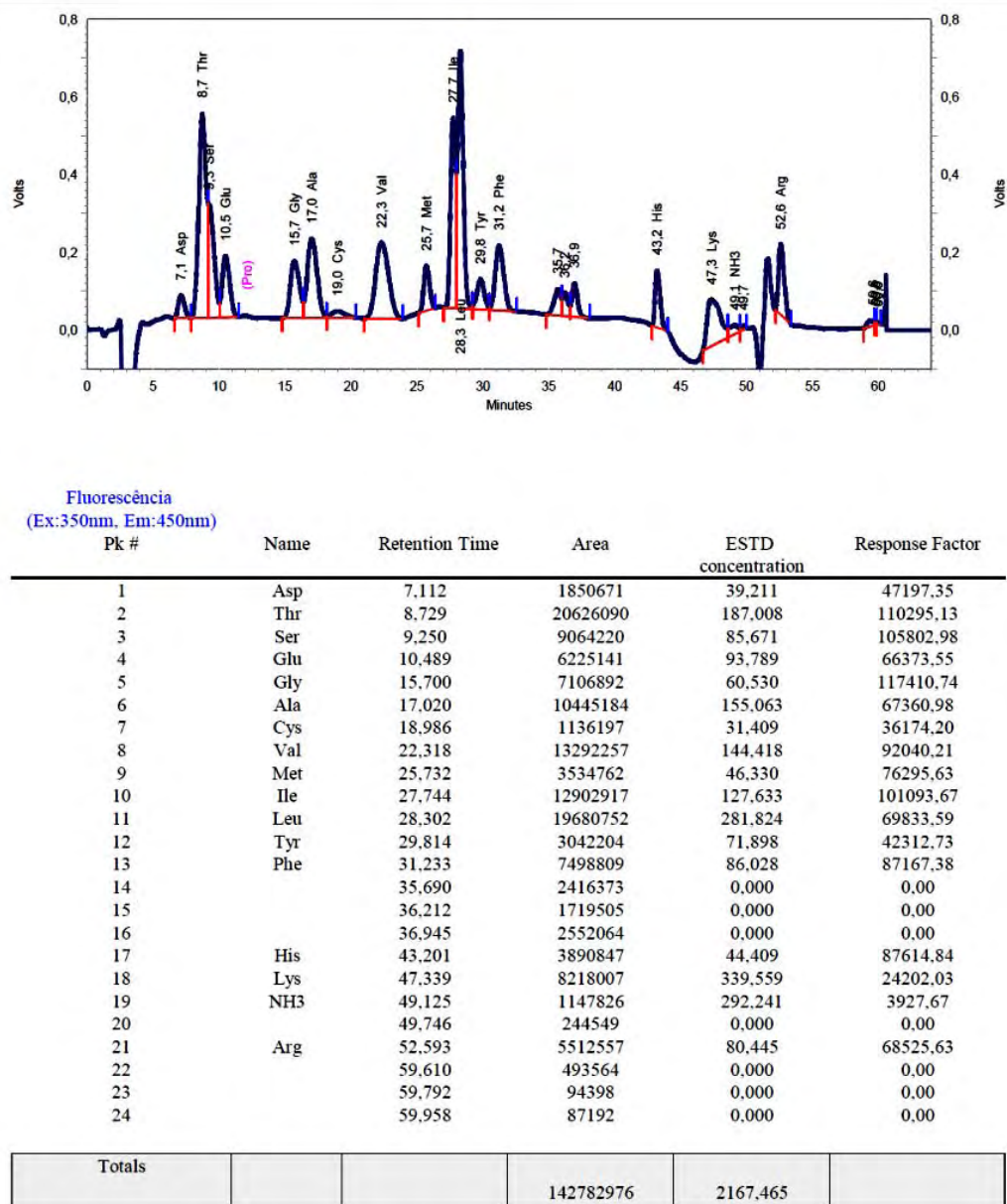


Figura 9. Análise dos aminoácidos do digesto gastrointestinal externo (DI_{ext}NH). Foram injetados 50 µL da amostra.

Observa-se na Figura 10, a seguir, um grande número de picos correspondente a aminoácidos absorvidos na membrana de diálise conforme demonstrado pela área total obtida de 148.052.898.

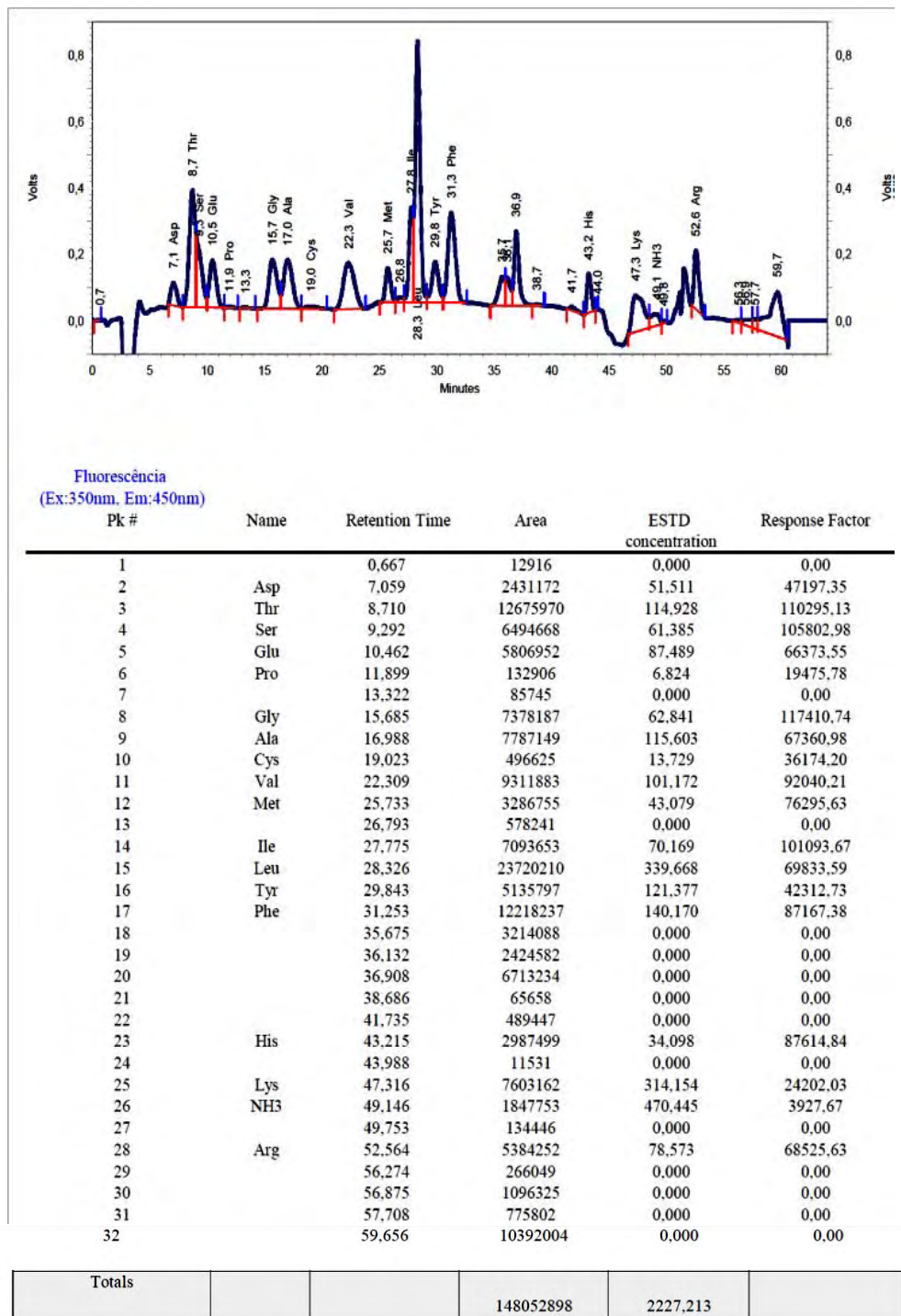


Figura 10. Análise dos aminoácidos do digesto intestinal interno. Foram injetados 50 µL da amostra.

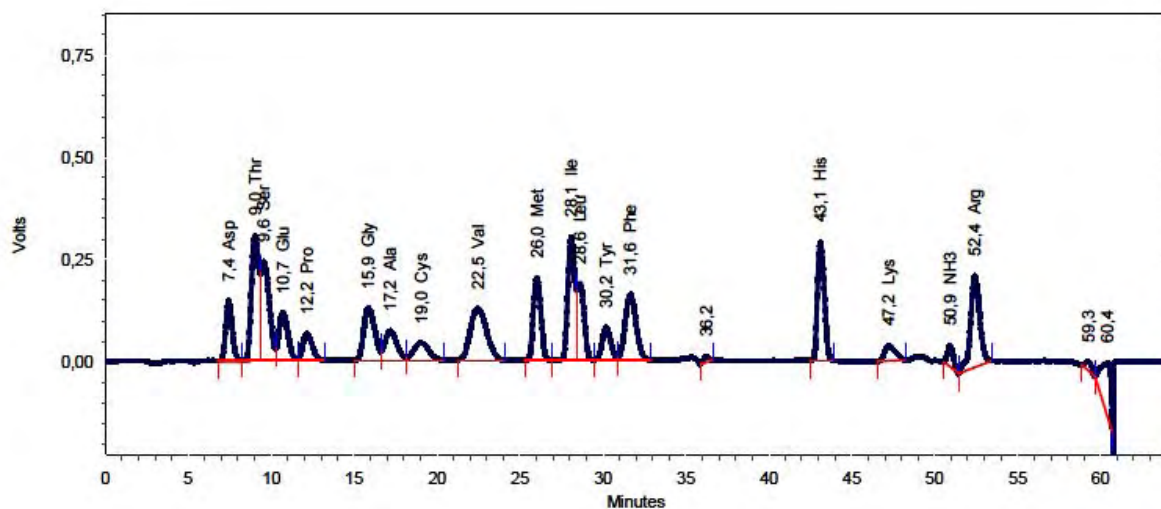
A Tabela 8 resume os resultados obtidos nos três aminogramas. Através das áreas foi possível verificar a eficiência da dialisabilidade que foi confirmada pela elevada absorção dos aminoácidos oriundos das proteínas presentes no soro de queijo e liberados durante a digestão gastrointestinal.

Tabela 8. Área total referente aos aminogramas apresentados nas Figuras 8, 9 e 10.

<i>Aminograma</i>	<i>Área Unidades?</i>
Figura 8 - padrão de aminoácidos	130.773.136
Figura 9 - digestão gastrointestinal externa (DI _{ext} NH)	142.782.976
Figura 10- digestão gastrointestinal interna (DI _{int} NH)	148.052.898

4.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE do soro de queijo com médio teor de hidrólise (MTH)

Amostra do digesto gastrointestinal externo do soro com médio teor de hidrólise (DI_{ext}MTH) foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência para análise de aminoácidos. Para quantificação foi necessário fazer uma coluna com padrões de aminoácidos, a qual está representada na Figura 11, a seguir.



Fluorescência
(Ex:350nm, Em:450nm)

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1	Asp	7,435	4097058	100,000 CAL	40970,58
2	Thr	9,024	9908054	100,000 CAL	99080,54
3	Ser	9,572	8184167	100,000 CAL	81841,66
4	Glu	10,710	4399575	100,000 CAL	43995,75
5	Pro	12,159	2580687	100,000 CAL	25806,87
6	Gly	15,867	5904423	100,000 CAL	59044,23
7	Ala	17,164	3645024	100,000 CAL	36450,24
8	Cys	19,032	2672234	100,000 CAL	26722,34
9	Val	22,452	8589595	100,000 CAL	85895,95
10	Met	26,017	6314710	100,000 CAL	63147,10
11	Ile	28,083	9327730	100,000 CAL	93277,30
12	Leu	28,616	4990415	100,000 CAL	49904,14
13	Tyr	30,198	2938250	100,000 CAL	29382,49
14	Phe	31,648	7351171	100,000 CAL	73511,70
15		36,228	302184	0,000	0,00
16	His	43,109	8145001	100,000 CAL	81450,02
17	Lys	47,216	1785385	100,000 CAL	17853,85
18	NH3	50,931	1263750	100,000 CAL	12637,50
19	Arg	52,412	8819718	100,000 CAL	88197,18
20		59,252	581290	0,000	0,00
21		60,409	5374297	0,000	0,00
Totals			107174716	1800,000 CAL	

Figura 11. Análise dos padrões de aminoácidos (pad11122010c) por CLAE.

Os resultados da análise dos aminoácidos presentes no digesto absorvido na membrana de diálise são apresentados na Figura 12, a seguir, onde é possível observar que ocorreu maior absorção de aminoácidos para o interior da membrana, quando comparado com a absorção dos aminoácidos que vieram do digesto gastrointestinal interno do soro não hidrolisado previamente (Figura 10).

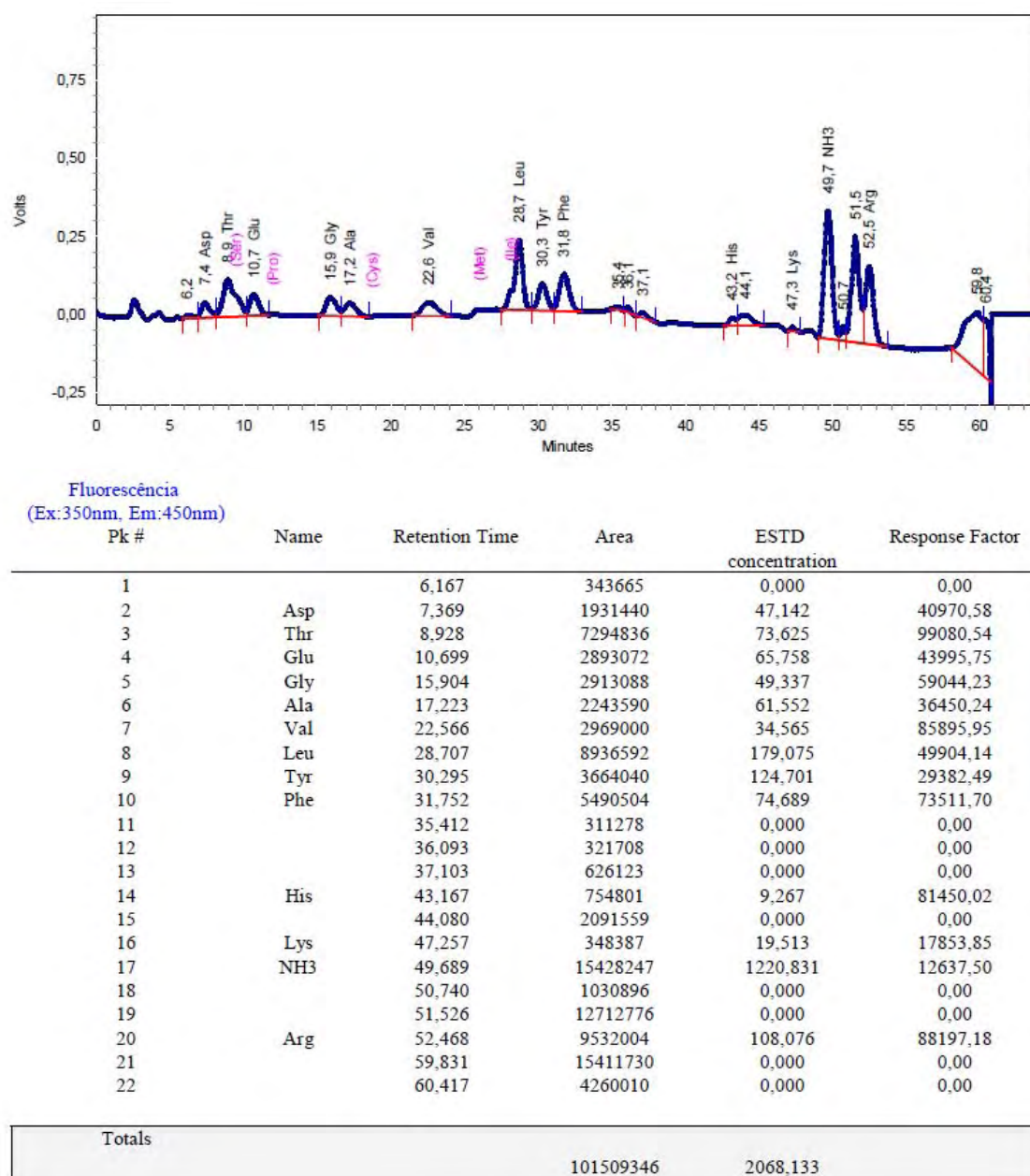
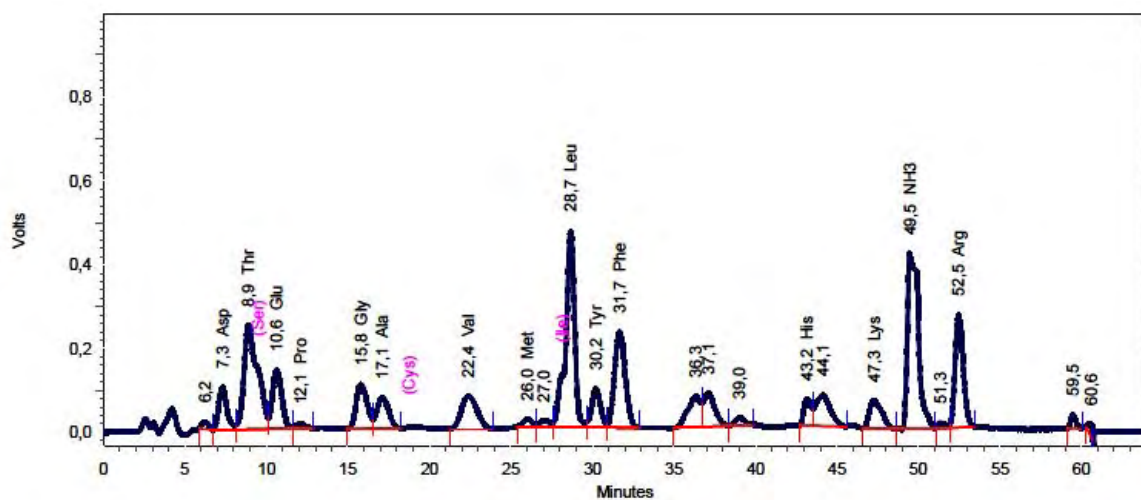


Figura 12. Análise do digesto gastrointestinal externo do soro com médio teor de hidrólise (DI_{ext}MTH) por CLAE.



Fluorescência
(Ex:350nm, Em:450nm)

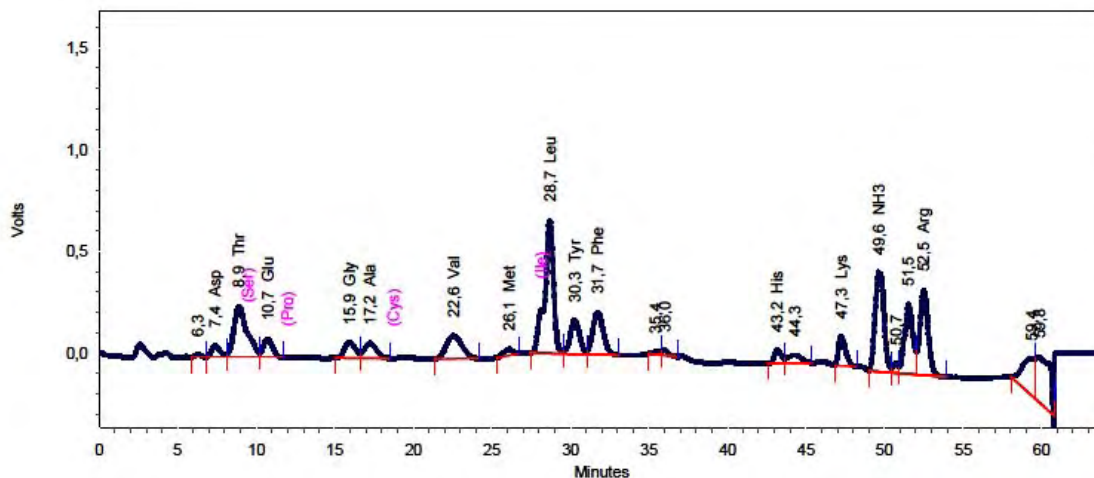
Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1		6,230	492390	0,000	0,00
2	Asp	7,295	3557538	78,160	45516,39
3	Thr	8,908	14452292	131,630	109795,08
4	Glu	10,633	5640193	115,467	48847,00
5	Pro	12,086	469922	17,096	27487,35
6	Gly	15,800	4974420	78,581	63302,80
7	Ala	17,109	3730293	96,296	38737,65
8	Val	22,392	5234968	56,246	93072,75
9	Met	25,982	729835	10,712	68131,94
10		27,000	716917	0,000	0,00
11	Leu	28,663	18050529	314,577	57380,35
12	Tyr	30,216	3591843	107,476	33419,92
13	Phe	31,660	10480711	132,036	79377,92
14		36,327	3903505	0,000	0,00
15		37,107	3873129	0,000	0,00
16		39,018	744671	0,000	0,00
17	His	43,155	1891341	22,099	85586,16
18		44,144	4676057	0,000	0,00
19	Lys	47,268	3553116	189,652	18734,94
20	NH3	49,454	19577824	2980,074	6569,58
21		51,333	455027	0,000	0,00
22	Arg	52,456	9424877	107,665	87538,72
23		59,464	776404	0,000	0,00
24		60,579	500500	0,000	0,00
Totals			121498302	4437,766	

Figura 13. Análise do digesto gastrointestinal interno (DI_{int}MTH) por CLAE.

4.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE do soro de queijo com alto teor de hidrólise (ATH)

Os resultados da análise de aminoácidos do digesto gastrointestinal externo ($DI_{ext}ATH$) do soro com alto teor de hidrólise estão apresentados na Figura 18, a seguir. Pode-se observar nestes resultados que vários aminoácidos estão presentes, confirmando a ação das enzimas proteolíticas utilizadas.

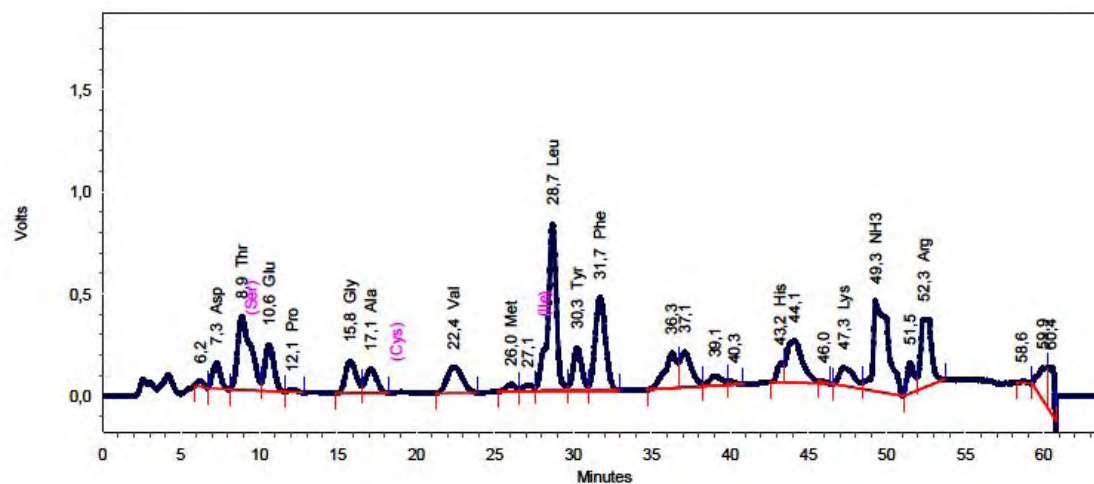
Na Figura 18, são apresentados os resultados do aminograma do digesto gastrointestinal do soro com alto teor de hidrólise ($DI_{int}ATH$). Observou-se nestes resultados que houve excelente absorção de aminoácidos para o interior da membrana de diálise. Estes resultados confirmam a eficiência das hidrolises enzimáticas nas proteínas do soro de queijo e a metodologia de dialisabilidade aplicada.



Fluorescência
(Ex:350nm, Em:450nm)

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1		6,259	411496	0,000	0,00
2	Asp	7,379	2290565	55,908	40970,58
3	Thr	8,915	14799948	149,373	99080,54
4	Glu	10,733	3717661	84,500	43995,75
5	Gly	15,914	3786462	64,129	59044,23
6	Ala	17,230	3916735	107,454	36450,24
7	Val	22,563	7874451	91,674	85895,95
8	Met	26,099	1262911	20,000	63147,10
9	Leu	28,686	25744363	515,876	49904,14
10	Tyr	30,274	6953364	236,650	29382,49
11	Phe	31,730	9669149	131,532	73511,70
12		35,417	504799	0,000	0,00
13		36,002	677104	0,000	0,00
14	His	43,164	2052657	25,201	81450,02
15		44,266	2311329	0,000	0,00
16	Lys	47,254	4600429	257,672	17853,85
17	NH3	49,624	19398162	1534,968	12637,50
18		50,737	1089203	0,000	0,00
19		51,519	12685689	0,000	0,00
20	Arg	52,482	15324975	173,758	88197,18
21		59,375	9521834	0,000	0,00
22		59,834	14716504	0,000	0,00
Totals			163309789	3448,696	

Figura 14. Análise do digesto gastrointestinal externo do soro com alto teor de hidrólise (DI_{ext}ATH) por CLAE.



Fluorescência
(Ex:350nm, Em:450nm)

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1		6,216	813992	0,000	0,00
2	Asp	7,250	4331255	105,716	40970,58
3	Thr	8,883	20865466	210,591	99080,54
4	Glu	10,621	8966084	203,794	43995,75
5	Pro	12,062	453349	17,567	25806,87
6	Gly	15,783	7489097	126,839	59044,23
7	Ala	17,092	5752676	157,823	36450,24
8	Val	22,405	8614245	100,287	85895,95
9	Met	26,020	1387081	21,966	63147,10
10		27,104	1322519	0,000	0,00
11	Leu	28,689	31408483	629,376	49904,14
12	Tyr	30,264	8259888	281,116	29382,49
13	Phe	31,710	21012845	285,844	73511,70
14		36,286	9216746	0,000	0,00
15		37,106	9104634	0,000	0,00
16		39,056	2811831	0,000	0,00
17		40,250	512257	0,000	0,00
18	His	43,212	2341929	28,753	81450,02
19		44,087	14638795	0,000	0,00
20		45,958	89209	0,000	0,00
21	Lys	47,260	5795719	324,620	17853,85
22	NH3	49,284	29609731	2343,006	12637,50
23		51,480	4730002	0,000	0,00
24	Arg	52,332	16071011	182,217	88197,18
25		58,583	225267	0,000	0,00
26		59,917	7127503	0,000	0,00
27		60,424	5292257	0,000	0,00
Totals			228243874	5019,514	

Figura 15. Análise do digesto gastrointestinal do soro com alto teor de hidrólise (DI_{int}ATH) por CLAE.

Como pode ser observado na Tabela 9, a seguir, comparando-se o soro com médio teor de hidrólise (MHT) em relação aos diferentes tratamentos (com ou sem digestão gastrointestinal) pode-se verificar que no MHT com digestão gastrointestinal houve um aumento na absorção dos aminoácidos Asp, Thr, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Leu, Tyr, Phe, His, Lys e Arg; uma diminuição na absorção apenas do aminoácido Ile. Os aminoácidos Ser, Cys e Ile não foram detectados. Quando comparado o soro com alto teor de hidrólise (ATH) em relação aos diferentes tratamentos pode-se verificar que no ATH com digestão gastrointestinal houve um aumento na absorção dos aminoácidos Asp, Thr, Glu, Pro, Gly, Ala, Leu, Tyr, Phe, Lys e Arg; uma diminuição na absorção dos aminoácidos Val, Met, Ile e His e não foram detectados os aminoácidos Ser e Cys (tanto no soro com digestão gastrointestinal como no soro sem digestão gastrointestinal). Estes dados sugerem que com a digestão gastrointestinal houve melhora na absorção dos aminoácidos tanto para o MHT como para o ATH.

De acordo com a Tabela 10, a seguir, comparando-se o soro com médio teor de hidrólise (MHT) em relação ao soro não hidrolisado (NH) pode-se verificar um aumento na absorção dos aminoácidos Asp, Thr, Glu, Pro, Gly e Arg, e uma diminuição na absorção dos aminoácidos Ala, Val, Met, Leu, Tyr, Phe, His e Lys. Os aminoácidos Ser, Cys e Ile não foram detectados.

Tabela 10. Concentração determinadas de aminoácidos nas diferentes amostras de soro (Não hidrolisado – NH, com médio teor de hidrólise - MTH e com alto teor de hidrólise) os quais sofreram ação das enzimas gastrointestinais e a absorção pela membrana (dialisabilidade), obtidas a partir de aminogramas.

AA	NH Interno (nM)	MHT Interno (nM)	ATH Interno (nM)
Asp	51,511	78,160	105,716
Thr	114,928	131,630	210,591
Ser	61,385	-	-
Glu	87,489	115,467	203,794
Pro	6,824	17,096	17,567
Gly	62,841	78,581	126,839
Ala	115,603	96,296	157,823
Cys	13,729	-	-
Val	101,172	56,246	100,287
Met	43,079	10,712	21,966
Ile	70,169	-	-
Leu	339,668	314,577	629,376
Tyr	121,377	107,476	281,116
Phe	140,170	132,036	285,844
His	34,098	22,099	28,753
Lys	314,154	189,652	324,620
NH3	470,445	2980,074	2343,006
Arg	78,573	107,665	182,217

Quando comparado o soro com alto teor de hidrólise (ATH) em relação ao soro não hidrolisado (NH) pode-se verificar um aumento na absorção dos aminoácidos Asp, Thr, Glu, Pro, Gly, Ala, Leu, Tyr, Phe, Ly e Arg e uma diminuição na absorção dos aminoácidos Val, Met e His. Os aminoácidos Ser, Cys e Ile não foram detectados, como também ocorreu no soro com médio teor de hidrólise (MTH), A hipótese mais provável para a não presença de cisteína é a grande quantidade de pontes dissulfeto dificultando a hidrólise enzimática, entretanto para os outros aminoácidos não temos explicação. Estes dados sugerem que a hidrólise total prévia melhorou a absorção dos aminoácidos quando comparado com o soro NH, enquanto que a hidrólise média apresentou uma absorção menor que o soro ATH e o soro NH, devido apresentar uma quantidade maior

de peptídeos e que tais peptídeos não foram hidrolisados tão eficientemente quanto no soro ATH e no soro NH.

Como pode ser observado na Tabela 11, a seguir, comparando-se os soros MTH e o ATH, ambos sem digestão gastrointestinal, pode-se verificar que no ATH houve um aumento na absorção dos aminoácidos Thr, Glu, Gly, Ile, Leu, Tyr, Phe e His; uma diminuição na absorção apenas do aminoácido Asp e não foram detectados os aminoácidos Ser, Pro, Ala, Cys e Val (tanto no MTH como no ATH). Quando comparado MTH em relação ATH, ambos com digestão gastrointestinal pode-se verificar que no ATH houve um aumento na absorção da maioria dos aminoácidos Asp, Thr, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Leu, Tyr, Phe, His, Lys e Arg e não foram detectados os aminoácidos Ser, Cys e Ile (tanto no MTH como no ATH). Estes dados sugerem que hidrólise quase total melhora a absorção dos aminoácidos em relação ao MTH independente do tratamento (com ou sem digestão gastrointestinal). Observando-se ainda a Tabela 11, percebe-se uma alta concentração de leucina absorvida, tal fato é muito importante, uma vez que se trata de um aminoácido essencial, ou seja, o organismo não produz e ele é muito importante na manutenção da massa muscular no processo de envelhecimento, evitando a sarcopenia (BONNEFOY, 2003).

Tabela 11. Concentração de aminoácidos determinadas nas amostras de soro MTH e ATH com diferentes tratamentos e somente absorção pela membrana de diálise, obtidas a partir dos aminogramas.

AA	Sem ação das	Com ação das	Sem ação das	Com ação das
	enzimas	enzimas	enzimas	enzimas
	MTH	MTH	ATH	ATH
	Interno (nM)	Interno (nM)	Interno (nM)	Interno (nM)
Asp	27,744	78,160	18,701	105,716
Thr	14,557	131,630	24,567	210,591
Ser	-	-	-	-
Glu	13,493	115,467	37,034	203,794
Pro	-	17,096	-	17,567
Gly	-	78,581	7,530	126,839
Ala	-	96,296	-	157,823
Cys	-	-	-	-
Val	-	56,246	-	100,287
Met	-	10,712	-	21,966
Ile	4,379	-	12,540	-
Leu	28,080	314,577	73,580	629,376
Tyr	-	107,476	34,053	281,116
Phe	17,188	132,036	90,377	285,844
His	4,395	22,099	66,956	28,753
Lys	-	189,652	-	324,620
NH3	3319,178	2980,074	1822,373	2343,006
Arg	-	107,665	-	182,217

CAPÍTULO 3

***Administração in vivo de
suplemento alimentar a base de
proteínas do soro de queijo e de seus
hidrolisados: análises bioquímicas***

CAPÍTULO 3: Administração *in vivo* de suplemento alimentar à base de proteínas de soro de queijo e de seus hidrolisados: análises bioquímicas.

1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo, resíduo obtido na produção de queijo, há algum tempo vem sendo tratado como matéria prima de grande valor agregado, devido a seu conteúdo proteico. Essas proteínas, presentes em quantidades significativas nesse resíduo, tinham como destino final, esgotos ou muitas das vezes, eram despejadas em rios como efluentes das indústrias queijeiras, principalmente as de pequeno porte. Essas soroproteínas se tornaram protagonistas de inúmeros estudos, como forma de minimização do impacto ambiental causado por elas e do aproveitamento do seu rico conteúdo proteico, comprovadamente superior ao da caseína (HA e ZEMEL, 2003; SGARBIERI, 2004, MARSHALL, 2004 e HARAGUCHI et al., 2006).

Devido a sua riqueza no conteúdo de aminoácidos, principalmente, os de cadeia longa, as proteínas do soro de queijo tem se mostrado eficientes quando utilizadas como matéria prima essencial em suplementos alimentares, devido a algumas de suas propriedades fisiológicas funcionais, como por exemplo: estimular a síntese de glutathione, atividade antimicrobiana e antiviral, efeitos positivos na redução de colesterol, ação anti-hipertensiva, elevação do triptofano¹ sanguíneo, estimulação da síntese proteica pós-prandial limitando a perda de proteína corpórea (sarcopenia), dentre outras (HARPER, 2000; BOIRIE et al., 2001; DANGIN et al., 2002).

Neste capítulo, serão abordados os temas relacionados ao período experimental (manutenção, administração de suplemento nutricional e eutanásia dos animais), coleta sanguínea e de peças anatômicas (rins, fígado, ossos fêmures e músculo gastrocnêmio) para a realização de análises bioquímicas e histológicas. Portanto, esse capítulo teve como objetivos, a produção de suplementos alimentares a base de proteínas do soro de queijo com médios e altos teores de hidrólise e sua administração a ratos wistar jovens, para que, por meio de análises bioquímicas e histológicas, pudesse se verificar as propriedades funcionais e fisiológicas desses hidrolisados.

¹ Precursor do neurotransmissor serotonina e do hormônio neurosecretor melatonina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar, por meio de exames bioquímicos, os efeitos da administração de proteínas integrais do soro de queijo e de seus hidrolisados com médios e altos teores de hidrólise como suplemento alimentar a ratos wistar jovens.

2.2. Objetivos Específicos

- Comparar, por meio dos exames bioquímicos: glicemia em jejum, funções hepática e renal, além de albumina sérica, fósforo, proteínas totais e cálcio sérico, os efeitos de suplemento com proteínas integrais e proteínas com médio e alto teor de hidrólise entre os grupos experimentais e o controle;
- Analisar os efeitos desse suplemento nutricional sobre as massas corporal, muscular e óssea, além do conteúdo proteico muscular e ósseo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Animais

Ratos Wistar do sexo masculino, de padrão sanitário convencional, com idade inicial de 3-4 meses e peso aproximado de 150-200 g adquiridos do biotério da UNESP- Campus Botucatu.

3.1.2. Suplemento

Proteínas integrais do soro de queijo e seus hidrolisados com médios e altos teores de hidrólise.

3.2. 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 da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aprovado o parecer Nº 34/2010.

3.3. Métodos

3.3.1. Administração dos hidrolisados das proteínas do soro de queijo como suplemento nutricional

Os hidrolisados foram produzidos conforme metodologia desenvolvida por Marques (2009). Foram administrados diariamente 20 g de ração/animal, que corresponde a 440 mg de proteína, o que seria equivalente a 0,8 g de proteína/Kg peso dos animais. 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 0,2 g/prot./Kg peso/dia/animal ou 110 mg 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 6 mg/mL, calculou-se (em mL) a quantidade de suplemento a ser administrado. A quantidade calculada foi de 1 mL/dia.

3.3.2. Análise da massa muscular (peso), ingestão de água e ração: períodos de manutenção e experimental

Para a tomada de peso dos animais foi utilizada uma balança eletrônica Metler, modelo AS-F1, com precisão de 0,01g.

Os animais eram transportados em suas próprias caixas de contenção até a balança, distante cerca de 2 metros da sala onde estavam alojados. Um a um, eram então manuseados e colocados em um pequeno recipiente sobre o prato da balança. A pesagem era realizada às terças-feiras e tinha início às 10 h; durava cerca de 2 horas e foi efetuada semanalmente até o fim do experimento.

A ingestão de água foi acompanhada diariamente. A ração utilizada no período de manutenção dos animais até o início da fase experimental (21 dias) foi a Labina, da marca Purina. Já a utilizada no período de experimentação (43 dias), foi fornecida pela empresa Prag Soluções LTDA e balanceada de forma a fornecer 0,8 g/prot./Kg peso/dia (440 mg de proteína/20 g de ração) e demais nutrientes de acordo com a Recomendação AIN 93.

3.3.3. Suplementação

A suplementação foi produzida no Laboratório de Enzimologia, conforme metodologia desenvolvida por Marques (2009).

3.3.4. Ambiente de contenção dos animais e limpeza das contenções

Os 48 ratos Wistar adquiridos do Biotério de Botucatu chegaram ao biotério das Ciências Biológicas – UNESP, Campus Araraquara, em fevereiro de 2011, onde permaneceram até o fim do experimento, em abril de 2011.

Os animais foram mantidos individualmente em caixas plásticas contentoras de polipropileno (padrão), devidamente identificadas e organizadas no biotério em estantes apropriadas para tal finalidade. A temperatura ambiente foi ajustada para $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa, para 60%.

A cada três dias as caixas eram lavadas e desinfetadas, forradas com maravalha de modo a favorecer conforto dos animais. Diariamente, as mesmas eram abastecidas com ração Labina e água filtrada *ad libitum*. Os cronogramas de limpeza foram mantidos até o final do período de experimentação.

3.3.5. Estabelecimento do tamanho da amostra, número de grupos experimentais e administração do suplemento alimentar

Utilizou-se como critério para o estabelecimento do tamanho da amostra, 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) (PORTEOUS, 1994).

Por esse motivo, se a amostra escolhida for de dez animais, ainda que nesta população existam animais que não correspondam à normalidade, temos entre seis e sete animais para comprovar os resultados. Esse *n* (número amostral) é considerado aceitável pela comunidade científica (SAMPAIO, 2005). A partir destas ponderações definiram-se grupos com dez animais.

Quinze dias antes do início do período experimental, os animais foram pesados e separados em quatro grupos de dez animais, a saber: Grupo Controle (GC), Grupo Não Hidrolisado (NH), Grupo com Médio Teor de Hidrólise (MTH) e Grupo com Alto Teor de Hidrólise (ATH). Os critérios utilizados foram separação dos animais de maiores e menores pesos em relação à média (200 g com uma variação de $\pm 5\%$) e a não ocorrência de aparentes anomalias. 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 ingesta diária de alimentação. A ingestão de água também foi apontada diariamente.

O período experimental teve a duração de 43 dias o que corresponde a um período de seis meses de ingestão de suplementação.

Os grupos foram alimentados durante todo o período experimental as 11 h e assim distribuídos:

Grupos:

- Grupo GC: 20 g de dieta normoproteica padrão AIN 93M e água *ad libitum*.

- Grupo NH: 20 g de dieta normoproteica padrão AIN 93M, acrescida de fragmento da ração Labina embebida com 1 mL de suplemento nutricional com proteínas de soro de queijo integrais e *água ad libitum*.
- Grupo MTH: 20 g de dieta normoproteica padrão AIN 93M, acrescida de fragmento da ração Labina embebida com 1 mL de suplemento nutricional com proteínas de soro de queijo com médio teor de hidrólise e *água ad libitum*.
- Grupo ATH: 20 g de dieta normoproteica padrão AIN 93M, acrescida de fragmento da ração Labina embebida com 1 mL de suplemento nutricional com proteínas de soro de queijo com alto teor de hidrólise e *água ad libitum*.

3.3.6. Sacrifício dos animais

Após o período de suplementação (43 dias), os animais foram mantidos por 12 horas em jejum e sacrificados por decapitação. De acordo com Conlee et al. (2005), a decapitação produz uma rápida perda de consciência (± 3 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 se pode utilizar anestesia como coadjuvante do processo, que no caso de roedores poderia ser: isoflurano, halotano e metoxiflurano.

Em especial, nessa pesquisa, a utilização de anestésicos não foi recomendada, uma vez que se pretendia, após a eutanásia, realizar várias análises sanguíneas e do conteúdo proteico 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.

3.3.7. Extração de sangue, órgãos, músculos e ossos

Após a decapitação os animais foram submetidos à 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 (cinco horas após).

Retirado o sangue, o animal passou pela extração das peças. Foram extraídos: músculos soleus, EDL (Extensor Digitorum Longus), tibial (pata esquerda) e gastrocnêmio (perna direita e esquerda), fêmur (direito e esquerdo), rins direito e esquerdo e fígado. Todas as peças, após serem extraídas foram passadas em solução fisiológica de NaCl (0,9%) para retirada de interferentes (sangue e pelos) e foram pesadas. O osso fêmur e o músculo gastrocnêmio esquerdos e o fígado dos animais foram armazenados em solução de formol para posteriores análises histológica. As demais peças foram embrulhadas em papel alumínio e congeladas até o momento das análises.

3.3.8. Análise sanguínea – Exames bioquímicos

As análises sanguíneas foram realizadas no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel - Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Clínica da Universidade Estadual Paulista UNESP- Jaboticabal. O equipamento utilizado foi LABQUEST e os kits da marca LABTEST. Todas as análises foram realizadas de acordo com protocolos utilizados por esse Laboratório referência em análises clínicas.

Foram realizadas análises sanguíneas de: glicose jejum, colesterol total, HDL, triglicerídeos, TGO/AST, TGP/ALT, creatinina, ureia, albumina sérica, fósforo, proteínas totais e cálcio sérico.

3.3.9. Análise da massa do fêmur, cálcio ósseo, proteína do músculo gastrocnêmio

Os músculos, tibial, EDL, gastrocnêmio e soleus, bem como os ossos femurais, rins esquerdo e direito e fígado foram congelados para posterior análise, conforme protocolo próprio.

O cálcio do fêmur foi analisado por espectrofotometria de absorção atômica.

3.3.10. Análise estatística dos dados

Os resultados numéricos foram expressos em médias ($\pm$ desvio padrão). As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA) seguida, quando detectada diferença, dos testes de Tukey e/ou Holm-Sidak. O software utilizado para a avaliação dos resultados foi o Sigma Stat 3.1 – Advisory Statistics for Scientists. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Massa muscular (peso), ingestão de água e consumo de ração suplementada com proteínas integrais do soro de queijo e proteínas com médio e alto teor de hidrólise

O monitoramento do consumo de ração e água foi feito por aferições diárias, com seus respectivos registros em planilhas. A aferição da massa muscular foi realizada semanalmente e os seus valores também foram registrados em planilhas. Foi observado que durante o período do experimento (43 dias), todos os grupos consumiam toda a ração disponibilizada e os grupos experimentais NH, MTH e ATH consumiam todo o suplemento oferecido.

Os dados analisados e mostrados na Tabela 1 a seguir, indicam que houve, ao final do experimento, um aumento da massa muscular em todos os grupos suplementados e também no grupo controle, porém, sem diferença significativa entre eles, tanto para o ganho de massa muscular (peso), quanto para a ingestão de água.

Tabela 1. Médias de massa muscular e ingestão de água dos animais.

Parâmetros	Controle	NH	MTH	ATH
Peso inicial (g)	283,50 $\pm$ 23,99 ^a	294,83 $\pm$ 23,77 ^a	283,25 $\pm$ 19,29 ^a	292,67 $\pm$ 32,45 ^a
Peso final (g)	410,10 $\pm$ 11,45 ^a	422,20 $\pm$ 14,44 ^a	413,60 $\pm$ 12,83 ^a	404,50 $\pm$ 18,43 ^a
Ingestão de água (mL)	75,56 $\pm$ 12,92 ^a	80,14 $\pm$ 12,65 ^a	81,24 $\pm$ 12,79 ^a	79,12 $\pm$ 12,44 ^a

Resultados apresentados por média e desvio padrão ($\pm$), analisados por ANOVA seguidos de **Holm-Sidak method e/ou Teste de *Tukey Valores com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

4.2. Análises: Proteína do músculo gastrocnêmio e cinzas do fêmur direito

Os dados apresentados na Tabela 2 a seguir, mostram que em relação à concentração de proteína do músculo gastrocnêmio, dentre os grupos que receberam suplemento, apenas o grupo NH (proteínas integrais), apresentou a maior média em comparação ao grupo controle, mostrando-se significativamente diferente dele. Em estudo realizado por Marques (2009), todos os grupos que receberam dieta suplementada apresentaram maiores médias de concentração do músculo gastrocnêmio em comparação ao grupo controle, diferenciando-se estatisticamente dele.

Os resultados para dosagem de cinzas do fêmur, apresentados a seguir, mostram que houve diferença significativa apenas entre as concentrações dos grupos NH e MTH. Resultados diferentes dos verificados por Marques, 2009 que não encontrou diferença nas dosagens do grupo controle em comparação a todos os grupos que receberam dieta suplementada.

Tabela 2. Médias das análises de proteínas do músculo gastrocnêmio direito e cinzas do fêmur direito dos animais.

Grupos	Controle	Não Hidrolisado	Médio Teor de Hidrólise	Alto Teor de Hidrólise
**Proteína muscular (mg prot./100g mús.).	0,12±0,01 ^a	0,14±0,01 ^b	0,13±0,01 ^{ab}	0,12±0,01 ^a
**Cinzas do fêmur direito (g)	0,41±0,02 ^{ab}	0,43±0,02 ^a	0,39±0,02 ^b	0,40±0,03 ^{ab}

Resultados apresentados por média e desvio padrão ($\pm$), analisados por ANOVA seguidos de **Holm-Sidak method e/ou Teste de *Tukey Valores com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si ($p < 0.05$).

4.3. Exames bioquímicos

Foram realizadas análises sanguíneas de: glicemia em jejum, triglicérides, colesterol total, HDL, TGO/AST e TGP/ALT, creatinina, ureia, proteínas totais, albumina sérica, fósforo e cálcio sérico. Para a apresentação dos resultados foram utilizadas siglas que identificam os grupos de animais que participaram dessa pesquisa, a saber: Grupo controle (GC), Grupo Não Hidrolisado (NH), Grupo com Médio Teor de Hidrólise (MTH) e Grupo com Alto Teor de Hidrólise (ATH).

4.3.1. Glicemia em jejum e Cálcio ósseo

Os resultados apresentados na Tabela 3 a seguir, para glicemia em jejum demonstram que os grupos MTH e ATH apresentaram a menor concentração de glicose em comparação ao controle e ao grupo NH, diferindo significativamente desses grupos. Observa-se também que a concentração de glicose no grupo controle foi a maior em comparação a todos os grupos que receberam suplemento. Resultados semelhantes aos observados por Guimarães e Mazáro, 2004 e Dantas et al., 2006 em estudo sobre “Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá” e diferente do encontrado por GIKNIS e CLIFFORD, 2008, em estudo sobre "Parâmetros clínicos laboratoriais para Crl: Wi (Han) ratos". Marques (2009), em estudos semelhantes a esse, não encontrou diferença significativa entre o controle e os grupos com dieta suplementada. Diante dos valores apresentados nesse estudo para glicemia, pode-se constatar que os suplementos hidrolisados diminuíram os níveis de glicemia nos grupos experimentais. que os animais dos grupos controle e NH apresentavam uma tendência a desenvolverem diabetes.

Para a dosagem de cálcio ósseo, os resultados mostram que o grupo controle apresentou a maior concentração em comparação aos grupos com dieta suplementada, porém, diferiram significativamente do controle, apenas os grupos NH e ATH. Resultados diferentes do encontrado por Marques (2009), onde todos os grupos com dieta suplementada apresentaram concentração de cálcio ósseo significativamente maior em relação ao controle. Esse resultado nos permite inferir que a maior absorção de cálcio na idade avançada, é devido à osteoporose (perda de cálcio ósseo ao longo da vida).

Tabela 3. Perfil glicêmico e quantificação de cálcio ósseo em ratos Wistar alimentados com dieta suplementada com proteínas integrais e hidrolisados de proteínas com alto e médio teor de hidrólise

Parâmetros	Controle	NH	MTH	ATH
**Glicemia jejum (mg/dL)	122,32±11,45 ^a	119,07±19,60 ^a	100,69±15,37 ^b	98,78±12 ^b
**Dosagem de cálcio ósseo (mg cálcio/g cinzas)	456,63±3,82 ^a	420,95±6,00 ^c	454,96±5,67 ^a	446,71±6,40 ^b

Resultados apresentados por média e desvio padrão ($\pm$), analisados por ANOVA seguidos de **Holm-Sidak method e/ou Teste de *Tukey Valores com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si ($p < 0.05$).

4.3.2. Triglicérides, Colesterol total e HDL.

Sabe-se que altos níveis de triglicérides e colesterol na corrente sanguínea podem ser relacionados ao aparecimento de dislipidemia e, consequentemente, complicações associadas a ela como: aterosclerose, risco aumentado de doença cardíaca e infarto do miocárdio (SCHIAVO, LUNARDELLI e OLIVEIRA, 2003).

Os resultados, quanto ao perfil lipídico apresentados na Tabela 4 a seguir, demonstraram que não houve diferença para os níveis séricos de triglicérides entre o controle e os grupos NH, MTH e ATH. As médias apresentadas são inferiores aos resultados observados por Henriques et al. (2008), em estudo sobre a “Influência dietética de ração a base de fibras no perfil glicêmico e lipídico em ratos wistar” e por Carvalho-Filho, (2011) em estudo sobre o “Efeito do consumo de carne de avestruz no metabolismo de lipídeos em ratos wistar, porém, próximos aos resultados do grupo controle do estudo de Dantas et al. (2006) em estudo da “Comparação de parâmetros bioquímicos plasmáticos de ratos wistar produzidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá”.

Para os níveis de colesterol, todos os grupos apresentaram concentrações maiores em comparação ao controle, porém, apenas o grupo MTH apresentou diferença significativa. Haraguchi et al. (2009) em estudo sobre a “Influência das proteínas do soro sobre enzimas hepáticas, perfil lipídico e formação óssea em ratos hipercolesterolêmicos”, mostraram resultados próximos aos verificados nesse estudo, enquanto que Marques (2009) não encontrou diferença significativa entre o grupo controle e todos os grupos que receberam dieta suplementada. Como o grupo MTH recebeu suplementação com médio teor de hidrólise, é muito provável que ainda

houvesse a existência de frações pépticas com propriedades hipocolesterolêmicas, semelhantemente aos resultados apresentados por Pacheco (2005), o qual relata a glutational.

O grupo MTH mostrou a maior concentração nos níveis de HDL em comparação a todos os outros grupos que receberam dieta suplementada e ao grupo controle. Segundo Amaganijan e Batlouni (2000), uma das causas mais importantes para o aparecimento das doenças cardiovasculares (DCV) são a elevação de colesterol-LDL e a diminuição de colesterol-HDL. De acordo com dados clínicos, o aumento da concentração de HDL no sangue diminui risco cardiovascular (RANG et al., 2005; ASSMANN, 2004). Diante dessa afirmação, é possível que o suplemento administrado ao grupo MTH possa apresentar peptídeos com capacidade de reduzir o risco cardiovascular.

Tabela 4. Perfil lipídico de ratos Wistar alimentados com dieta suplementada com proteínas integrais e hidrolisados de proteínas com alto e médio teor de hidrólise.

Parâmetros	Controle	NH	MTH	ATH
Triglicérides (mg/dL)	77.57±31.50 ^a	62.50±18.40 ^a	102.69±54.32 ^a	85.44±30.33 ^a
*Colesterol (mg/dL)	66.53±8.16 ^a	76.23±8.38 ^{ab}	85.90±14.47 ^b	79.54±7.76 ^{ab}
**HDL (mg/dL)	39.96±4.36 ^a	38.90±4.28 ^a	59.63±8.04 ^b	42.51±8.61 ^a

*Resultados apresentados por média e desvio padrão (±), analisados por ANOVA seguidos de **Holm-Sidak method e/ou Teste de *Tukey Valores com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si (p<0.05).*

4.3.3. Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT).

O fígado é o órgão responsável por grande parte das reações metabólicas ocorridas no organismo e quaisquer alterações na atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) indicam doenças ou lesão nos tecidos, principalmente no fígado, por isso essas enzimas são consideradas como principais marcadores de distúrbios ligados a esse órgão (OZAKI, TERAODA e OTA, 1995).

Os resultados demonstraram na Figura 1 a seguir, que para a concentração da enzima Aspartato Aminotransferase (AST), apenas os grupos NH e ATH apresentaram

diferença em relação ao controle, mas, todos os grupos que receberam dieta suplementada apresentaram concentrações mais altas em comparação ao controle. Para a concentração da enzima Alanina Aminotransferase (ALT), apenas o grupo ATH apresentou diferença em comparação ao controle, embora todas as concentrações dos demais grupos experimentais tenham sido maiores em relação ao controle. Resultados diferentes dos verificados por Marques (2009), em estudo semelhante a esse, porém com ratos idosos, onde foi encontrada diferença significativa entre o grupo controle e os grupos que receberam dieta suplementada com proteínas do soro de queijo tanto para a enzima aspartato aminotransferase, como para a alanina aminotransferase. No entanto, os resultados observados por Haraguchi et al. (2009), apontam que a administração de dietas com alto teor de colesterol causou aumento na atividade das enzimas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, mostrando portanto, maiores médias dessas enzimas em relação ao controle que recebeu dieta padrão AIN-93M, ainda segundo esse mesmo autor, os resultados apresentados para ratos do grupo controle que consumiram dieta com adição de proteínas do soro de queijo em substituição a caseína, ficou evidente que essas proteínas impediram o aumento da enzima aspartato aminotransferase de forma significativa, apontando um efeito protetor ao estresse oxidativo provocado pela ingestão de dieta rica em colesterol.

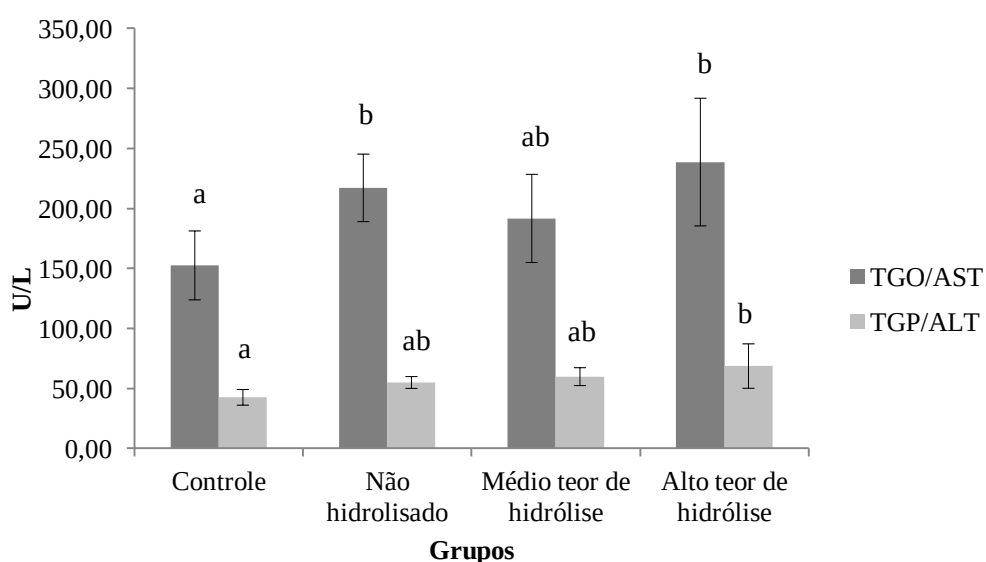


Figura 1. Análise dos resultados obtidos nas dosagens de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em ratos com dieta suplementada com proteínas de soro de queijo integrais e com médio e alto teor de hidrólise.

4.3.4. Creatinina e Ureia

A creatinina, um resíduo metabólico resultante do consumo de energia pelos músculos, pode ser considerado um parâmetro principal para a análise de disfunções ou insuficiência renais. A sua concentração no sangue é inversamente proporcional à taxa de filtração desse metabólito pelos rins. A ureia, por sua vez é um composto nitrogenoso cristalino e o principal produto terminal do metabolismo de proteínas.

As análises de creatinina apresentadas na Tabela 5 a seguir, mostram que as médias dos grupos NH, MTH e ATH que receberam dieta suplementada com proteínas do soro de queijo não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle. Nossos resultados estão abaixo das concentrações encontradas por Haraguchi et al. (2009) e diferem dos obtidos por Marques (2009), pois no seu estudo, apenas o grupo NH apresentou a maior concentração desse metabólito e diferiu significativamente do grupo controle.

Para as análises de ureia, os resultados mostram que apenas os grupos MTH e ATH apresentaram concentrações significativamente maiores em comparação ao controle. Resultados diferentes dos observados por Marques (2009), em que o grupo controle apresentou a menor média em comparação aos grupos que receberam dieta com suplemento a base de proteínas do soro de queijo, porém sem diferença significativa. As concentrações para ureia apresentadas aqui se mostram compatíveis com as verificadas por Haraguchi et al. (2009).

Tabela 5. Análise dos resultados obtidos nas dosagens de creatinina e ureia em ratos com dieta suplementada com proteínas de soro de queijo integrais e com médio e alto teor de hidrólise.

Parâmetros	Controle	NH	MTH	ATH
Creatinina (mg/dL)	0,67±0,03 ^a	0,65±0,04 ^a	0,66±0,04 ^a	0,69±0,06 ^a
**Uréia (mg/dL)	25,99±3,04 ^a	28,00±3,18 ^{ab}	32,67±3,66 ^b	33,02±5,42 ^b

Resultados apresentados por média e desvio padrão ($\pm$), analisados por ANOVA seguidos de **Holm-Sidak method e/ou Teste de *Tukey Valores com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si ($p < 0.05$).

4.3.5. Proteínas totais e Albumina sérica

Como mostrado na Tabela 6 a seguir, observa-se que os valores para proteínas totais foram maiores e estatisticamente diferentes nos grupos MTH e ATH em comparação ao controle e ao grupo NH.

Para os níveis de albumina sérica, os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre o controle e os grupos que receberam suplemento.

Embora as proteínas do soro de queijo possuam elevada digestibilidade e sejam rapidamente absorvidas para a circulação sanguínea, sabe-se que os hidrolisados proteicos contendo peptídeos de pequeno tamanho, di e tripeptídeos, são absorvidos numa velocidade maior, tanto em relação às proteínas como aos aminoácidos livres (GRIMBLE e GRIMBLE, 1998). Diante dessa afirmação, é possível explicar as maiores concentrações de proteínas totais e albumina sérica nos grupos MTH e ATH em relação ao grupo NH (com proteínas integrais).

Tabela 6. Médias de dosagens de proteínas totais e albumina sérica em ratos com dieta suplementada com proteínas de soro de queijo integrais e com médio e alto teor de hidrólise.

Parâmetros	Controle	NH	MTH	ATH
**Proteínas Totais (g/dL)	6,04±0,21 ^a	6,08±0,21 ^a	6,89±0,37 ^b	6,98±0,61 ^b
Albumina sérica (g/dL)	2,72±0,10 ^a	2,67±0,22 ^a	3,28±0,70 ^a	3,22±0,68 ^a

*Resultados apresentados por média e desvio padrão (±), analisados por ANOVA seguidos de **Holm-Sidak method e/ou Teste de *Tukey Valores com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si (p<0.05). a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si (p<0.05).*

4.3.6. Fósforo e Cálcio sérico

Em relação ao fósforo, os resultados apresentados a seguir na Figura 2, mostra que houve diferença significativa entre o controle e o ATH e entre os grupos NH e ATH. Os grupos NH e MTH não diferiram significativamente do controle, porém, houve diferença significativa entre eles. O grupo ATH apresentou a maior concentração

de fósforo em relação aos demais, isso pode ser devido a maior capacidade que a α -lactalbumina tem para ligar minerais, afetando positivamente a sua absorção HARAGUSHI et al., (2006) relataram que as frações proteicas do soro, como glicomacropéptido e α -lactalbumina, podem ter atividade biológica melhorando a absorção dos nutrientes. Para o cálcio sérico, os resultados mostraram que os grupos MTH e ATH diferiram significativamente do controle e do grupo NH, porém, não diferiram entre si. Resultados semelhantes a estes foram verificados por Marques (2009), onde o nível de cálcio sérico foi maior nos grupos com dieta suplementada em comparação ao controle, porém, diferença significativa para maior p₀de ser encontrada somente entre os grupos MTH e ATH.

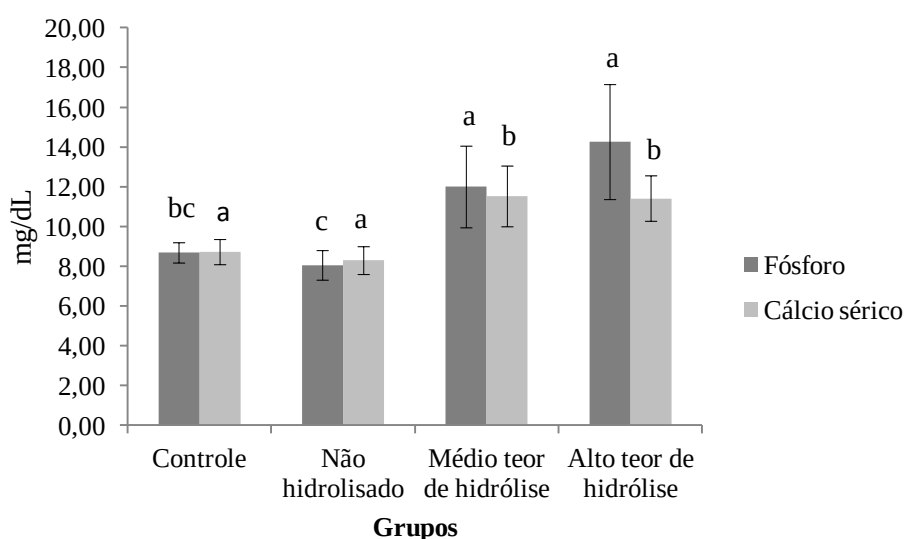


Figura 2. Gráfico das médias de dosagens de fósforo e cálcio sérico em ratos com dieta suplementada com proteínas de soro de queijo integrais e com médio e alto teor de hidrólise.

4.3.7. Músculos: Soleus, Tibial e EDL

Os dados analisados e apresentados na Tabela 10 a seguir, indicam que para as médias de massa seca do músculo soleus, não houve diferença entre o controle e os grupos NH, MTH e ATH. Em relação ao músculo tibial, o grupo MTH apresentou a

maior média em relação aos demais grupos e diferiu significativamente deles. As médias mostradas para o músculo EDL indicam que os grupos NH e MTH apresentaram maiores médias em comparação aos grupos controle e ATH, mostrando significativa diferença dos mesmos.

Resultados verificados por Marques (2009) mostraram que o grupo MTH apresentou a maior média em comparação aos demais grupos, inclusive o controle, indicando que neste grupo, houve um maior incremento da massa muscular em relação a todos os demais grupos. Nesse estudo, não houve diferença significativa entre o controle e os grupos que receberam dieta suplementada. apesar do grupo MTH ter apresentado a maior média, só se diferenciou significativamente do grupo controle.

Tabela 7. Resultados das médias da matéria seca dos músculos soleus, tibial e EDL em ratos em ratos com dieta suplementada com proteínas de soro de queijo integrais e com médio e alto teor de hidrólise.

Parâmetros	Controle	NH	MTH	ATH
**Massa do músculo soleus (g)	0,05±0,00 ^a	0,06±0,01 ^a	0,06±0,01 ^a	0,05±0,00 ^a
**Massa do músculo tibial (g)	0,23±0,01 ^a	0,20±0,04 ^a	0,27±0,00 ^b	0,22±0,02 ^a
*Massa do músculo EDL (g)	0,05±0,00 ^a	0,06±0,01 ^b	0,06±0,00 ^b	0,05±0,00 ^a

*Resultados apresentados por média e desvio padrão (±), analisados por ANOVA seguidos de **Holm-Sidak method e/ou Teste de *Tukey Valores com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si (p<0.05).*

5. CONCLUSÕES

A hidrólise prévia das proteínas do soro do queijo melhorou a biodisponibilidade de aminoácidos e, sendo a leucina, um aminoácido com alta porcentagem de dialisabilidade foi um dos primeiros a ser transportado pelos enterócitos, bem como Lys, Tyr e Arg.

A simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* melhorou, em média, 10% da difusão da maioria dos aminoácidos tanto para os grupos MTH como para o ATH.

Na condição de ATH a difusão dos aminoácidos melhorou, em média, 11% quando comparado com o soro NH, enquanto que o soro MTH apresentou uma melhora da difusão, em média, 16% dos aminoácidos. Com esses resultados infere-se que a hidrólise prévia do soro do queijo é eficaz na liberação dos aminoácidos.

Com relação à difusão dos aminoácidos sem a simulação da digestão gastrointestinal, os soros MTH e ATH apresentaram médias semelhantes, ou seja, houve, em média, 30% de difusão dos aminoácidos.

A alta concentração absorvida do aminoácido leucina mostrou ser uma condição importante, uma vez que se trata de um aminoácido essencial e muito importante na manutenção da massa muscular no processo de envelhecimento, evitando a sarcopenia.

Nas condições utilizadas para produção de hidrolisados das proteínas do soro de queijo com médios e altos teores de hidrólise (MTH e ATH) obtiveram-se produtos com propriedades funcionais ativas que foram administrados aos animais, onde se pôde verificar um aumento nas concentrações de analitos que poderiam contribuir para prevenção de doenças cardiovasculares, dislipidemias, aterosclerose, dentre outras.

Todos os animais submetidos à suplementação com proteínas integrais e com os hidrolisados do soro de queijo apresentaram aumento na massa muscular.

O perfil sérico dos ratos apresentou alterações significativas, principalmente em relação à glicemia após suplementação da dieta, sendo que os animais do grupo MTH apresentaram uma grande redução nesse parâmetro e também excelente resultado em relação ao HDL, cálcio sérico e massa muscular. Embora de forma menos expressiva, os animais que receberam o suplemento ATH apresentaram resultados satisfatórios para fósforo sérico e proteínas totais. Desta forma o suplemento MTH apresentou melhores resultados em relação à biodisponibilidade e quando utilizado na suplementação da dieta dos ratos, sendo que seu excelente desempenho em relação à glicemia, HDL,

cálcio sérico e massa muscular está relacionado a uma maior concentração de peptídeos, que podem apresentar importantes propriedades bioativas.

Perspectivas

Este estudo mostra aspectos positivos da suplementação nutricional com hidrolisados do soro do queijo, refletidos nos parâmetros bioquímicos, massa e proteínas musculares dos grupos de estudo. Para uma melhor avaliação da absorção destes hidrolisados foram realizados também testes *in vitro* utilizando-se células Caco-2 com resultados promissores em relação à absorção de peptídeos e aminoácidos. Estas informações indicam que os hidrolisados do soro do queijo podem ser utilizados como suplemento para alimentação humana melhorando a qualidade de vida das pessoas, entretanto, a concretização destas propostas envolve um aprofundamento em estudos de toxicidade e absorção destes hidrolisados em humanos.

6. REFERÊNCIAS

1. ABREU, L.R. Processamento do leite e tecnologia de produtos lácteos. Lavras: **UFLA**, 2005. P. 91-157.
2. AIMUTIS, W.L. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. **J. Nutr.**, v.134, n.4, p.989s-95s, 2004.
3. AMAGANIJAN D, BATLOUNI M. Impacto dos fatores de risco tradicionais. **Rev. Sc. Cardeal** Estado de São Paulo, v.10, p.686-693, 2000.
4. ANTUNES, A.J. Proteínas do leite. In: ALOÍSIO JOSÉ ANTUNES. **Funcionalidade de proteínas do soro de queijo**. Barueri: Manole, 2003. cap1, p 17-36.
5. ARGYRI, K.; TAKO, E.; MILLER, D.D.; GLAHN, R.P.; KOMAITIS, M.; KAPSOKEFALOU, M. Milk peptides increase iron dialyzability in water but do not affect DMT-1 expression in Caco-2 cells. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p.1538-1543, 2009.
6. ASSMANN, G. A.M.; GOTTO, JÚNIOR. 2004. "HDL Cholesterol and Protective Factors in Atherosclerosis". **Circulation.**, v. 109, supl 3 -8,14.
7. BARÓ, L.; JIMÉNEZ, J.; MARTÍNEZ- FÉREZ, A.; BOUZA, J.J. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. **Ars Pharmaceutica.**, v. 42, n.3-4, p.135-145, 2001.
8. BERMEJO, P.; PEÑA, E.M.; DOMÍNGUEZ, R.; BERMEJO, A.; COCHO, J.A; FRAGA, J.M. Iron and zinc hydrolised fractions of human milk and infant formulas using an *in vitro* method. **Food Chem.**, v.77, p.361-369, 2002.
9. BIASUTTI, E.A.R. et al. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de queijo com elevado teor de oligopeptídeos. **Brazilian J Pharm Sci**, v. 44, n. 1, p. 51-60, 2008.
10. BOIRIE et al. **Int J Obes Relat Metab Disord** 25(5):601-5, 2001.
11. BONNEFOY, M. Sarcopenia, muscular function and prevention. **Nutr. Clin. Métabol.**, v. 8, n. 4., p.175- 180, 2003.
12. BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P.A. Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T cell immune responses in mice. **J Nutr.**, v.115, p.1403-1408, 1985.
13. 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.
14. BRINK, W. The life extention protein: that fights disease and extends lifespan. Chicago: **Life Extension Foundation**, 1996. p.21-28.
15. CALDEIRA, L. A.; FERRÃO, S. P. B.; FERNANDES, S. A. A.; MAGNAVIT, A. P. A.; SANTOS, T. D. R. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2193-2198, 2010.
16. CARVALHO-FILHO, Edvaldo Vasconcelos de et al . Effect of the daily consumption of ostrich and bovine meat on the lipid metabolism in rats. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 31, n. 1, Mar. 2011 .
17. CHIPLONKAR, S. A. et al. *in vitro* Dialyzability Using Meal Approach as na Index for Zinc and Iron Absorption in Humans. **Biological Trace Element Research**, v. 67, n.1, p. 249-255, 1999.
18. CONAMA – **RC Nº 357/2005**: classificação de corpos de água e diretrizes para seu enquadramento / condições e padrões de lançamento de efluentes.
19. CONLEE, K. M.; STEPHENS, M. L.; ROWAN, A. N. ; KING, L. A. 'Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats', in **Lab Animal**, v. 39, p. 137, 2005.
20. COSTA, E. L. et al. Effect of intraperitoneally administered hydrolysed whey protein on blood pressure and renal sodium handling in awake spontaneously hypertensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** ,v. 38, p.1817- 24, 2005.
21. CUSTÓDIO, M.F. **Hidrólise enzimática das proteínas do soro de queijo: caracterização cinética e condições ótimas de pH e temperatura**. 2001. 77f.

- Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.
22. DANGIN et al The Journal of Physiology, 549, 635-644, 2002 **J Nutr** 132(10):3228-3233S, 2002.
 23. DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Revista Acta Sci Health Sci.** 28(2):165-170 (2006).
 24. De WIT, J.N. Nutritional and functional characteristics if whey proteins in foods products. **J Dairy Sci.**, v.81, n.3, p.597-608, 1998.
 25. DOULTANI, S.; TURHAN, N.; ETZEL, M. Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1737-1743, 2004.
 26. EBERLEIN, G.A. Quantitation of proteins using HPLC-detector response rather than standard curve comparison. **J. Pharmaceutical Biomed. Analysis**, v.13, p.1263-1271, 1995.
 27. ELGAR, D.F.; NORRIS, C.S.; AYERS, J.S.; PRITCHARD, M.; OTTER, D.E.; PALMANO, K.P. Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. **J. Chromatography A.**, v.878 (2), p.183-196, 2000.
 28. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.** Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 26 fev 2010.
 29. **FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS.** Disponível em: http://www.insumos.com.br/funcionais_e_nutraceuticos/materias/81.pdf. Acesso em: 26 fev 2012.
 30. FURTADO, M.M.; POMBO, A.F.W. Fabricação de queijo prato e minas: estudo do rendimento. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, v.34, p.3-19, 1979.
 31. GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y. Functional and biological properties obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 78-87, 2003.
 32. GIKNIS, M., e C. CLIFFORD. "Parâmetros clínicos laboratoriais para Crl: Wi (Han) ratos". **Charles River Laboratories** (2008).
 33. GONZÁLEZ-MARINEZ, C.; BECERRA, M.; CHÁFER, M.; ALBORS, A.; CAROT, J. M.; CHIRALT, A. Influence of substituting milk powder for whey powder on yogurt quality. **Trends Food Science and Technology**, v. 13, n. 9-10, p. 334-340, 2002.
 34. GRIMBLE, R.F; GRIMBLE, G.K. Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. **Nutrition**, v.14, n.7-8, p.605-610, 1998.
 35. GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; PÁEZ- DUEÑAS, M.P.; GONZÁLEZ- TELLO, P.; CAMACHO, F. Processos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. **Ars Pharmaceutica.**, v. 41, n. 1, p. 79- 89, 2000.
 36. GUIMARÃES, M.A.; MAZÁRO, R. Princípios éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação. São Paulo: **UNIFESP** (2004).
 37. GUPTA, S.; LAKSHMI, A.; PRAKASH, B.; **J. Sci. Food Agric.** 2006, 86, 2147.
 38. HA, E ; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. **J. Nut. Biochem**, v. 14, p 251-258, 2003.
 39. HARAGUCHI, Fabiano Kenji et al . Influência das proteínas do soro sobre enzimas hepáticas, perfil lipídico e formação óssea de ratos hipercolesterolêmicos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 22, n. 4, Aug. 2009 .
 40. HARAGUSHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro de queijo: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev. Nutr.** ,v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.
 41. HARPER, WJ. Biological Properties of Whey Components. A Review. Chicago, IL: **The American Dairy Products Institute**, 2000.

42. 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.
43. HARVEY, L. Mineral bioavailability. **The Journal of Nutrition**, v. 31, n. 4, p. 179-182, 2001.
44. HENRIQUES GS, SCORSIN NT, CASSIM ALO, SIMEONE MLF. Avaliação da Influência Dietética de uma Ração Enriquecida em Mix de Fibras sobre a Glicemia e o Perfil Metabólico de Lipídios em Ratos Wistar. **Rev. Med. Res.** 2008;10 (2):58-66.
45. HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; AMIGO, L. β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. **Amino Acids**, v. 35, n. 2, p. 257-265, 2008
46. HURLEY, W.L. Immunoglobulins in mammary secretions In: FOX, P.F MC SWEENEY, PLH. **Advanced dairy chemistry: proteins** New York: Kluwer Academic, 2003.
47. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3.ed. São Paulo, 1985. 533p.
48. INTAWONGSE, M.; DEAN, J. R. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. **Analytical Chemistry**, v.25, n. 9, p 876-886, 2006.
49. KAHYAOGU, T.; KAYA, S.; **J. Sci. Food Agric.** 2006, 86, 1452.
50. KANANEN, A.; SAVOLAINEN, J.; MÄKINEN, J.; PERTTILÄ, U.; MYLLYKOSKI, L.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. **Int. Dairy J.**, v.10, p.691-697, 2000.
51. KINSELLA, J.E, WHITEHEAD, D.M. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. **Adv Foods Nutr Res.**, v. 33, p.343-438, 1989.
52. KNRHONEN, H. Marnila, P and Gill, H. (2000). Bovine milk antibodies for health: a review. Br: **J. Nutr**: 84 (Suppl.1), 135-146.
53. KOSIKOWSKI, F.U. Whey utilization and whey products. **Journal of Dairy Science.**, v.62, p.1149-1160, 1979.
54. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n. 6, p.680-685, 1970.
55. LEA, C.N.; HANNAN, R.S. Studies of the reaction between proteins and reducing sugars in the "dry" state: I. The effect of activity of water, of pH and of temperature on the primary reaction between casein and glucose. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.3, p.313-325, 1949.
56. LEA, C.N.; HANNAN, R.S. Studies of the reaction between proteins and reducing sugars in the 'dry' state II. Further observations on the formation of the casein-glucose complex. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.4, p.518-531, 1950.
57. LIZIEIRE, R.S.; CAMPOS, O.F. Soro de queijo "in natura" na alimentação do gado de leite. **Embrapa gado de leite**, 2000. p.46. Disponível em: < <http://www.cnpqgl.embrapa.br/pastprod/textos/folha46.html>.> Acesso em: 25 set. 2011.
58. LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **Am J Clin Nutr.**, v.77, n.6, p.1537-1543, 2003.
59. LUTEN, J.; CREWS, H.; FLYNN, A.; VAN DAEL, P.; KASTENMAYER, P.; HURRELL, R.; DEELSTRA, H.; SHEN, L.H.; FAIRWEATHER-TAIT, S.; HICKSON, K.; FARRÉ, R.; SCHLEMMER, U.; FROHLICH, W. Interlaboratory trial on the determination of the *in vitro* iron dialysability from food. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.72, n.4, p.415-424, 1996.
60. MA, G.; JIN, Y.; PLAIO, J.; KOK, F.; GUUSJE, B.; JACOBSEN, E.; **J. Agric. Food Chem.** 2005, 53, 10285.
61. MADUREIRA, A.R; PEREIRA, C.I, GOMES, A.M.P; PINTADO, M.E; MALCATA, F.X. Bovine whey proteins: overview on the main biological properties. **Food Res. Inter.**, v.40, p.1197-211, 2007.
62. MANDALARI, G.; ADEL-PATIENT, K.; BARKHOLT, V.; BARO, C.; BENNETT, L.; BUBLIN, M.; GAIER, S.; GRASER, G.; LADICS, G.S.; MIERZEJEWSKA, D.;

- VASSILOPOULOU, M.; VISSERS, Y.M.; ZUIDMEER, L.; RIGBY, N.M.; SALT, L.J.; DEFERNEZ, M.; MULHOLLAND, F.; MACKIE, A.R.; WICKHAM, M.S.J.; MILLS, E.N.C. *In vitro* digestibility of b-casein and b-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. **Regulat. Toxicol. Pharmacol.**, v.55, p.372-381, 2009.
63. MARQUES, D.P. Produção e aplicação de hidrolisado de proteínas do soro de queijo bovino no preparado de suplemento nutricional: minimização da sarcopenia em ratos idosos. 2009. 125 f. **Tese** (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2009.
 64. MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review.**, v.9, n.2, p.136-156, 2004.
 65. MARWAHA, S.S.; KENNEDY, J.F. Review: whey-pollution problem and potential utilization. **Int. J. Food Sci. Technol.**, n.23, p.323-336, 1988.
 66. 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.
 67. Método de lowry – referências HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a Miller, D. D.; Schricker, B. R.; Rasmussen, R. R.; Van Campen D.; **Am. J.Clin. Nutr.** 1981, 34, 2248.
 68. MILLER, D.D.; SCHRICKER, B.R.; RASMUSSEN, R.R.; VAN CAMPEN, D. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.34, n.2, p. 2248-2256, 1981.
 69. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, n.3, p. 426-428, 1959.
 70. MONTI, J.C.; JOST, R. Solubilization of cheese whey protein by trypsin and a process to recover the active enzyme from digest. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p.1173-1185, 1978.
 71. MOTA, M.V.T.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; OLIVEIRA, M.B.P.; ROCHA, C.; TEIXEIRA, J.A.; TORRES, D.; GONÇALVES, M.P. Enzymatic Hydrolyses of Whey Protein Concentrates: Peptide HPLC Profiles. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.**, v.27, n.16, p.2625-2639, 2004.
 72. NARASINGA-RAO, B. S.; **J. Food Sci. Technol.** 1994, 31, 353.
 73. NAKANO, T.; SILVA-HERNANDEZ, E.R.; IKAWA, N.; OZIMEK, L. Purification of k-casein glycomacropeptide from sweet whey with undetectable level of phenylalanine. **Biotechnology Prog.**, v.18, n.2, p.409-412, 2002.
 74. NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. Título do artigo. **Electrophoresis.**, v. 9, p. 255-256, 1988.
 75. OLIVEIRA, M. A. A.; OSÓRIO, M. M.; **J. Pediatr.** 2005, 81, 361.
 76. OZAKI M, Fuchinoue S, TERAODA S, OTA K. The *in vivo* cytoprotection of ascorbic acid against ischemia/reoxygenation injury of rat liver. **Arch Biochem Biophys.** 1995; 318(2):439-45.
 77. PACHECO, MARIA T. B.; DIAS, NÀDIA F.G.; BALDINI, VERA L. S. et al. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.**, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005.
 78. PATTARIN, R. et al. Characterization of flavor of whey protein hydrolysates. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.30, n.20, p. 58, 2010.
 79. PERALES, S.; BARBERA, R.; LAGARDA, M. J.; FARRE, R.; **J. Agric. Food Chem.** 2006, 54, 4901.
 80. PEREA, A.; UGALDE, U. Continuous hydrolysis of whey protein in a membrane recycle reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, n.18, p.29-34, 1996.
 81. PIHLANTO-LEPPALA, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trens Food Sci Technol.**, v11, p.347-356, 2001.
 82. PORTEOUS, I. R. **Geometric differentiation.** Cambridge: University Press, 1994.
 83. POTIER, M.; TOMÉ, D. Comparison of digestibility and quality of intact proteins with their respective hydrolysates. **J. AOAC INT.**, v.91, p.1002-1006, 2008.

84. PUSHPANJALI, R. P; KHOKHAR, S. *In vitro* availability of iron and zinc from some Indian vegetarian diets: correlations with dietary fibre and phytate. **Food Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 111-114, 1996.
85. ROMARIS-HORTAS, V.; GARCÍA-SARTAL, C.; BARCIELA-ALONSO, M.C.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P. Bioavailability study using an in-vitro method of iodine and bromine in edible seaweed. **Food Chem.**, v.124, p.1747-1752, 2011.
86. RANG, H.P.; M.M. DALE, J.M. RITTER; MOORE, P.K. **Pharmacology**. 5th ed. India: Elsevier, 2005.
87. RIBEIRO, H.S. Obtenção e aplicação de concentrados proteicos de soro de queijo bovino em produtos cárneos. 2000. 130 f. (**Tese de Doutorado em Ciência da Nutrição**) Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Campinas, 2000.
88. RICHARDS, N.S.P.S. Soro lácteo - Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Rev. Food Ingredientes**, v.17, n. 3, p.20-27, 2002.
89. SAINT-SAUVEURA, D.; GAUTUIERA, BOUTINB, S.F.Y.; MONTONIA, A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. **Intern. D. J.**, v. 18, p. 260-270, 2008.
90. SALZANO JÚNIOR, I. Nutritional supplements: practical applications in sports, human performance and life extension. São Paulo: **FAO and WHO**, 1996-2002. p.75-202. (Symposium series 007)
91. SAMPAIO, I. B. M. Delineamento estatístico em pesquisa com seres humanos e animais. In: **Simpósio COEP/CETEA**, Minas Gerais, 2005.
92. 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.
93. SERPA, L.; PRIAMO, W. L.; REGINATTO, V. Destino ambientalmente correto a rejeitos de queijaria e análise de viabilidade econômica. **2º International Workshop, Advances in Cleaner Production, 2009**
94. SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Rev. Nutr.**, v. 17, p. 397-409, 2004.
95. SHAH, N.P. Effects of milk- derived bioactives: an overview. **Braz. J. Nutr.**, v. 84, p. S3-S10, 2000.
96. SHANNON, L.K, CHATTERTON, D; NIELSEN, K; LÖNNERDAL, B. Glycomacropeptide and alfa-lactoalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. **Am J Clin Nutr.** ,v.77,n. 5, p.1261-1268, 2003.
97. SINHA, R.; RADHA, C. PRAKASH, J. KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chem.**, v. 101, p. 1501 -1508, 2007.
98. SIQUEIRA, IVANA M. C.; SOUZA, MARCELO R.; CERQUEIRA, M.M.O.P. et al. Importância e utilização dos derivados de soro de queijo. **Rev. Higiene Alimentar**, v. 16, n. 97, p. 31-35, 2002.
99. TOBA, Y.; TANAKA, Y.; TANAKA, M.; AOE, S.; **Nutr. Res.** 1999, 19, 449.
100. TORRE, M.; RODRIGUEZ, A. R.; SAURA-CALIXTO, F.; Crit. **Rev. Food Sci. Nutr.** 1991, 30, 1.
101. TORRE, M.; Rodriguez, A. R.; SAURA-CALIXTO, F.; **Food Chem.** 1995, 54, 23.
102. TORRES, P. D.M. Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas de soro de queijo bovino. 2005. f. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos) - Universidade do Minho, Portugal, 2005.
103. WALZENR, R.L., DILLARD, C.J. and GERMAN. J,B. (2002). Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Crit. Reviews Food Sci. Nutr.** 42. 353-375.
104. ZAIA, A.M.Z.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v.21, p.787-783, 1998.