



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICA DE ARARAQUARA**



**CAROLINA BIZELLI SILVEIRA**

***DIGESTIBILIDADE DAS PROTEÍNAS DO SORO DO  
LEITE MEDIANTE ENSAIO IN VITRO***

ARARAQUARA  
2010



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA**



**CAROLINA BIZELLI SILVEIRA**

*DIGESTIBILIDADE DAS PROTEÍNAS DO SORO DO  
LEITE MEDIANTE ENSAIO IN VITRO*

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO DA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE  
ARARAQUARA, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL  
PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” PARA A  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ALIMENTOS E  
NUTRIÇÃO.

*Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti*

ARARAQUARA  
2010

### **Ficha Catalográfica**

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

S537d Silveira, Carolina Bizelli  
Digestibilidade das proteínas do soro do leite mediante ensaio *in vitro* /  
Carolina Bizelli Silveira. – Araraquara, 2010  
99 f.

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

Orientador: Rubens Monti

1. Soro do leite. 2. Proteínas. 3. Dialisabilidade. 4. Digestão  
gastrointestinal *in vitro*. I. Monti, Rubens, orient. II. Título.

**CAPES: 50700006**

## *Dedicatória*

À **Deus**, por ter me garantido serenidade, paciência e perseverança, guiando-me por caminhos desafiadores, porém seguros, abrindo-me as portas em todos os momentos em que precisava de luz, e colocando ao meu lado pessoas que sempre ajudaram a me levantar nos momentos onde a queda fez parte do aprendizado em minha jornada.

Aos meus pais **Sidnei e Izilda**, por terem me gerado, pela criação baseada no exemplo, pelos elogios moderados, ensinando-me a ser humilde e pelas broncas dadas na hora certa, ensinando-me a ser responsável. Pelo incentivo, pela dedicação e pelo amor com que me transformaram em uma pessoa que conhece o valor das palavras respeito e humildade. Meu amor, gratidão e admiração por vocês são inacabáveis.

À minha irmã **Cássia**, por entender sem cobranças que a minha distância teve um motivo nobre, e por saber que nossa ligação e amizade têm laços inquebráveis.

Ao **Bê**, por ter desde o primeiro momento me entendido e apoiado, me incentivando sempre, mesmo que para isso soubesse que eu trocava sua companhia por trabalho e estudos. Não consigo imaginar como teriam sido esses cinco anos e meio sem sua presença, nem como seria minha vida sem o seu amor, que será eternamente correspondido.

## *Agradecimentos Especiais*

Ao **Prof. Dr. Rubens Monti**, pela confiança em mim depositada desde o primeiro momento de trabalho em conjunto, por guiar meu trabalho de maneira generosa e paciente, oferecendo-me novos desafios e ajudando-me a vencê-los. Seus conselhos, profissionais e pessoais, farão sempre parte de minha índole. Minha eterna admiração e gratidão.

À **Dr. Daniela Parreira Marques**, pela amizade e colaboração em todos os momentos deste trabalho. Espero ter sido capaz de representar de maneira justa os esforços por você depositados na realização desta pesquisa, impossível sem a sua participação. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Reinaldo Marchetto** e ao **Dr. Saulo S. Garrido**, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Campus Araraquara, pelo apoio oferecido neste trabalho, desde o seu início. Essa dissertação só foi possível devido à confiança de vocês.

Aos amigos de laboratório **Andrea, Caio, Julio, Juliana, Ozeni, Vinícius, Ana Claudia** e **Eliana**, pelo companheirismo pessoal e profissional e pela presença agradável em diversos momentos, principalmente no início deste trabalho, fossem eles de concentração ou de descontração. A amizade de vocês é imprescindível.

À **Ana Lúcia** e **Antônio**, pela paciência e cooperação imensurável durante diversos os momentos, a ajuda de vocês foi essencial.

Aos funcionários da **Farmácia do HEAB**, pelo companheirismo e amizade. Pessoas como vocês são raras. Obrigada pela força!

## *Agradecimentos*

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

À coordenadora do Curso de Pós-Graduação - Área de Ciências dos Alimentos, *Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Célia de Sylos*, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação, pela formação e exemplo.

Aos demais funcionários e colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição.

Aos amigos do curso de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Ana Estela, Rosa, Josiane, Priscila, Roberta, Laura, Vitor, pelos inesquecíveis momentos de convivência.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela paciência e admirável interesse em nos ajudar.

Aos funcionários da biblioteca pela colaboração em todos estes anos.

À CAPES e à FAPESP, pelo apoio financeiro concedido, indispensável para a realização deste trabalho.

À todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para a execução deste trabalho.

“É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ...”

***Martin Luther King***

# SUMÁRIO

<b>1 RESUMO.....</b>	<b>15</b>
----------------------	-----------

<b>2 ABSTRACT.....</b>	<b>17</b>
------------------------	-----------

## CAPÍTULO 01

<b>3 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
--------------------------	-----------

<b>4 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
-------------------------------------	-----------

4.1 COMPOSIÇÃO DO SORO DO LEITE.....	26
--------------------------------------	----

4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE.....	31
--	----

4.3 BIODISPONIBILIDADE DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS.....	32
--	----

4.4 MÉTODO ENZIMÁTICO “ <i>IN VITRO</i> ” PARA DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA DIALISADA.....	34
--	----

<b>5 OBJETIVO.....</b>	<b>37</b>
------------------------	-----------

5.1 OBJETIVO GERAL.....	38
-------------------------	----

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
--------------------------------	----

<b>6 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
----------------------------------	-----------

6.1 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	40
-------------------------------	----

### 6.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

6.2.1 Dosagem de proteína do soro.....	41
--	----

6.2.2 Dosagem de açúcar redutor do soro.....	42
--	----

6.2.3 Dosagem de gordura do soro.....	43
---------------------------------------	----

6.3	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	44
6.4	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS.....	45
6.4.1	Método de McDonald & Chen.....	45
6.4.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida – Condição desnaturalante.....	47
6.4.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	49
6.5	MÉTODO “ <i>IN VITRO</i> ” PARA A DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE.....	50
6.5.1	Digestão gástrica.....	50
6.5.2	Determinação da acidez.....	52
6.5.3	Tratamento das membranas de diálise.....	54
6.5.4	Digestão intestinal.....	54
<b>7</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
7.1	DOSAGEM DE AÇÚCAR REDUTOR E PROTEÍNA DO SORO DO LEITE.....	59
7.1.1	Dosagem de açúcar redutor.....	59
7.1.2	Dosagem de proteína.....	61
7.2	QUANTIFICAÇÃO DO PRODUTO DE REAÇÃO LIBERADO PELAS PROTEINASES.....	63
7.3	ANÁLISE EM HPLC E SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE APÓS OS DIFERENTES TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS.....	65
7.4	MÉTODO “ <i>IN VITRO</i> ” PARA A DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE.....	70
7.4.1	Dosagem de proteína.....	70
7.4.2	Dosagem de açúcar redutor.....	71
7.4.3	Caracterização do perfil peptídico após a digestão gastrointestinal in vitro.....	72
7.5	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZANDO	73

ELETROFORESE SDS-PAGE.....	
7.6 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	76
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

## **CAPÍTULO 02**

<b>1 ARTIGOS.....</b>	<b>100</b>
-----------------------	------------

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fluxograma do protocolo utilizado para a obtenção dos digeridos gástricos.....	52
<b>Figura 2</b> – Fluxograma do protocolo utilizado para a determinação da acidez das amostras.....	53
<b>Figura 3</b> – Fluxograma do protocolo utilizado na simulação da digestão intestinal das amostras.....	56
<b>Figura 4</b> – Curva de calibração de lactose para determinação de açúcar redutor no soro do leite.....	59
<b>Figura 5</b> – Curva de calibração de SBA para determinação de proteínas no soro de leite.....	62
<b>Figura 6</b> – HPLC do produto de hidrólise do soro de leite (condição PH) no tempo de 40 minutos em A e 120 minutos em B.....	67
<b>Figura 7</b> – Eletroforese do padrão e do produto de hidrólise do soro de leite (condição PH) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação.....	68
<b>Figura 8</b> – HPLC do produto de hidrólise do soro de leite (condição TH) no tempo de 40 minutos em A e 120 minutos em B.....	68

<b>Figura 9</b> – Eletroforese do padrão e do produto de hidrólise do soro de queijo (condição TH) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação.....	69
<b>Figura 10</b> – Eletroforese das amostras retiradas durante a digestão gastrointestinal (padrão, soro sem hidrólise, após a digestão gástrica, após a digestão intestinal externa a membrana, amostra absorvida – interna a membrana).....	74
<b>Figura 11</b> – HPLC da amostra inicial, antes da digestão. (A), na região superior direita, representa a área sob a curva.....	77
<b>Figura 12</b> – HPLC da amostra após a digestão gástrica. (A), na região superior direita, representa a área sob a curva.....	78
<b>Figura 13</b> – HPLC da amostra após a digestão intestinal (amostra externa a membrana). (A), na região superior direita, representa a área sob a curva.....	79
<b>Figura 14</b> – HPLC da amostra após a digestão intestinal (amostra interna a membrana - absorvida). (A), na região superior direita, representa a área sob a curva.....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> –	Determinação da quantidade (média de dosagens) de açúcar redutor (lactose) no soro do leite.....	60
<b>Tabela 2</b> –	Determinação de proteína no soro de leite nas três etapas de processamento.....	62
<b>Tabela 3</b> –	Quantificação do produto de hidrólise liberado pela reação com diferentes combinações enzimáticas utilizando soro de leite como substrato.....	64
<b>Tabela 4</b> –	Dosagem de proteínas em diferentes estágios da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	71
<b>Tabela 5</b> –	Produtos da reação da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> ..	72
<b>Tabela 6</b> –	Produtos da reação da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	81

## LISTA DE ABREVIações

DBO	Demanda biológica de oxigênio
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
PB	Proteína bruta
$\beta$ - Lg	$\beta$ - Lactoglobulina
$\alpha$ - La	$\alpha$ - Lactoalbumina
BSA	Soro albumina bovina
Ig	Imunoglobulina
Lf	Lactoferrina
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
DNS	Ácido 3-5'-dinitrosalicílico
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
TCA	Tricloroacético
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
ACN	Acetonitrila
TFA	Trifluoracético
PH	Parcialmente hidrolisado
TH	Totalmente hidrolisado

Bizelli Silveira C. Digestibilidade das proteínas do soro do leite mediante ensaio *in vitro* [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP; 2010.

## **Resumo**

Recentemente, os constituintes do leite têm sido reconhecidos como substâncias funcionais, sugerindo que seu uso tenha efeitos diretos e mensuráveis na saúde. Dentre esses constituintes, merece especial importância o soro do leite, um co-produto obtido durante a fabricação de queijos, sendo de grande importância na indústria de laticínios, pelo seu volume de produção e composição nutricional.

O presente trabalho tem o objetivo de verificar, *in vitro*, a digestibilidade das proteínas do soro do leite, padronizando as características de bioacessibilidade, permitindo que esta fração possa ser utilizada em formulações de maneira funcional. Para isso, o soro lácteo foi preparado a partir de leite B e enzima renina, dialisado e filtrado, após adição de caulim. A amostra obtida foi caracterizada através de dosagens protéicas, de açúcar redutor e de gordura. O método de digestão *in vitro* foi realizado em duas etapas: digestão gástrica (realizada com a utilização da enzima pepsina em pH 2,0) e intestinal (aonde foi utilizada uma mistura enzimática de pancreatina-extrato biliar em pH 7,5, seguida de diálise para separação dos peptídeos e aminoácidos absorvíveis). Com o

intuito de se comprovar a digestão gastrointestinal *in vitro* e padronizar o ensaio para a amostra estudada, foram utilizadas metodologias de dosagem de peptídeos e aminoácidos, eletroforese SDS-PAGE e HPLC em fase reversa. Os resultados das três metodologias demonstraram um pequeno aumento no grau de hidrólise das proteínas após a digestão gástrica e a formação de uma amostra altamente hidrolisada após a digestão intestinal, sendo que a maior parte destes produtos se apresentou no interior da membrana de diálise, indicando a sua absorção. Com base nos resultados obtidos e nos limites da metodologia empregada, conclui-se que o método que promove a digestão gastrointestinal *in vitro* realmente estima a digestibilidade das proteínas do soro do leite, abrindo portas para futuros testes.

Palavras-chave: Soro do leite, proteínas, dialisabilidade, digestão gastrointestinal *in vitro*.

Bizelli Silveira C. Assessing the digestibility of milk whey proteins using an in vitro model [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP; 2010.

## **Abstract**

Recently, the constituents of milk have been recognized as functional substances, suggesting that its use has direct and measurable effects on health. Among these constituents, special importance is given to the milk whey, a byproduct obtained during the cheese-making process, and which shows great importance in the dairy industry, regarding its production volume and nutrient composition. This study aims to determine the in vitro digestibility of milk whey proteins, standardizing the characteristics of its bioaccessibility, allowing this fraction to be used in formulations at a functional way. For this, the whey was prepared from milk B and enzyme renin, dialyzed and filtered after the addition of kaolin.

The sample obtained was characterized by measurements of protein, reducing sugar and fat. The method of *in vitro* digestion was performed in two steps: gastric digestion (performed using the enzyme pepsin at pH 2,0) and intestinal (where we used an enzyme mixture of pancreatin-bile extract at pH 7.5, followed by dialysis for separation of peptides and absorbable amino acids). Aiming to confirm the in vitro gastrointestinal digestion and standardize the assay for the study samples, it were used methodologies for measuring the peptides and amino acids, SDS-PAGE

and reverse phase HPLC. The results of the three used methods showed a small increase in the degree of hydrolysis of proteins after gastric digestion and the formation of a highly hydrolyzed sample after intestinal digestion, and most of these products are presented within the dialysis membrane, indicating its absorption. Based on the results and limitations of the employed methodology, it is concluded that the method which promotes gastrointestinal *in vitro* digestion actually estimated the digestibility of whey proteins, opening doors for future tests.

**Keywords:** Milk whey, proteins, digestibility, *in vitro*, digestion.

### **3 INTRODUÇÃO**



Nos últimos anos, muitas pesquisas têm considerado os constituintes do leite como substâncias funcionais, sugerindo que seu uso tenha efeitos diretos e mensuráveis na saúde (AKHAVAN et al., 2010; ALEXANDER & CABANA, 2010; BOUKHETTALA et al., 2010; CASTRO et al., 2010; KOLETZKO, 2010; MORIFUJI et al., 2010; NERY-DIEZ et al., 2010; PAL et al., 2010; PAL & ELLIS, 2010; PHILLIPS et al., 2009; RUSU et al., 2009). Dentre esses constituintes, merece especial importância o soro do leite, um subproduto obtido durante a fabricação de queijos, de grande importância na indústria de laticínios, pelo seu elevado volume de produção e composição nutricional (GILL et al., 2000; KRISSENSSEN, 2007).

O leite contém duas fontes primárias de proteínas, a caseína e as proteínas do soro. Após o processamento, a caseína é a proteína responsável pela produção do queijo, enquanto que o soro é o resíduo aquoso. Os componentes do soro incluem  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, soro albumina bovina, lactoferrina, imunoglobulinas, enzima lactoperoxidase, glicomacropéptídeos, lactose e minerais (MURAKAMI et al., 1998; WALZEM et al., 2002; YAMADA et al., 2002).

Por volta de 55% dos nutrientes existentes no leite, ou seja, uma quantidade econômica e biologicamente expressiva ficam retidos no soro durante a fabricação de queijos (DE WIT, 1998; HA & ZEMEL, 2003; KRISSENSSEN, 2007; STANTON et al., 2002).

A descoberta das propriedades funcionais do soro do leite, assim como sua aplicação nutricional, fez com que essa fração fosse “promovida” a um co-produto da fabricação de queijos, e não mais um subproduto (KRISSENSEN, 2007; WALZEM, et al., 2002). A partir daí, tais proteínas, antes uma sobra industrial, têm sido admitidas como um grupo de proteínas de alto valor, e são até mesmo produzidas com a utilização de alta tecnologia capaz de se obter produtos com altíssima pureza, capazes de promover resultados promissores como alimentos funcionais e até mesmo na indústria farmacêutica (BRANS, et al., 2004; CHATTERTON, et al., 2006; DE WIT, 1998; HA & ZEMEL, 2003; ZYDNEY, 1998).

Historicamente, o soro do leite era considerado uma panacéia, sendo usado na cura desde complicações gastrointestinais até problemas nas articulações. Em alguns locais do mundo, como na Groelândia, a população fermentava o soro e o estocava em barris. Dessa forma, o soro diluído em água era ingerido ou usado para preservar carnes e outros alimentos. O soro fermentado era a bebida mais comum da população da Groelândia em substituição à cerveja, devido à falta de grãos na região (ROGNVALDARDOTTIR, 2001).

Hoje o soro do leite é tido popularmente como um suplemento protéico, que apresenta atividade antimicrobiana, capacidade de atuar sobre a modulação imune, melhorar a força muscular e a composição corporal, e prevenir doenças cardiovasculares e osteoporose, além de

interferir na modulação de outros sistemas biológicos importantes em nosso organismo (AKHAVAN et al., 2010; ALEXANDER & CABANA, 2010; BOUKHETTALA et al., 2010; CASTRO et al., 2010; KOLETZKO, 2010; MARSHALL, 2004; MORIFUJI et al., 2010; NERY-DIEZ et al., 2010; PAL et al., 2010; PAL & ELLIS, 2010; PHILLIPS et al., 2009; RUSU et al., 2009).

Avanços no processo tecnológico, que incluem a ultra-filtração, a micro-filtração, a osmose reversa e a troca iônica, têm resultado no desenvolvimento de variações nas composições finais do soro do leite, dando origem a produtos como concentrados do soro com variação entre 80 e 95% de proteínas, com reduzido teor de lactose, com isolados protéicos do soro, que podem ser ainda desmineralizados e hidrolisados, e que estão disponíveis comercialmente (CHEISON, et al., 2007). Cada produto do soro do leite varia na sua composição final, na quantidade de proteínas, carboidratos, imunoglobulinas, lactose, minerais e gordura. Estas variações são importantes fatores na seleção da fração protéica para aplicação nutricional específica (KRISSENSSEN, 2007; LIZIEIRE & CAMPOS, 2000).

Outro ponto importante no estudo do soro do leite é a necessidade de se criar alternativas para a utilização desse resíduo. A fabricação de queijos produz cerca de 145 milhões de litros de soro/ano e no Brasil, os queijos tiveram um consumo recorde nestes últimos anos (RICHARDS, 2002). A minimização de impactos ambientais tornou-se preocupação de

toda indústria de transformação em nível mundial, tornando o desenvolvimento de processos limpos de fundamental importância para assegurar a competitividade no mercado global e atender às leis de proteção ambiental (GRIJSPEERDT et al., 2003; RICHARDS, 2002).

O soro é um potente agente de poluição que pode provocar a destruição da flora e da fauna devido a sua alta demanda biológica de oxigênio (DBO) que é cerca de 30.000 a 50.000 mg de oxigênio por litro de soro. Este valor é aproximadamente 100 vezes maior do que o de um esgoto doméstico. Além dos problemas ambientais causados, o soro do leite ainda pode comprometer a estrutura físico-química do solo, diminuir os rendimentos das colheitas e reduzir a flora e fauna (GRIJSPEERDT et al., 2003; RICHARDS, 2002).

Uma das alternativas para resolver esse problema é a transformação dos resíduos protéicos em produtos comercializáveis. Com o auxílio de processos técnicos modernos de separação, o soro do leite vem sendo transformado em produtos de amplas utilidades (CHEISON, et al., 2007; RICHARDS, 2002).

Os componentes do soro do leite podem ser utilizados na formulação de bebidas lácteas, leites fermentados, misturas para sucos, ricota, bebidas nutricionais e fortificadas, chocolates, sorvetes, suplementos esportivos, alimentações enterais, dentre outros produtos (BARÓ, 2001; RICHARDS, 2002). Esse grande interesse na utilização dessas substâncias é refletido por testes sobre sua ação em diversas

doenças com interesse para a área da Saúde Pública, tais como câncer, hepatite, obesidade, osteoporose, hipertensão e até mesmo a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (KRISSENSEN, 2007; MARSHALL, 2004).

Falta ainda saber, de uma maneira cientificamente aceitável e imparcial, se o soro do leite, bem como seus componentes, pode ser inteiramente aproveitado em nosso organismo. Ou seja, a literatura ainda se mostra carente de informações sobre a dialisabilidade e biodisponibilidade das proteínas do soro do leite, informações essas que mostrariam se tais proteínas, após ingeridas ou quando ministradas em formulações, tornam-se biodisponíveis em quantidades significativas em nosso organismo, estando aptas a cumprir as funções biológicas específicas para as quais tem sido designadas.

## **4 REVISÃO DA LITERATURA**

---

---

Com finalidade didática e organizacional, este capítulo de revisão de literatura será apresentado na forma de tópicos: Composição do soro do leite, hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite, biodisponibilidade de aminoácidos e, finalmente, método enzimático “*in vitro*” para determinação da proteína dializada.

#### **4.1 Composição do soro do leite**

A composição do soro do leite varia em função do queijo produzido, mas, em média, é constituído basicamente de 93% de água e somente 7% de matéria seca (parte sólida), sendo que, deste total, 71% é lactose, 10% proteína bruta (PB), 12% gordura e 11% sais minerais (LIZIEIRE & CAMPOS, 2000). É certo também que o soro do leite é uma mistura variada de proteínas, que contém uma larga classe de propriedades químicas, físicas e funcionais (KRISSENSEN, 2007).

As proteínas do soro do leite são globulares e compactas (variam de 14 a 100 kDa) e são universalmente definidas como aquelas proteínas que permanecem no soro após a coagulação das caseínas em pH 4,6 a 20°C (IMAFIDON et al., 1997; MOR et al., 1993). As principais proteínas existentes no soro são  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, soro albumina bovina e imunoglobulinas. Além das proteínas citadas acima, o soro contém ainda proteínas menores e peptídeos como fragmentos  $\beta$ de - caseína (proteose-peptona), resíduos de caseína coagulada, fragmentos

de  $\kappa$ -caseína, peptídeos desconhecidos e micelas da caseína do leite. As duas proteínas de maior concentração e que representam o componente de maior valor agregado por quilo de soro são as lactoalbuminas e lactoglobulinas (KRISSENS, 2007; PEREA & UGALDE, 1996).

A  **$\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg)**, quantitativamente, é a principal proteína do soro, representando cerca de 50% do conteúdo protéico total do soro do leite bovino. No soro do leite humano essa proteína não é encontrada, sendo responsável pela alergenicidade atribuída às proteínas do leite. A  $\beta$ -Lg, no pH normal do leite (pH=6,68), é um dímero formada pela associação de duas subunidades globulares idênticas de massa molecular 18kDa. Cada unidade possui estrutura primária constituída de 162 resíduos de aminoácidos em que estão presentes duas ligações dissulfeto intra-moleculares que unem o resíduo de cisteína 66 ao 160 e o resíduo 106 ao 121, e um grupo sulfidrílo reativo. A estrutura secundária da  $\beta$ -Lg é formada por 15% de  $\alpha$ -hélice, 50% de folhas  $\beta$  e de 15% a 20% de dobras  $\beta$ . A  $\beta$ -Lg nativa é muito resistente à proteólise pela pepsina em pH 2,0 e o aquecimento entre 50 e 70°C não aumenta a porcentagem de hidrólise, mas o aquecimento da proteína a 90°C antes da hidrólise facilita a ação da pepsina.  $\beta$ -Lg nativa e aquecida em pH 8,0 à temperatura entre 50 e 70°C são hidrolisadas com eficácia pela quimotripsina (LOURENÇO, 2000).

Ensaio biológicos realizados com animais de várias espécies mostram que a  $\beta$ -Lg é resistente à digestão gástrica e, pode ser

considerado o principal alergeno do leite bovino e das fórmulas lácteas infantis. Além disso, essa proteína pode atuar sobre a resposta linfática em nosso organismo, devido a sua interação com outras proteínas, por exemplo, com a proteína ligante do retinol (GUIMONT et al., 1997).

A  **$\alpha$ -lactoalbumina** ( $\alpha$ -La) é a segunda principal proteína do soro do leite, seja ele bovino ou humano. Esse grupo protéico corresponde a aproximadamente 25% de todas as proteínas do soro do leite, e contém uma grande variedade de aminoácidos essenciais e de cadeia ramificada, sendo rica em lisina, leucina, treonina, triptofano e cistina. A família  $\alpha$ -La consiste em um componente quantitativo principal de massa molecular 12,3 kDa (a menor proteína do soro) e possivelmente outros componentes em pequenas quantidades. A proteína é formada por 123 resíduos de aminoácidos é rica em resíduos lisil, treonil, triptofanil e cisteinil, tem ponto isoelétrico em pH 5,1 e quatro ligações dissulfeto intra-moleculares que unem os resíduos 6 e 120, 28 e 111, 61 e 77 e 73 e 91, os quais estabilizam sua conformação nativa (KRISSENSSEN, 2007; LOURENÇO, 2000). Os estudos de estrutura secundária dessa proteína sugerem uma molécula de conformação dobrada compacta com 26% de  $\alpha$ -hélice, 14% de conformação  $\beta$  e 60% em espiral ao acaso. Sua desnaturação ocorre em faixa ampla de temperatura (70 a 96°C). Quando purificada, é muito utilizada em fórmulas infantis, sendo a proteína que estruturalmente é a mais parecida ao leite materno. Entretanto, sua utilização muitas vezes é barrada devido ao seu custo elevado, sendo em alguns casos substituída

por proteínas menos semelhantes as do leite materno. Em estudos com ratos, sua utilização na forma nativa e hidrolisada aumentou consideravelmente a resposta de anticorpos frente à estimulação antigênica, podendo atuar diretamente sobre a função dos linfócitos B, bem como na supressão das respostas dos linfócitos T (BOUNOUS & KONGSHAVN, 1982; BOUNOUS et al., 1985).

A **soro albumina bovina** (BSA) tem conformação nativa globular solúvel em água, formada por uma cadeia polipeptídica constituída de aproximadamente 580 resíduos de aminoácidos de massa molecular 66,2 kDa, com *pI* em pH 4,7 a 4,8. Sua estrutura secundária contém cerca de 54% de  $\alpha$ -hélice e 40% de conformação  $\beta$  (folhas  $-\beta$  e dobras- $\beta$ ) (LOURENÇO, 2000). Essa proteína tem um grupo sulfidrílico no segmento amino-terminal e 17 ligações dissulfeto intra-moleculares que são inacessíveis à redução por agentes químicos porque, estão confinadas no interior da conformação nativa. Suas ligações dissulfeto são reduzidas apenas em meio contendo agentes desnaturantes (uréia ou hidrocloreto de guanidina). É resistente à desnaturação térmica a 60°C por tempos prolongados. A albumina do soro bovino corresponde a cerca de 15% da proteína total do soro, sendo fonte importante de aminoácidos essenciais, embora seu potencial terapêutico tenha sido muito pouco estudado (MARSHALL, 2004).

Já as **imunoglobulinas** são glicoproteínas monômeros ou polímeros de uma molécula de quatro subunidades das quais duas são

leves de massas moleculares de 20 kDa e duas são pesadas, de massas moleculares 50 a 70 kDa que se associam por meio de ligações dissulfeto e interações não covalentes. Essas proteínas são anticorpos e são divididas em cinco grupos designados IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Em cada molécula de um grupo ou subgrupo a estrutura primária das duas subunidades pesadas são idênticas e apresentam uma região constante de 310 a 500 resíduos de aminoácidos e uma região variável de 107 a 115 resíduos.

As imunoglobulinas do soro representam 0,7% a 2% da proteína total do leite, conferindo imunidade passiva contra experiências patogênicas vividas pela mãe. Apresentam baixa concentração no leite bovino, apresentando quantidades maiores no colostro. A IgG é o grupo principal e compreende 80% do conteúdo total dessas proteínas, sendo transferida da mãe para a criança via cordão umbilical e através do leite materno, entregando a criança a primeira via da defesa imunológica (KRISSENSEN, 2007; LOURENÇO, 2000; MARSHALL, 2004). A IgA é secretada no leite materno e assim, transfere para o trato digestório, uma melhor imunização comparada com a mamadeira infantil (BONANG et al., 2000). O colostro contém quantidades significativas de imunoglobulinas em comparação com o leite maduro, sendo sua concentração máxima entre 24-48 horas após o parto (KELLY, 2003).

Compreendendo pequena porção (0,2-0,8%) das proteínas do leite, a **lactoferrina** (Lf) apresenta grande concentração no soro do leite e foi

isolada dos peptídeos derivados da caseína (fragmentos de beta-caseína). Trata-se de proteína ligadora de ferro, com massa molecular da ordem de 76 kDa. Polimeriza-se rapidamente com cálcio e apresenta atividade antimicrobiana pelo seqüestro de ferro do meio. A Lf seqüestra e solubiliza ferro, controlando a sua quantidade disponível no metabolismo intestinal. Isolada há cerca de 30 anos, as funções biológicas da Lf são ainda emergentes. Em geral, as propriedades biológicas da Lf incluem atividades antibacterianas e antivirais, prevenção do crescimento de organismos patogênicos no intestino, estímulo do sistema imune, regulação do metabolismo de ferro e controle dos danos causados em células e tecidos (ANTUNES, 2003).

#### **4.2 Hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite**

A literatura aponta a hidrólise das proteínas do soro do leite como um possível processo para o reaproveitamento do resíduo (GALVÃO, 2001). As aplicações de hidrolisados de proteínas como fonte de aminoácidos livres e de pequenos peptídeos são inúmeras. Além de servir para a produção de co-produto do soro, a hidrólise das proteínas pode ser efetuada por uma variedade de razões entre elas, para melhorar as características nutricionais, retardar a deterioração, dar textura, aumentar ou diminuir solubilidade, adicionar propriedades espumantes ou de

coagulação, melhorar a capacidade de emulsificação (STANTON et al., 2002).

O processo de hidrólise é um procedimento limpo que ocorre em uma série de estágios, e que não é feita em paralelo com reações de degradação de outros componentes do meio, permitindo o controle da funcionalidade do produto final através da especificidade das enzimas utilizadas (MONTI & JOST, 1978). As proteínas obtidas podem ser usadas em suplementos nutricionais, e também como matéria-prima para a indústria farmacêutica (AKHAVAN et al., 2010; ALEXANDER & CABANA, 2010; BOUKHETTALA et al., 2010; CASTRO et al., 2010; KOLETZKO, 2010; MORIFUJI et al., 2010; NERY-DIEZ et al., 2010; PAL et al., 2010; PAL & ELLIS, 2010; PHILLIPS et al., 2009; RUSU et al., 2009). A proteína soro albumina bovina (BSA) é um exemplo comum, devido a sua utilização crescente tanto na biotecnologia como em laboratórios clínicos (LI et al., 2009, LEWIS et al., 2006).

Dado a importância do ponto de vista econômico do processo de hidrólise e separação deste resíduo para as indústrias produtoras e devido à observação das diferentes aplicações dos co-produtos do soro, esforços para o desenvolvimento de estudos nessa área são necessários para o aprimoramento, simplificação, e diminuição dos custos do processo (MONTI et al., 2005).

#### **4.3 Biodisponibilidade de proteínas e hidrolisados**

Os componentes obtidos a partir da hidrólise das proteínas são denominados aminoácidos e peptídeos. Dentre os 21 aminoácidos conhecidos, alguns são classificados como essenciais e outros como não essenciais, ou podem ser classificados ainda como condicionalmente essenciais. Os aminoácidos essenciais são assim denominados porque sua síntese no organismo é insuficiente para satisfazer as necessidades metabólicas, dessa forma, devem ser fornecidos como parte da alimentação. Esses aminoácidos são: treonina, triptofano, lisina, leucina, isoleucina, metionina, valina, fenilalanina. Já os aminoácidos não essenciais (alanina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico), são aqueles que podem ser sintetizados em nível celular a partir de aminoácidos essenciais ou de precursores contendo carbono e nitrogênio. De maneira geral, os aminoácidos condicionalmente essenciais (glicina, prolina, arginina, tirosina, serina, cisteína, cistina, taurina, histidina, glutamina) são aqueles que podem ser essenciais em determinadas condições clínicas (LOURENÇO, 2000).

A biodisponibilidade de aminoácidos pode ser definida como a proporção ou extensão de utilização, pelo sistema biológico, de aminoácidos essenciais presentes nos alimentos, considerando fatores intrínsecos (sexo, idade, estado nutricional) e extrínsecos (interações entre nutrientes da dieta). Existem alguns fatores que influenciam direta ou indiretamente a biodisponibilidade de aminoácidos, sendo eles

fisiológicos, patológicos, químicos e modificações físico-químicas que ocorrem no processamento e armazenamento de produtos (LOURENÇO, 2000).

Nem todas as substâncias ingeridas apresentam a mesma facilidade de absorção e digestão. Referente a isto, os poros hidrofílicos da mucosa intestinal restringem a absorção de moléculas e íons com massa molecular superior a 250 Da, em função da estereoquímica destes compostos. Dessa maneira, a mucosa intestinal é uma barreira quase impermeável a moléculas maiores que a glicose (CRESPO, 2002).

A determinação da biodisponibilidade de proteínas compreende diversos métodos, como os químicos, que avaliam a extensão das modificações químicas das cadeias lateral dos aminoácidos essenciais e seus impactos na qualidade nutricional das proteínas, como também os biológicos, que se aplicam à avaliação da biodisponibilidade de todos os aminoácidos essenciais, e são feitos por meio de ensaios em animais de laboratório (ratos e camundongos), em microrganismos e no homem (LOURENÇO, 2000). Existem ainda os métodos enzimáticos, que são a combinação de procedimentos de hidrólise enzimática das proteínas *in vitro* seguida pela determinação biológica (microbiológica) ou em auto-analisador de sua biodisponibilidade (LOURENÇO, 2000).

#### **4.4 Método enzimático “*in vitro*” para determinação da proteína dialisada**

A qualidade das proteínas depende da sua habilidade em fornecer aminoácidos na proporção exigida através da ação de enzimas. Isto depende da sua composição, mas também podem ser modulados pela sua biodisponibilidade, que está relacionada com inúmeros fatores como a digestibilidade, qualidade dos aminoácidos, alguns efeitos metabólicos específicos, assim como outros constituintes do alimento. Além disso, este valor nutritivo também varia de acordo com o estado fisiológico do indivíduo (POTIER & TOMÉ, 2008).

Sabe-se que quantidades adequadas de proteínas intactas não podem ser fornecidas a pacientes com o sistema digestório prejudicado que apresentam reduzida capacidade de absorção. Além disso, em pacientes alérgicos, a presença da proteína íntegra pode induzir uma reação imunomediada. A hidrólise enzimática parece ser o método mais adequado para a preparação de peptídeos feitos sob medida por causa de sua grande disponibilidade comercial e custo moderado (POTIER & TOMÉ, 2008).

Para avaliar o aproveitamento destes hidrolisados, e assim determinar a sua biodisponibilidade, pode-se utilizar alguns métodos que são classificados em dois grandes grupos: os métodos *in vivo* e *in vitro*. Os métodos ideais são aqueles realizados em seres humanos. Estes ensaios demonstram resultados mais confiáveis, mas que demandam mais tempo e trabalho para sua realização, além de serem mais custosos

e muitas vezes requererem um instrumental mais sofisticado, como aqueles que avaliam a absorção se utilizando de radioisótopos. Uma desvantagem considerável, porém, dos ensaios *in vivo* baseados em modelos animais, é que os mesmos podem levantar questionamentos quanto à possibilidade de seus resultados (em relação à absorção desses elementos) serem considerados como um preditivo confiável para o modelo humano (CRESPO, 2002).

Como uma etapa prévia dos estudos de biodisponibilidade, os métodos *in vitro* de avaliação da biodisponibilidade 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 e 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 (BOUNOUS & KONGSHAVN, 1982; LUTEN et al., 1996; MILLER et al., 1981).

## **5 OBJETIVO**

---

---

## 5.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem o objetivo de verificar, *in vitro*, a digestibilidade das proteínas do soro do leite.

## 5.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter as proteínas do soro do leite, seus hidrolisados parciais e totais;
- ✓ Estudar e padronizar métodos de dialisabilidade das amostras obtidas;
- ✓ Padronizar a metodologia de Digestão Gastrointestinal *in vitro* da amostra sem hidrólise, calculando a eficiência do método.
- ✓ Possibilitar a utilização das amostras obtidas em formulações, garantindo a funcionalidade destas proteínas no produto final.

## **6 MATERIAL E MÉTODOS**

---

---

O material de estudo no presente projeto foi o soro do leite de bovino. Este material foi preparado no laboratório a partir de leite Dileto tipo B (pausterizado) do Laticínio São Carlos.

### **6.1 Preparo das amostras**

O soro láctico foi preparado a partir de leite B e enzima renina (coalho comercial), na proporção de 50 mL de leite para 0,3 mL de coalho. Para a precipitação total das caseínas, foi adicionado 0,5% de  $\text{CaCl}_2$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ . A temperatura do banho-maria foi ajustada em 35°C e assim permaneceu até o final da precipitação. Após a coagulação, a massa foi cortada e dessorada através de processo de filtração simples com gaze. O soro obtido foi mecanicamente processado durante 72 horas sob agitação constante, contra água destilada. Após a diálise, foi adicionado ao soro, caulim, na proporção de 0,6 g de caulim para cada 30 mL de soro, e então foi realizada a filtração em funil de Büchner provido de papel filtro (CUSTÓDIO, 2001). O soro dialisado e filtrado foi caracterizado com os ensaios de dosagem de carboidratos, de proteínas e gordura, para que então fosse armazenado em frascos identificados, e congelados até o momento dos ensaios enzimáticos. A preparação do soro do leite em laboratório possibilitou a padronização da amostra testada, garantindo a uniformização da quantidade protéica obtida.

## 6.2 Métodos analíticos

### 6.2.1 Dosagem de proteína do soro

O método de Lowry modificado por Hartree (1972) foi utilizado na dosagem das proteínas do soro do leite. Este método baseia-se na complexação de íons  $\text{Cu}^{2+}$  com a proteína em meio alcalino, e na redução do ácido fosfomolibdico-tungstato. É um método bastante sensível, com sensibilidade entre 20 e  $200\mu\text{g}/\text{cm}^3$  e utiliza como reagentes as seguintes soluções:

#### Solução A:

- Carbonato de sódio 2% (p/v) em hidróxido de sódio 0,1N

#### Solução B:

- Tartarato de sódio e potássio 1% (p/v) em água destilada

#### Solução C:

- Sulfato de cobre 1% (p/v) em água destilada

No momento do uso, as soluções foram misturadas na proporção de 50mL de solução A; 0,5mL de B e 0,5mL de C.

Para a dosagem das proteínas, foram realizadas diluições do soro em água destilada, para um volume final de 0,5mL. A estas diluições

foram adicionados 2,5mL da mistura das soluções A, B e C citadas acima. As misturas resultantes foram fortemente agitadas e mantidas em repouso por quinze minutos, sendo adicionadas então, de 0,25mL de Folin-Ciocalteu 1N e sofrendo nova agitação. Após trinta minutos, foram realizadas leituras em  $\lambda=660\text{nm}$ . Para a determinação quantitativa foi utilizada curva de calibração com soro albumina bovina (Sigma) como padrão.

#### *6.2.2 Dosagem de açúcar redutor do soro*

A determinação de açúcar redutor (lactose) no soro do leite foi realizada utilizando-se o método do ácido 3-5'-dinitrosalicílico – “DNS” (MILLER, 1959). A efetuação das dosagens partiu de diluições do soro em água destilada para um volume final de 0,25mL, seguida da adição de 0,25mL do reagente DNS. Essa mistura foi aquecida em banho fervente por cinco minutos. Após resfriamento (aproximadamente 3 minutos) à temperatura ambiente, foram adicionadas mais 2,5mL de água destilada à mistura, que foi agitada vigorosamente para homogeneização da cor. A leitura foi feita em  $\lambda=540\text{nm}$ . A curva de calibração foi realizada com lactose (Riedel) como padrão.

O reagente DNS foi preparado da seguinte maneira:

#### Solução A:

- 10g de DNS em 200mL de água destilada. Misturar e agitar sob aquecimento a 37°C por 20 minutos.

Solução B:

- 300g de tartarato de sódio-potássio em 300mL de hidróxido de sódio 2mol/L.

Foi feita a mistura da solução A e a mesma foi agitada sob aquecimento a 37°C durante 20 minutos. A solução A foi então adicionada a B suavemente, para evitar a precipitação do ácido, e estocada em frasco âmbar. A solução mostra-se estável por um prazo máximo de 6 meses.

### 6.2.3 *Dosagem de gordura do soro*

A dosagem da gordura do soro do leite tem o intuito de verificar se a diálise e a filtração em caulim foram eficientes na retirada de gordura do soro.

O soro do leite dialisado e filtrado em caulim, teve o intuito de verificar a retirada de gordura. Para a dosagem desta gordura, foi utilizado como reagente 10mL de ácido sulfúrico que foi transferido para um lactobutirômetro de Gerber. Foi adicionado lentamente 11mL de soro do leite juntamente com 1mL de álcool amílico. A abertura do lactobutirômetro foi fechada para que a mistura fosse agitada até sua

completa dissolução. Em seguida a solução foi centrifugada a 4000rpm por 3 a 5 minutos. A solução foi levada a um banho-maria a 70°C por 3 a 5 minutos. Para a observação do resultado, o manejo da rolha de fechamento foi realizado e foi observado se ocorreu o aparecimento de uma fase oleosa.

### **6.3 Hidrólise enzimática**

Após a caracterização do soro, a hidrólise enzimática foi realizada para a confecção das amostras. O modelo utilizado para a hidrólise enzimática do soro do leite estava de acordo com testes já descritos por Marques (2005). A hidrólise das proteínas do soro foi realizada de forma a otimizar a força proteolítica das enzimas.

Em estudos prévios do Laboratório de Enzimologia, foram determinadas duas condições de hidrólise. Foi verificado que para a obtenção de hidrólise total das proteínas do soro do leite, o soro foi tamponado com ácido ascórbico 20% (p/v) para pH final 3,0, ao contrário de 1% como descrito em trabalhos anteriores. A temperatura de hidrólise foi de 50°C e assim que esta temperatura foi alcançada, a enzima pepsina foi adicionada na proporção de 0,0666µL de enzima diluída (0,5mg/mL) para cada 1mL de soro, estabelecendo o tempo zero de reação. Após 20 minutos de reação o pH foi ajustado para 9,5 com hidróxido de amônio 0,1N e em seguida foram adicionados as demais enzimas na mesma

proporção que a pepsina em tempos seqüenciais de 10 minutos: tripsina (0,5mg/mL) adicionada aos 20 minutos de reação, quimotripsina (0,5mg/mL) aos 30 minutos de reação e carboxipeptidase (0,025µL/mL) aos 40 minutos de reação, seguindo-se a hidrólise até o seu término em 120 minutos de reação. Após 120 minutos o hidrolisado obtido foi caracterizado através de SDS-PAGE.

Para obtenção do hidrolisado parcial, o soro foi tamponado para pH 3,0. A temperatura de hidrólise também foi de 50°C e assim que esta temperatura foi alcançada, a enzima pepsina foi adicionada, estabelecendo o tempo zero de reação. Após 20 minutos a suspensão (soro + pepsina) foi aquecida por 2 minutos a 100°C para inativação enzimática e então resfriado até atingir 35°C e tamponado para pH 9,5. A seguir, a temperatura foi novamente elevada à 50°C e logo foram adicionadas as enzimas tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase de forma conjunta e seguiu-se a hidrólise até completar 120 minutos de reação.

## **6.4 Caracterização dos hidrolisados**

### *6.4.1 Método de McDonald & Chen*

A caracterização dos hidrolisados, já desenvolvida em estudos prévios no Laboratório de Enzimologia, teve o intuito de estimar o produto de reação liberado pelas proteinases, com a utilização do método de

McDonald & Chen (1965). Este método permite estimar baixos níveis de peptídeos e aminoácidos formados na reação. As alíquotas retiradas em diversos intervalos de tempo de reação foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% da solução final (v/v). Após serem mantidas por 12 horas sob refrigeração a 4°C, as misturas foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com cuidado dos tubos e transferido para tubos Eppendorfs identificados.

À 100µL da solução assim obtida, diluída com 400µL de água, foi adicionado 2,5mL de uma mistura recém preparada, conforme descrição abaixo:

Solução A:

- 2% (p/v) de carbonato de sódio em hidróxido de sódio 0,1N

Solução B:

- 10% (p/v) de hidróxido de sódio em água destilada

Solução C:

- 1% (p/v) de sulfato de cobre em água destilada

Solução D:

- 2,7% (p/v) de tartarato de sódio e potássio em água destilada

A mistura foi preparada no momento do uso na proporção de 20mL de solução A; 2,0mL de solução B; 0,2mL de solução C e 0,2mL de solução D.

As soluções obtidas, após a adição da mistura, foram mantidas em repouso por 10 minutos para adição de 0,25mL do reagente Folin-Ciocalteu 1N para o desenvolvimento da cor. Segundo McDonald, a mistura do produto de hidrólise (aminoácidos e peptídeos) adicionada dos reagentes de Lowry, deve ter um pH próximo a 10.0 para favorecer o desenvolvimento da cor. As leituras de absorvância foram realizadas em  $\lambda=700\text{nm}$ . A curva de calibração foi realizada utilizando-se tirosina da Riedel-de-Haën como padrão, onde se obteve o valor de coeficiente de extinção molar  $1,022 (\mu\text{mol}/0,25\text{mL})^{-1}$ .

#### *6.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida – Condição desnaturante*

As amostras para as eletroforeses foram preparadas adicionando-se à 150 $\mu\text{L}$  de tampão de ruptura 500 $\mu\text{L}$  das alíquotas de diversos intervalos de tempo.

A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970), utilizando-se acrilamida a 12% (p/v) conforme solução descrita abaixo. O tempo de corrida foi de aproximadamente 3 horas em 20 mA. O volume aplicado de cada uma das amostras obtidas pelos ensaios foi de 25 $\mu\text{L}$  de alíquotas de cada

tempo e 10 $\mu$ L de padrão. A polimerização da acrilamida se iniciou com a adição de temed, e é acelerada pela adição de persulfato de amônio. O composto utilizado para efetuar a dissociação é o detergente iônico SDS. A amostra é desnaturada por aquecimento a cerca de 100°C, durante 3 minutos, na presença de excesso de SDS e de reagente sulfidrílico ( - mercaptoetanol).

## SDS-PAGE

### Tampão de separação

Tris.....1,5M

SDS.....0,4%

pH.....8,8

O Tris foi diluído em água, e teve o pH ajustado, seguido pela adição de SDS.

### Solução de acrilamida

Acrilamida.....30g (30%)

Bisacrilamida.....0,8g

Água destilada.....100mL

### Solução de persulfato de amônio

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ .....10%

Essa solução foi preparada no momento do uso.

Tampão de concentração

Tris.....0,5M

SDS.....0,4%

pH.....6,8

O Tris foi diluído em água, e teve o pH ajustado, seguido pela adição de SDS.

Solução Bisacrilamida

Bisacrilamida.....2%

A coloração do gel foi feita com Brilliant Blue G-Coloidal através do método de Neuhoff, 1988. Utilizou-se como padrão um kit de massa molecular da Amershan Biosciences GE, constituído de fosforilase b (97kDa); soro albumina bovina (66kDa); ovoalbuminabovina (45kDa); anidrase carbônica (30kDa); inibidor de tripsina (20,4kDa) e - lactoalbumina (14,4kDa).

6.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Em todas as condições foram retiradas amostras aos 40 e 120 minutos de reação para análise em HPLC. Estas amostras foram fervidas por 3 minutos e congeladas para posterior aplicação em HPLC. Alíquotas de 20 $\mu$ L foram injetadas.

A análise em HPLC utilizou uma coluna de fase reversa Nucleosil C18 (25 x 0.46 cm; 5  $\mu$ m; 300 Å) com gradiente linear de 5 – 95% do solvente B (ACN e 0.036% TFA) em 30 min, com fluxo 1.0 mL/min e detecção UV em comprimento de onda de 220 nm. Os dados gerados pela Workstation para posterior análise.

## **6.5 Método “*in vitro*” para determinação da dialisabilidade das proteínas do soro do leite**

Para a determinação da porcentagem de proteínas, a ser dialisada, foi utilizado o método de Miller (1981) modificado por Luten et al. (1996) que envolve a simulação da digestão gastrintestinal (gástrica e duodenal), seguida da determinação da proteína dialisável (LOURENÇO, 2000; McDONALD & CHEN, 1965).

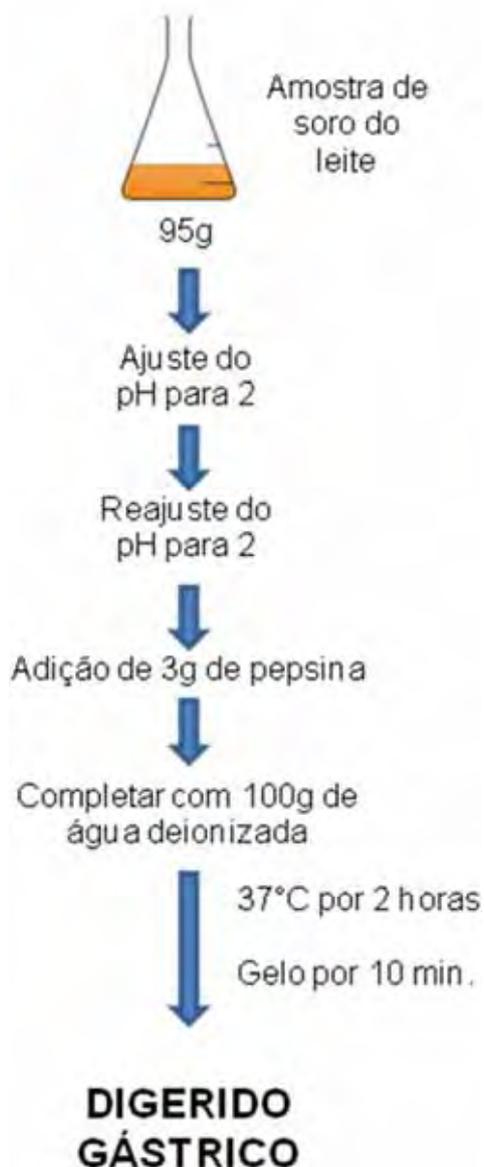
### **6.5.1 Digestão gástrica**

Utilizando um erlenmeyer de 250mL, foi pesado 95g de soro do leite. Para a realização de um branco, foi utilizada a mesma quantidade de água destilada. O pH do soro foi ajustado para 2,0 com HCl 6,0M, com

constatação após 15 minutos. Caso necessário, o pH era novamente ajustado.

Com a estabilização do pH, foi adicionado 3g de uma solução de pepsina (0,48g de pepsina – Sigma – em 3mL de HCl 0,1M) e completado com água até atingir 100g. Os erlenmeyer foram tampados com Parafilm® e incubados à 37°C em banho de água com agitação controlada (140 rev/min) durante 2 horas. Transcorrido este tempo, o digerido gástrico foi mergulhado em gelo por 10 minutos para cessar a atividade enzimática. O processo está demonstrado na forma de esquema gráfico, na Figura 1.

Após a obtenção do digerido gástrico, 20g da amostra foram utilizadas para determinação da acidez, para que posteriormente fosse realizada a digestão intestinal.



**Figura 1** – Fluxograma do protocolo utilizado para a obtenção dos digeridos gástricos.

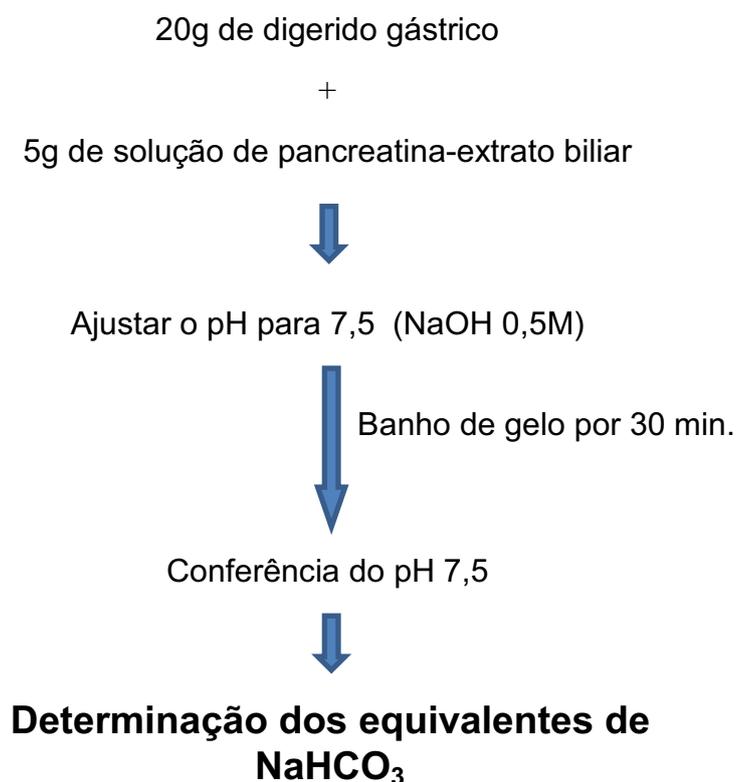
### 6.5.2 Determinação da acidez

Foi determinado o número de equivalentes de NaOH necessários para a obtenção de um pH de 7,5, e em seguida foi adicionado uma

solução de pancreatina - extrato biliar, com o intuito de reproduzir as condições intestinais.

Para isto, foi pesado 20g do digerido gástrico e adicionou-se 5g da solução de pancreatina - extrato biliar (20mg de pancreatina e 125mg de extrato biliar, em 5mL de  $\text{NaHCO}_3$  0,5M) para posterior homogeneização.

O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 0,5M e o volume necessário para esta titulação foi anotado (1,9mL). Transcorridos 30 minutos, a conferência foi realizada e o pH é novamente acertado caso necessário. A representação gráfica do protocolo utilizado pode ser visto na Figura 2.



**Figura 2** – Fluxograma do protocolo utilizado para a determinação da acidez das amostras.

Na digestão intestinal foi utilizada uma membrana de diálise (tamanho do poro variando entre 12000 a 14000 Da), através da qual se reproduz o processo de difusão. Dessa forma há a simulação da parede intestinal. É necessário preparar a membrana de diálise antes de seu uso.

### *6.5.3 Tratamento das membranas de diálise*

As membranas foram cortadas em um comprimento de 25cm para que em seguida fossem lavadas com água destilada. Após as membranas ficarem submersas por 30 minutos, e este processo ser repetido por mais três vezes, as membranas foram submersas em uma solução de sulfito de sódio 0,3% (p/v) a 80°C por 1 minuto. Em continuação, as membranas foram acondicionadas em água destilada 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 quente para depois serem guardadas em frascos contendo 20% (v/v) de etanol (agente desinfetante) em ambiente a 4°C até o momento do uso. Imediatamente antes de usar, as membranas foram lavadas interna e externamente, várias vezes, com água destilada.

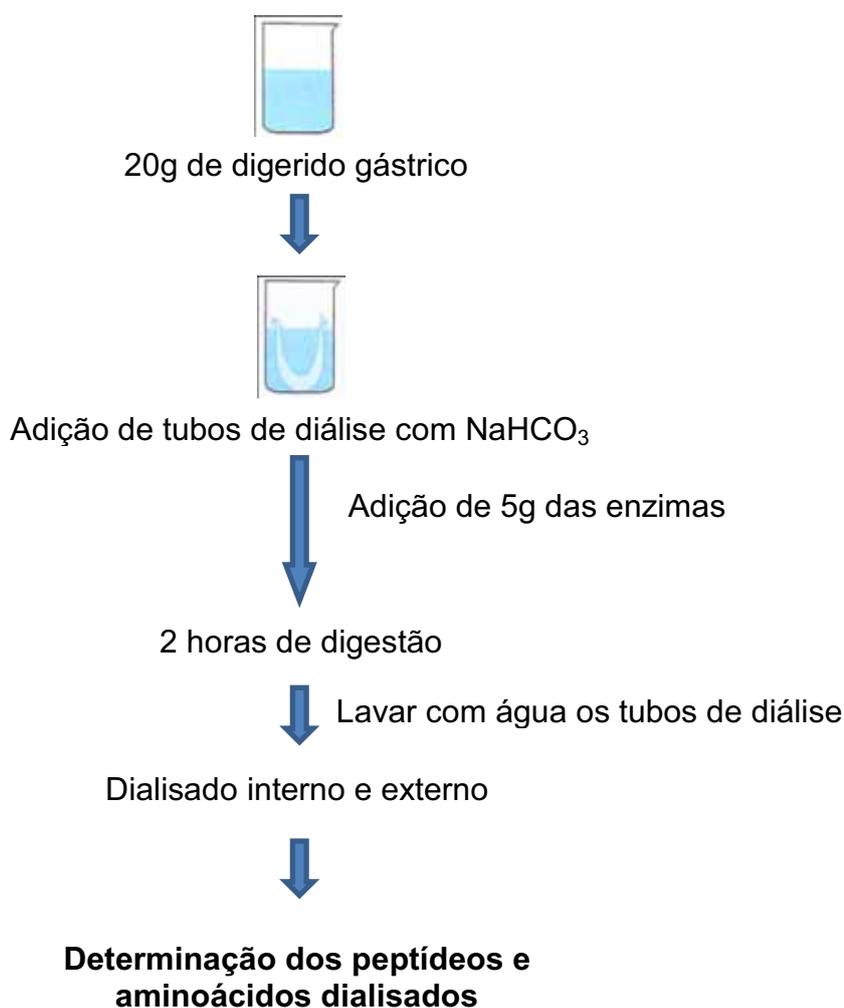
### *6.5.4 Digestão intestinal*

Em cinco béqueres de 250mL, foi pesado 20g do digerido gástrico. Um das amostras foi utilizada como indicativo da acidez titulável, como

descrito no item 6.5.2. Em seguida foi adicionado, em cada béquer, uma membrana de diálise que contem 25g de uma solução de  $\text{NaHCO}_3$ . Esta solução de  $\text{NaHCO}_3$  0,5M apresenta os mesmos equivalentes em moles obtidos na titulação com NaOH. Os béqueres foram tampados com Parafilm® e incubados em banho-maria a 37°C sob agitação de 140 rev/min. por 90 minutos para atingir o equilíbrio de pH e assim iniciar a digestão.

Assim que o pH do digerido gástrico atingiu o valor de 5,0, foi adicionado 5g da solução de pancreatina - extrato biliar às amostras, e as mesmas foram mantidas a 37°C por mais 2 horas. Transcorrido este tempo, os frascos foram retirados do banho e o pH do digerido intestinal foi medido, e os tubos de diálise foram lavados com água para posterior secagem com papel filtro.

Finalmente os tubos de diálise foram pesados e o pH dos dialisados foi medido. As soluções dialisadas foram conservadas a -18°C, em tubos de plástico de 10mL, até o momento em que se procedeu a determinação dos aminoácidos e peptídeos. A esquematização do protocolo utilizado pode ser vista na Figura 3.



**Figura 3** – Fluxograma do protocolo utilizado na simulação da digestão intestinal das amostras.

Após a hidrólise enzimática, os seguintes ensaios foram realizados para caracterização das amostras:

- Dosagem de proteínas pelo método de Lowry;
- Dosagem de açúcar redutor;
- Dosagem de aminoácidos pelo método de McDonald & Chen;
- Eletroforese em SDS-PAGE;

- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Tais ensaios já foram descritos previamente no início da seção de Material e Métodos.

## **7 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

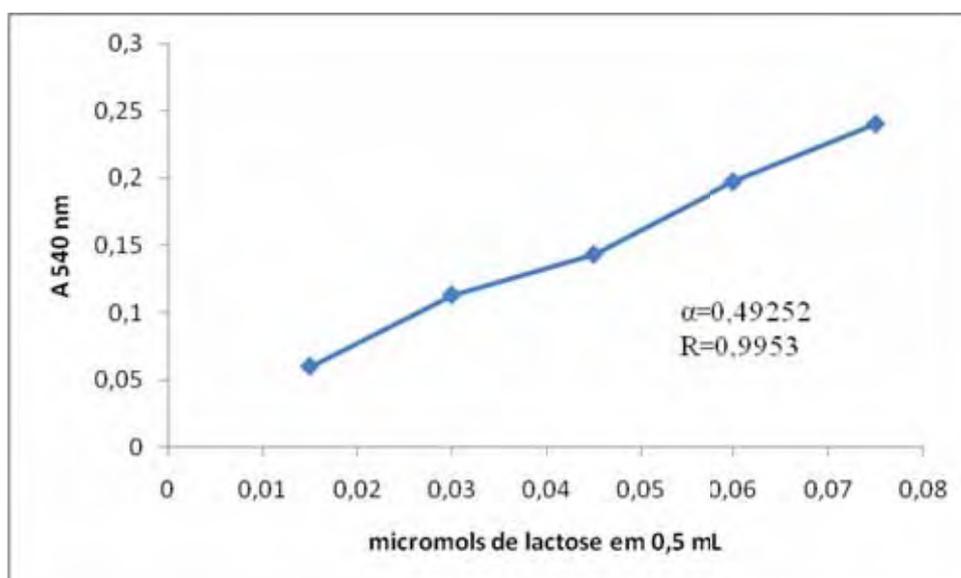
---

---

## 7.1 Dosagem de açúcar redutor e proteína do soro do leite

### 7.1.1 Dosagem de açúcar redutor

Para dosagem de açúcar redutor utilizou-se o método de Miller (1959), como descrito no item 6.2.2. A curva de calibração utilizada, para posterior determinação da concentração de açúcar redutor no soro do leite, foi de lactose como apresentada na Figura 4. Foi determinado um coeficiente de extinção molar para lactose, a partir da curva, igual a  $0,49252 (\mu\text{mols}/0,5 \text{ mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . A Tabela 1 apresenta os valores obtidos nas dosagens.



**Figura 4** - Curva de calibração de lactose utilizando método de Miller.

**Tabela 1** - Determinação da quantidade (média de dosagens) de açúcar redutor (lactose) no soro do leite

<i><b>Amostras de soro</b></i>	<i><b>g/L</b></i>
Soro sem tratamento	25,4
Soro após diálise	2,86
Soro após diálise e filtração	1,28

Nota-se pela Tabela 1 que, após o tratamento de diálise e filtração os valores encontrados de açúcar redutor foram bem inferiores aos valores iniciais (soro sem tratamento e soro após diálise), mostrando que os processos de tratamento realizados auxiliaram na retirada de açúcar redutor. A quantidade residual de açúcar redutor apresentada após a diálise e a filtração pode ser devido à presença de proteínas glicosiladas, apresentando assim, valores pequenos na doseamento de açúcar redutor.

Esse resultado foi extremamente relevante para que fosse dada seqüência a metodologia proposta, já que a quantidade de açúcar redutor em uma amostra é um interferente significativo no método de dosagem de proteínas, conforme já há várias décadas reporta a literatura (LEA & HANNAN, 1949; LEA & HANNAN, 1950).

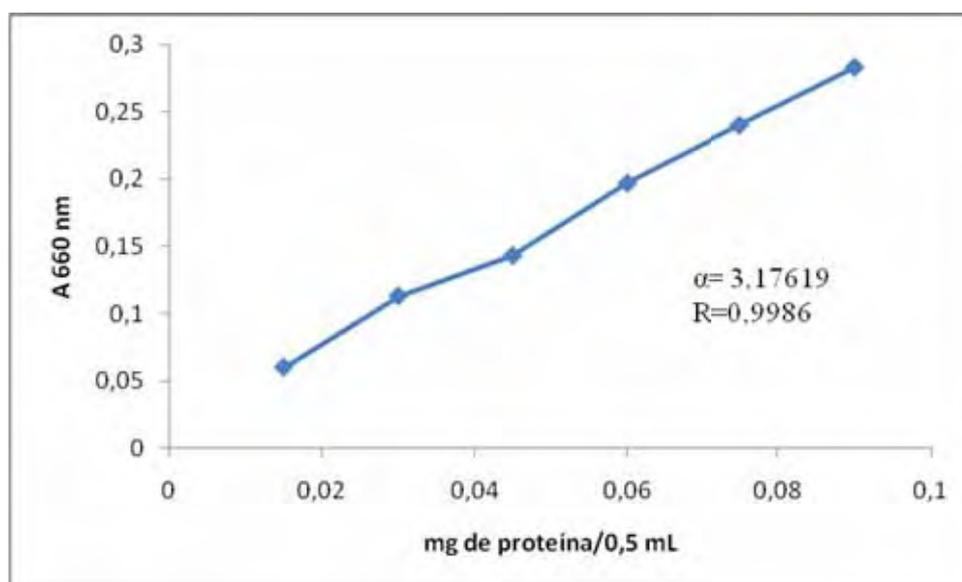
Desde a década de 1930 já se acreditava que reações entre aminoácidos ou proteínas e açúcares redutores poderiam interferir nas características dos produtos lácteos. Os trabalhos clássicos de Lea & Hannan (1949 e 1950) demonstram reações diretas entre a caseína e a

glicose, diretamente relacionadas à quantidade de água, pH e temperatura de tratamento da amostra, o que levaria à diferenças significativas se tal proteína devesse ser determinada em tais amostras. Embora a caseína não seja uma das proteínas do soro do leite, sua estrutura e composição química servem de exemplo para que esse estudo evidencie como a presença elevada de açúcares redutores em nossas amostras poderia interferir em nossos resultados.

#### *7.1.2 Dosagem de proteína*

O método de dosagem de proteínas utilizado neste trabalho, para estimar o conteúdo protéico do soro do leite produzido em laboratório nas várias etapas de processamento (soro puro, soro dialisado, e soro dialisado e filtrado), foi o método Lowry modificado por Hartree (1972) como descrito no item 6.2.1. A Figura 5 mostra a curva de calibração de SBA utilizada para os cálculos da concentração de proteína. Determinou-se de acordo com a curva o valor de  $3,17619 \text{ (mg prot/0,5 mL)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para o coeficiente de extinção.

A Tabela 2 demonstra os resultados obtidos com as dosagens de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento. A partir da Tabela 2 podem-se notar diferenças existentes entre as dosagens de proteínas que ocorreram no soro puro e nos soros dialisado e dialisado e filtrado.



**Figura 5** - Curva de calibração da soro albumina bovina utilizando método de Hartree.

**Tabela 2** - Determinação de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento

<b><i>Amostras de soro</i></b>	<b><i>g/L</i></b>
Soro sem tratamento	6,85
Soro após diálise	5,48
Soro após diálise e filtração	5,44

De acordo com Hartree (1972), a lactose presente no soro do leite interfere na análise pelo método de Lowry. A lactose, sendo um açúcar

reductor, reduz o cobre presente na solução de dosagem de proteína, provocando com isto um aumento na coloração, e conseqüentemente valores superestimados de proteína.

Como visto no item anterior (7.1.1), o açúcar reductor foi diminuído após a realização dos tratamentos de diálise e filtração do soro, colaborando desta forma para a dosagem real da quantidade de proteínas no soro tratado, tentando fazer com que o fator “presença de açúcar reductor” fosse reduzido ao máximo possível. Além disso, o processo de filtração em caulin promoveu a retirada de prováveis micelas de caseína não precipitadas, que também poderiam causar alterações no resultado da dosagem de proteínas.

## ***7.2 Quantificação do produto de reação liberado pelas proteinases***

Na Tabela 3 pode-se observar que, nos dois ensaios realizados inicialmente, a quantidade em unidades totais de aminoácidos aumentou quando comparados com os resultados dos tempos 40 e 120 minutos de reação.

**Tabela 3** - Quantificação do produto de hidrólise liberado pela reação com diferentes combinações enzimáticas utilizando soro do leite como substrato

<b>Ensaio</b>	<b>U totais de AA (40 min.)</b>	<b>U totais de aa (120 min.)</b>
<b>Parcialmente Hidrolisado</b>	0,76	1,63
<b>Totalmente Hidrolisado</b>	2,2	2,55

Obs: Experimento descrito em Material e Métodos, item 6.3.

Condição PH – adição de pepsina (pH3,0). Após 20 min., fervura a 100°C por 2min., alteração para pH 9,5 e adição de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase-A.

Condições TH – adição de pepsina (pH3,0). Após 20 min. alteração para pH 9,5 e adição seqüencial de 10 min. de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase-A.

Isto é demonstrado com um aumento de aproximadamente 114,5% na hidrólise parcial e de 15,9% na hidrólise total. Estes valores permitem concluir que há um aumento na velocidade de hidrólise das proteínas do soro, de forma distinta, com o decorrer do experimento.

Analisando os valores obtidos no tempo de reação de 120 minutos, atentamos para um aumento nas unidades de aminoácidos quando comparamos as duas condições de hidrólise. Essa informação vai de encontro ao que existe na literatura, que relata que as proteínas do soro do leite na forma nativa não são hidrolisadas facilmente, devido

principalmente os pontes de dissulfeto presentes em suas moléculas, resultado esse que é positivamente alterado quando usa-se proteínas já hidrolisadas ou submetidas a alterações estruturais, com o seu tratamento com bissulfito de sódio, por exemplo (KANANEN et al., 2000).

Esta tabela também nos trás a conclusão de que realmente o experimento que permite a hidrólise total dos aminoácidos apresenta melhor eficiência catalítica nos 40 primeiros minutos de reação, devido possivelmente à adição separada das enzimas, o que permitiu uma melhor atividade hidrolítica.

A literatura demonstra que a digestão enzimática de proteínas alimentares, sejam elas de origem vegetal ou animal, quando feita de maneira seqüencial traz resultados diferentes de quando tal digestão é feita de maneira direta, sendo que os próprios peptídeos e aminoácidos liberados durante a digestão dessas proteínas pode interferir no resultado final dessas reações (RAGHUNATH & NARASINGA RAO, 1984).

Posteriormente os valores encontrados e demonstrados na Tabela 3 serão comparados com as análises eletroforéticas e análises em HPLC para conclusão dos resultados de hidrólise.

### **7.3 Análise em HPLC e em SDS-PAGE das proteínas do soro do leite após os diferentes tratamentos enzimáticos**

Pode-se dizer, com base na literatura disponível, mesmo com os métodos mais sofisticados existentes na área do estudo de proteínas, que um procedimento único e definitivo que quantifique e identifique proteínas em misturas complexas, como o soro do leite, ainda não existe, visto que todos os métodos disponíveis apresentam limitações que podem interferir nos resultados obtidos. Apesar disso, existem métodos universalmente aceitos na literatura como capazes de fornecer resultados confiáveis (EBERLEIN, 1995) e que podem ser tido como obrigatórios no estudo de tais substâncias (KRIEG et al., 2005).

Dentre esses métodos, a cromatografia líquida de alta eficiência, ou “HPLC” de acordo com a abreviação em língua inglesa que denomina o método, e a eletroforese em gel de poliacrilamida “SDS-PAGE”, são amplamente usados e aceitos pela literatura (EBERLEIN, 1995; KRIEG et al., 2005)

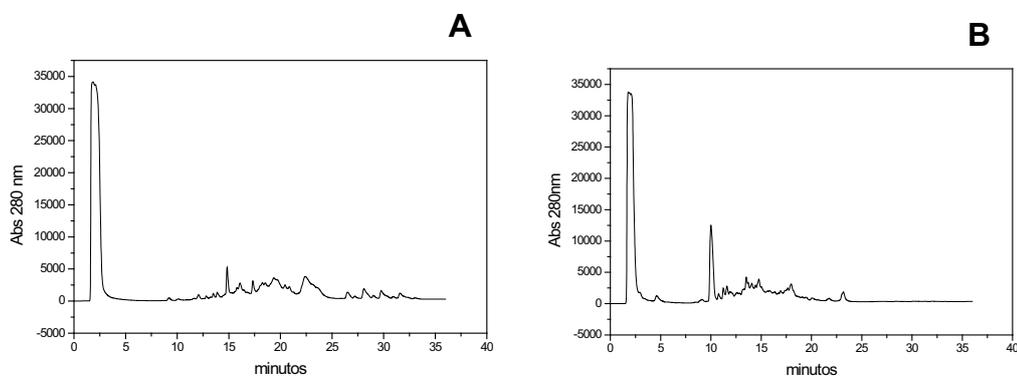
Em nosso estudo, a realização dos experimentos à temperatura de 50°C favoreceu o maior grau de hidrólise das proteínas do soro observadas tanto pelas cromatografias quanto eletroforeses (Figuras 6, 7, 8 e 9).

Quanto ao tempo de exposição das enzimas com o soro, podemos dizer que em todas as condições a amostra de 120 minutos se mostra mais hidrolisada quando comparada com tempos anteriores, menores, sendo feito o experimento para produção de proteínas com maior grau de hidrólise para confirmar esta informação.

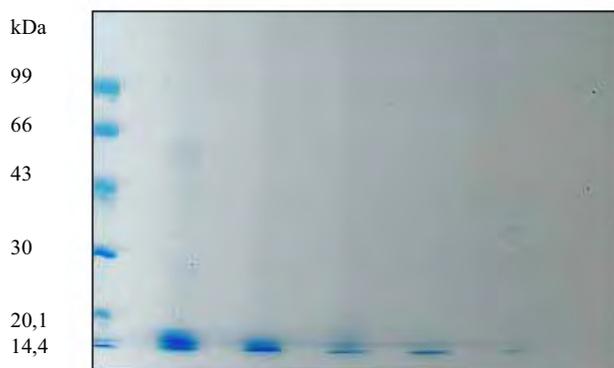
Observando o tempo de retenção apresentado pelos cromatogramas na Figura 6, vemos que a partir de 25 minutos a presença de proteínas não é mais detectada na condição de TH (Totalmente Hidrolisado) quando comparamos com os cromatogramas da Figura 8.

Isso também é notado observando as eletroforeses e o número de bandas apresentadas nos minutos finais de reação nas Figuras 7 e 9.

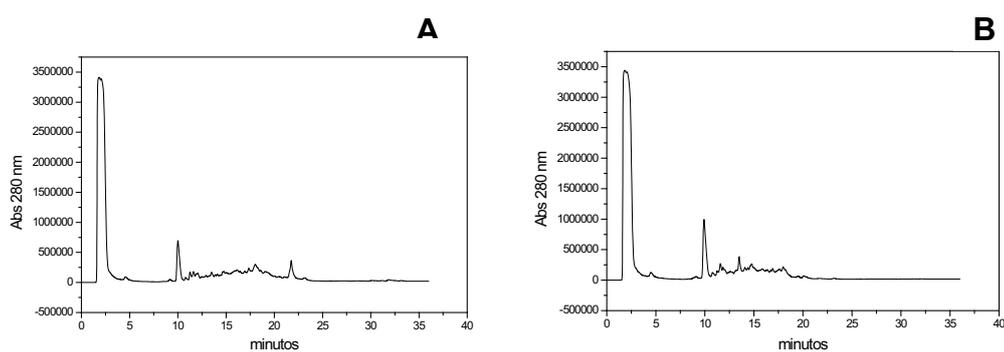
Esses resultados confirmam os resultados obtidos na dosagem de quantidade de aminoácidos totais, já apresentados na Tabela 3.



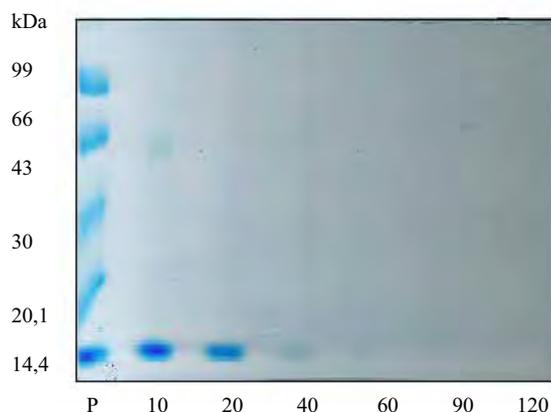
**Figura 6** - HPLC do produto de hidrólise do soro do leite (condição PH) no tempo de 40 minutos em A e 120 minutos em B.



**Figura 7** - Eletroforese em gel desnaturante do produto de hidrólise do soro do leite (condição PH - hidrólise parcial) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação. P= padrão de massa molecular (Amersham Pharmacia Biotech).



**Figura 8** - HPLC do produto de hidrólise do soro do leite (condição TH – hidrólise total) no tempo de 40 minutos em A e 120 minutos em B.



**Figura 9** - Eletroforese em gel desnaturante do produto de hidrólise do soro de queijo (condição TH, hidrólise total) nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de reação. P= padrão de massa molecular(Amersham Pharmacia Biotech).

Sobre os resultados obtidos frente à metodologia empregada, é importante lembrar que, *in vivo*, a proteólise tem início no estômago, na presença de pepsina, e prolonga-se no intestino delgado, por ação das enzimas proteolíticas pancreáticas e das peptidases da mucosa intestinal. As proteases pancreáticas mais relevantes são a tripsina,  $\alpha$  - quimotripsina e a elastase, as endopeptidases que clivam as ligações peptídicas internas, e as carboxipeptidases A e B, exopeptidases que digerem os fragmentos produzidos pelas enzimas anteriores (LANGGUTH et al., 1997). Essa informação pode explicar e ratificar a vantagem em utilizar as enzimas de forma seqüencial, já que desta forma não há competição e a hidrólise é mais efetiva.

#### **7.4 Método “*in vitro*” para determinação da digestibilidade das proteínas do soro do leite**

Após a obtenção e caracterização dos hidrolisados descritos anteriormente, iniciou-se os testes que avaliaram a bioacessibilidade das proteínas do soro do leite. O ensaio que avalia a dialisabilidade *in vitro* foi realizado com as proteínas integrais, com o intuito de obter uma padronização e validação do método. Isto possibilitará a utilização desta metodologia em outras amostras, como as de hidrolisados protéicos do soro do leite.

##### *7.4.1 Dosagem de proteína*

Uma das caracterizações utilizadas foi a determinação de proteínas totais, utilizando o método de Lowry, visto que esta é uma das metodologia mais utilizadas na literatura na determinação destes elementos, por demonstrar alta sensibilidade em apresentar a concentração protéica de uma amostra (ZAIA et al., 1998).

Para que fossem obtidos resultados mais fidedignos, as amostras analisadas foram diluídas vinte vezes. Foram realizados testes antes da digestão *in vitro*, após a primeira etapa da digestão (digestão gástrica), como também do produto que se apresentava no interior e no exterior da membrana de diálise após a digestão intestinal.

Os resultados são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Dosagem de proteínas em diferentes estágios da digestão gastrointestinal *in vitro*

<b>Amostras de soro (diluição de 20x)</b>	<b>g/L</b>
Soro antes da digestão	5,44±0,18
Soro após digestão gástrica	5,45±0,16
Soro após digestão intestinal (externo)	4,16±0,11
Soro após digestão intestinal (interno)	1,75±0,06

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

#### 7.4.2 Dosagem de açúcar redutor

A dosagem de açúcares redutores antes do início do ensaio que avalia a biodisponibilidade das proteínas do soro do leite é interessante para verificar, antes da utilização das amostras, a quantidade dessa substância que está presente. Isto se faz necessário já que, como citado anteriormente, os açúcares são interferentes na determinação de proteínas (LEA & HANNAN, 1949; LEA & HANNAN, 1950). Os açúcares reagem com o reativo de Folin-Ciocalteau resultando em falso positivo (ZAIA et al., 1998).

Utilizando como parâmetro a curva padrão de dosagem de lactose já descrita anteriormente, foi determinada a concentração deste açúcar na amostra antes da digestão. O valor determinado apresentou-se na casa

de 1,0 g/L, nos indicando uma redução de 95% da lactose presente no soro do leite.

#### 7.4.3 Caracterização do perfil peptídico após a digestão gastrointestinal *in vitro*

O método escolhido para caracterização dos peptídeos e aminoácidos foi descrito por McDonald & Chen (1965), como já foi citado em nossa seção de Materiais e Métodos.

A análise foi feita com as amostras iniciais, as formadas logo após o termino da digestão gástrica e por fim, dos produtos após a digestão intestinal, com a avaliação do conteúdo que se apresentava no interior e exterior da membrana de diálise.

A absorção das amostras foi avaliada em 700nm, utilizando como coeficiente de extinção molar o valor de 1,022 e os valores obtidos estão demonstrados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Produtos da reação da digestão gastrointestinal *in vitro*

<b>Amostras de soro</b>	<b>U totais de aa</b>
Soro antes da digestão	0,087±0,002
Soro após digestão gástrica	0,368±0,004
Soro após digestão intestinal (externo)	0,253±0,003
Soro após digestão intestinal (interno)	0,488±0,004

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

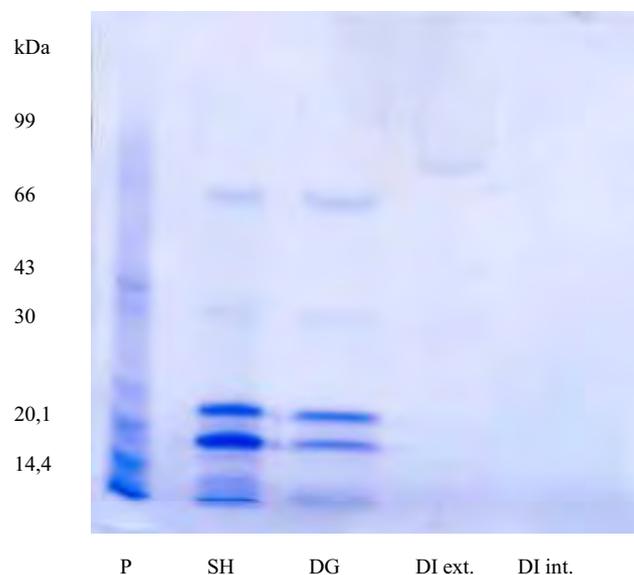
Com a observação dos valores das Unidades Totais de aminoácidos, notamos um aumento ao longo da digestão, nos indicando que a hidrólise estava sendo concretizada. Este aumento foi gradual, demonstrando que após a digestão gástrica, este aumento foi de 4 vezes, e de 70% com a digestão intestinal.

Já, com a observação das Unidades Totais de aminoácidos após a digestão intestinal, notamos que a quantidade absorvida é duas vezes maior do que a quantidade externa a membrana.

A atividade proteolítica é talvez um dos maiores obstáculos na administração oral de proteínas. Isto pode ser explicado pelo fato de estarmos trabalhando com proteínas integrais, que apresentam, *in vivo*, uma absorção de 94 – 98% do total de proteínas quando ingeridas por via oral, sobretudo, por rápida e intensa degradação pré-sistêmica pelas enzimas proteolíticas e por sua permeabilidade intestinal, face à sua elevada massa molecular (MM), sendo a extensão da degradação protéica dependente da estrutura do peptídeo ou proteína (SILVA et al., 2002).

## **7.5 Caracterização das amostras utilizando eletroforese em SDS-PAGE**

A utilização do ensaio de eletroforese teve como objetivo mostrar a separação de moléculas, conforme o tamanho, massa molecular e carga elétrica. A metodologia utilizada, já descrita na seção de materiais e métodos, também nos indicou o grau de proteólise apresentado pela digestão.



**Figura 10** - Eletroforese em gel desnaturante das amostras retiradas durante a digestão gastrointestinal: SH= soro sem hidrólise; DG= após a digestão gástrica; DI<sub>ext.</sub>= após a digestão intestinal externa a membrana; DI<sub>int.</sub>= amostra absorvida – interna a membrana e P= padrão de massa molecular da Amersham Pharmacia Biotech).

Neste teste, foi verificada a diminuição do tamanho das proteínas ao longo da digestão. Notamos o padrão, seguido da amostra de soro após a digestão gástrica e amostras do digerido intestinal que ficaram dentro e fora da membrana.

A eletroforese em SDS-PAGE indica apenas as proteínas ainda presentes nas amostras, dessa forma, observa-se com o decorrer da digestão o desaparecimento de bandas, principalmente as de mais baixo massa molecular, indicando assim a confirmação da sua hidrólise. São observadas na amostra antes do início da digestão bandas mais nítidas quando comparamos com o estágio após a digestão gástrica. Isto indica a lise que ocorreu por ação das enzimas proteolíticas, diminuindo 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 SDS-PAGE, 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 pelas Unidades Totais de aminoácidos, já descritas anteriormente.

Como descrito por Kananen (2000) a utilização da eletroforese SDS-PAGE consegue demonstrar as modificações proteicas que ocorreram durante a digestão, sendo um bom método para a comprovação da hidrólise. No nosso trabalho, como descrito anteriormente, ocorreu a redução do número de bandas como também de sua nitidez. Isto também é observado nos ensaios realizados por

Mandalari (2009) com a diminuição do número de bandas ao longo da digestão gastrointestinal constatando a redução da massa molecular dos componentes avaliados.

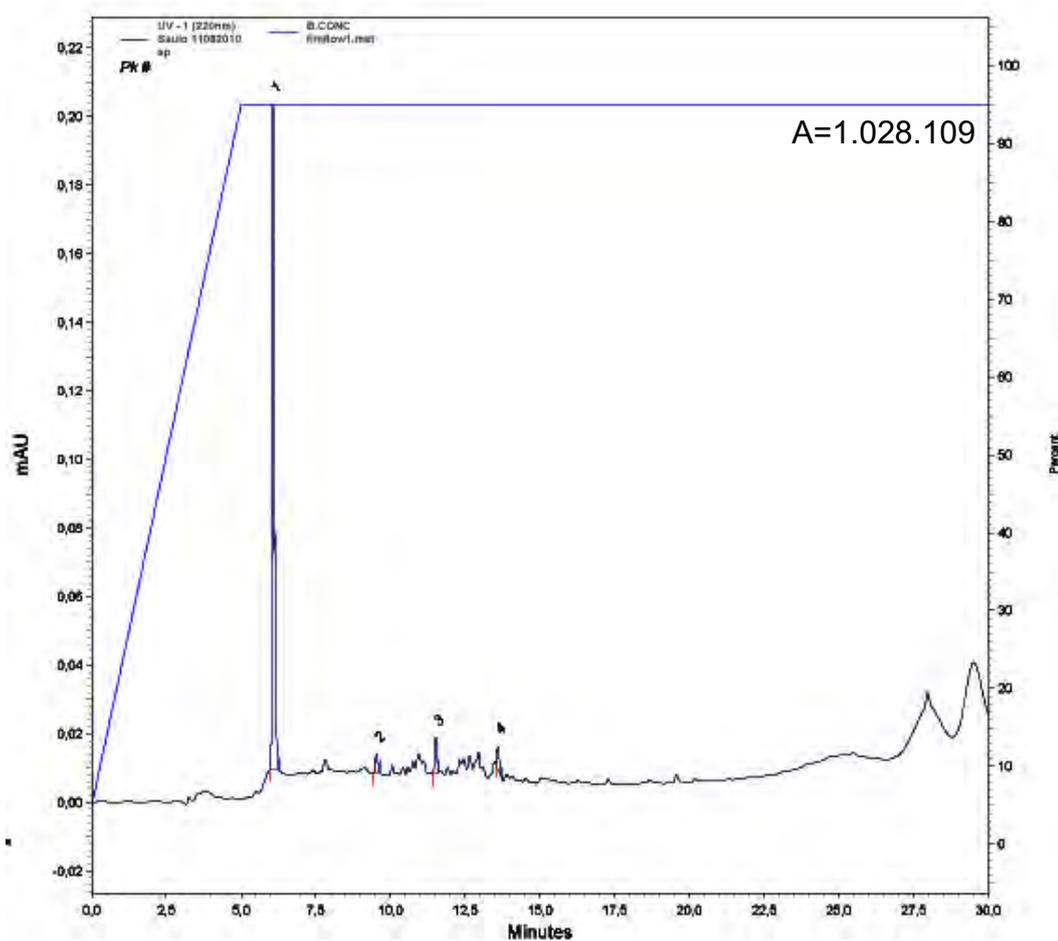
### ***7.6 Caracterização das amostras utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência***

A técnica de HPLC utilizada no presente trabalho foi eficiente na determinação da concentração de pequenos peptídeos que estavam presentes em cada fase do ensaio. Isto pode ser constatado observando a área da curva apresentada pelos cromatogramas.

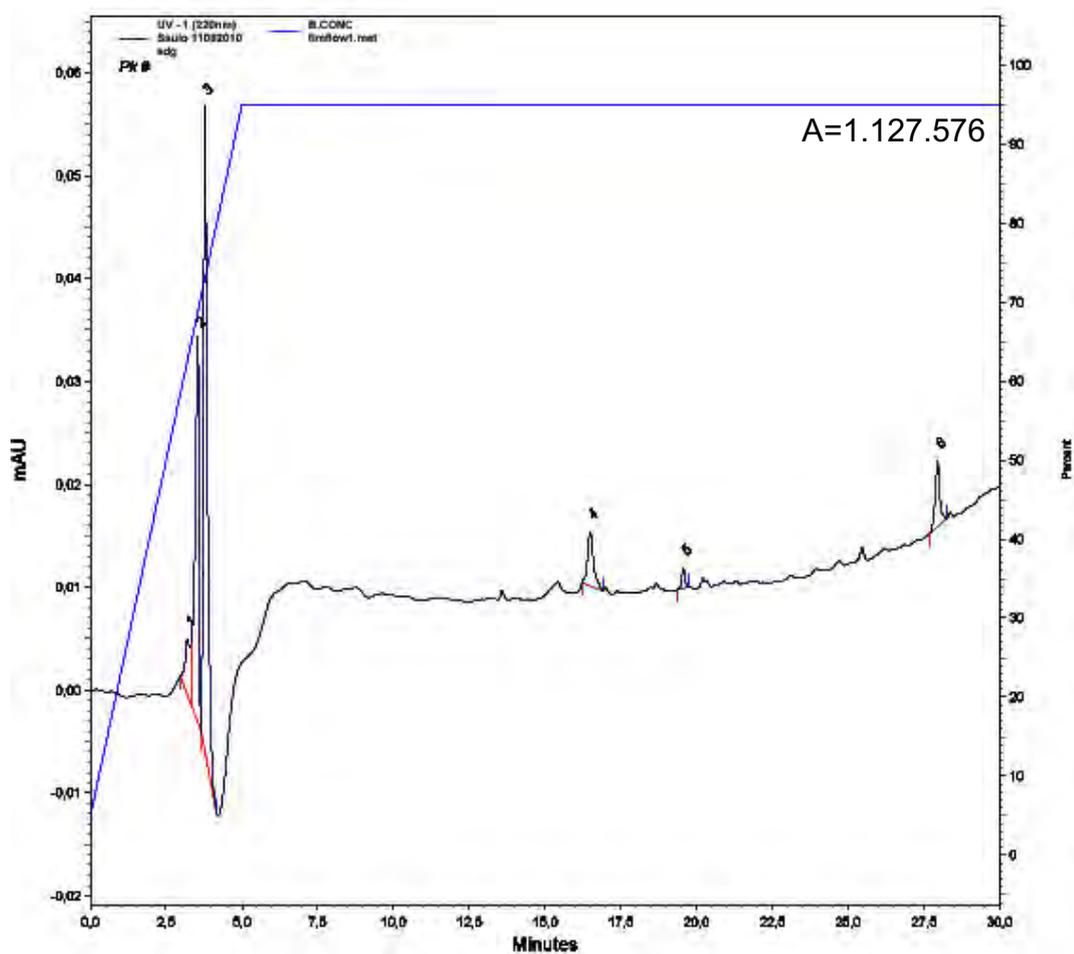
O HPLC analítico foi realizado em um sistema Varian ProStar, empregando-se uma coluna de fase reversa Nucleosil C<sub>18</sub> (25 x 0.46 cm; 5 µm; 300 Å) com eluição em gradiente linear de 5 – 95% com o solvente B (A: water, 0.045% TFA; B: ACN, 0.036% TFA) por 30 min, com fluxo de 1.0 mL/min e detecção em comprimento de onda de 220 nm.

Observando os resultados dos quatro cromatogramas apresentados nas Figuras 11, 12, 13 e 14, notamos novamente a seqüência da digestão através da hidrólise das proteínas e a formação de pequenos peptídeos, que é demonstrado pela área da curva apresentada nos gráficos. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é um método bastante fidedigno e sensível na determinação de peptídeos (ERBELEIN, 1995).

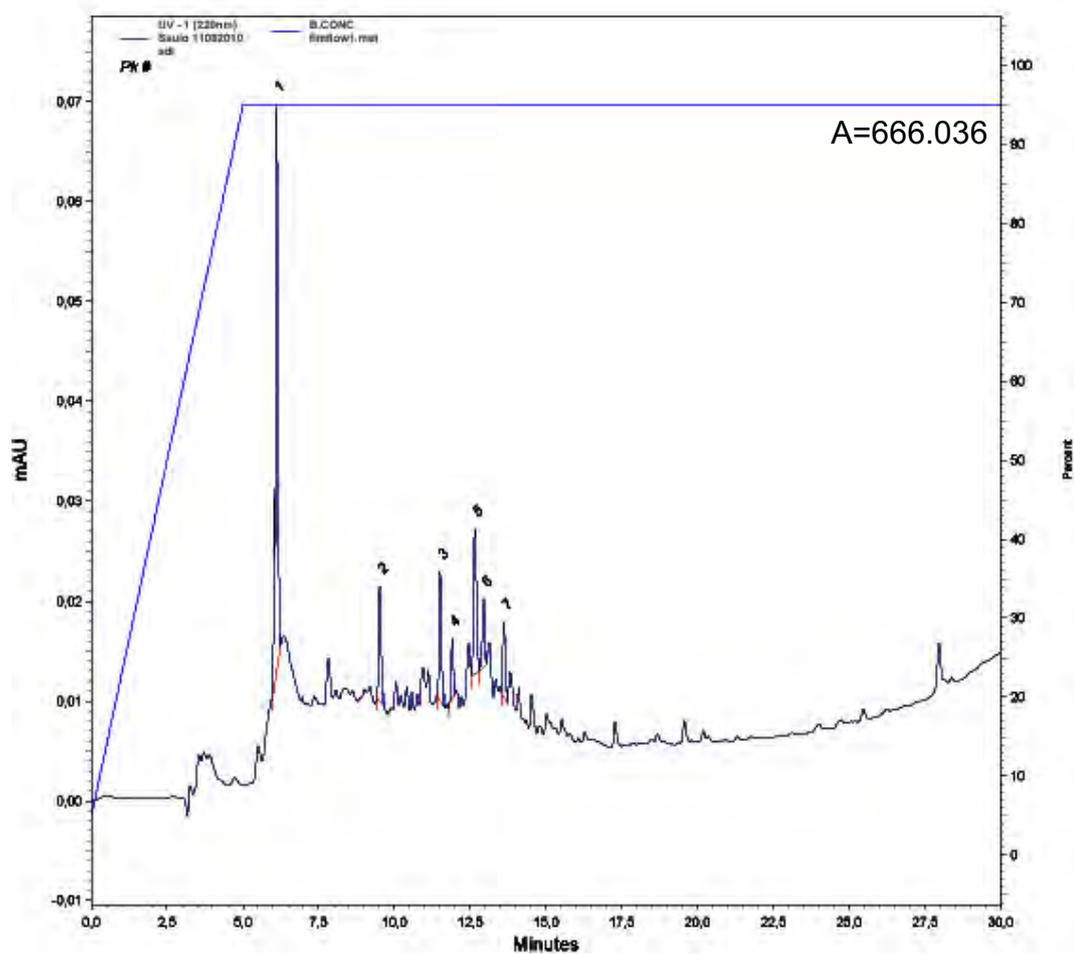
A área da curva, relacionada a concentração de pequenos peptídeos na amostra, é demonstrada na Tabela 6.



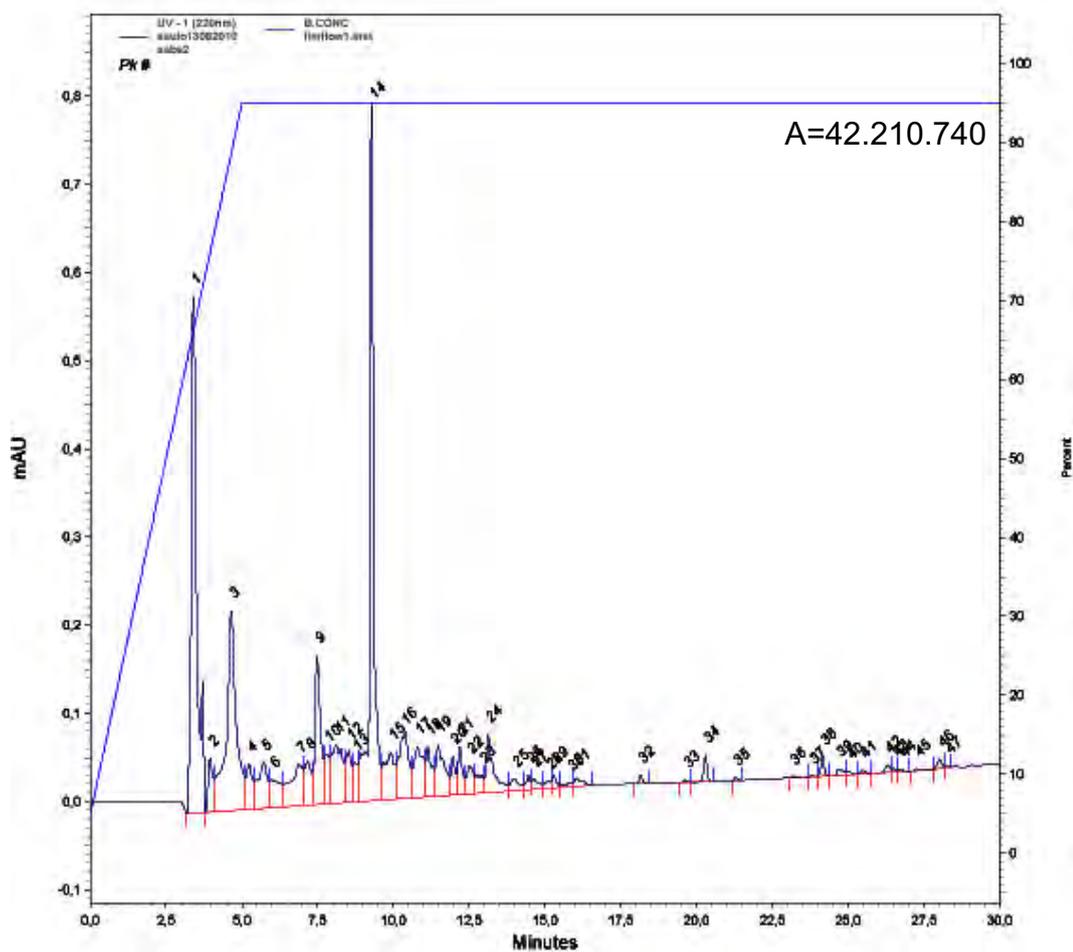
**Figura 11-** HPLC da amostra inicial, antes da digestão - SH. (A), na região superior direita, representa a área sob a curva.



**Figura 12-** HPLC da amostra após a digestão gástrica - DG. (A), na região superior direita, representa a área sob a curva.



**Figura 13-** HPLC da amostra após a digestão intestinal (amostra externa a membrana) –  $DI_{ext.}$  (A), na região superior direita, representa a área sob a curva.



**Figura 14** - HPLC da amostra após a digestão intestinal (amostra interna a membrana - absorvida) –  $DI_{int.}$  (A), na região superior direita, representa a área sob a curva.

**Tabela 6** - Produtos da reação da digestão gastrointestinal *in vitro*

<b><i>Amostras de soro</i></b>	<b><i>Área</i></b>
Soro antes da digestão	1.028.109
Soro após digestão gástrica	1.127.576
Soro após digestão intestinal (externo)	666.036
Soro após digestão intestinal (interno)	42.210.740

Os resultados do HPLC mostraram que a digestão gastrointestinal *in vitro* promoveu de forma eficiente a lise das proteínas. Inicialmente, a amostra continha uma pequena quantidade de peptídeos e esta quantidade recebeu um pequeno aumento após a digestão gástrica realizada pela enzima pepsina. A pepsina, uma protease que age preferencialmente sobre ligações peptídicas formadas pelo aminogruppo de aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina). Os produtos principais da ação da pepsina são peptídeos grandes e poucos aminoácidos (SILVA, 2002). Isso explica o leve aumento da área da curva após a digestão gástrica.

Já após a digestão intestinal, há um aumento bastante considerável de pequenos peptídeos, o que é demonstrado pelos valores da área descritos nos cromatogramas. Um dado bastante relevante e interessante sobre estes dados é a demonstração através dos valores das áreas da curva, da quantidade de pequenos peptídeos no interior e no exterior da membrana. Observamos uma grande diferença quando

comparamos estes dois valores. Isso mostra que o método é efetivo para a constatação da dialisabilidade de peptídeos frente a um ensaio que estima *in vitro* a digestão gastrointestinal, nos fornecendo uma prévia para estudos futuros.

De acordo com Mota (2004), a utilização da técnica de HPLC em fase reversa demonstra bastante confiabilidade na detecção de peptídeos após hidrólise, fornecendo dados sobre a extensão hidrolítica. O perfil cromatográfico da degradação e formação de peptídeos pode ser usado como uma impressão digital das enzimas durante o procedimento experimental. Dessa forma, a técnica cromatográfica desenvolvida demonstrou ser adequada para o estudo do perfil cromatográfico de amostras hidrolisadas (MOTA, 2004).

A separação dos peptídeos e aminoácidos pela membrana de diálise, assim como o método que promoveu a sua obtenção também pode ser conferido observando o número de picos cromatográficos apresentados nos gráficos das Figuras 11, 12, 13 e 14. É evidente o seu aumento e sua maior concentração no interior da membrana de diálise.

O método de HPLC em fase reversa é preciso, sensível e confiável, sendo um processo que otimiza a separação de componentes do soro do leite. Além disso, estas informações que demonstram a heterogeneidade dos peptídeos podem futuramente ser adicionadas a resultados de outros métodos, como a Espectrometria de Massas (ELGAR, 2000).

Com isso, concluímos que os dados quantitativos obtidos pelo método de HPLC em fase reversa apresentam boa concordância com outros métodos (eletroforese SDS-PAGE e método de McDonald & Chen) de análise de proteínas do soro do leite.

## **8 CONCLUSÕES**

---

---

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho e nos limites da metodologia empregada, conclui-se que as condições hidrolíticas testadas neste estudo foram eficientes na obtenção de hidrolisados. Os testes utilizados para constatar o processo hidrolítico foi eficiente e demonstraram de diferentes formas os diferentes graus de hidrólise obtido. A dosagem de proteínas foi um parâmetro que auxiliou a comprovação da digestão gastrointestinal *in vitro*. Os resultados encontrados mostram uma diminuição dos valores obtidos durante a digestão *in vitro*. Um dado a ser ressaltado é o valor mais baixo (1,75 g/L) no interior da membrana comprovando que a membrana comporta-se como uma barreira a grandes proteínas igualmente a membrana intestinal humana. Já a dosagem de açúcares redutores antes do início do ensaio que avaliou a bioacessibilidade das proteínas do soro do leite foi importante na verificação, antes da utilização das amostras, da quantidade dessa substância que estava presente, já que os açúcares são interferentes na determinação de proteínas, gerando resultados falsos positivos.

Com a observação dos valores das Unidades Totais de aminoácidos, notamos um aumento ao longo da digestão, nos indicando que a hidrólise estava sendo concretizada. Após a digestão intestinal, foi observado que a quantidade absorvida é duas vezes maior do que a quantidade externa a membrana.

Os resultados da eletroforese em SDS-PAGE indicavam apenas as proteínas ainda presentes nas amostras, dessa forma, observou-se com o decorrer da digestão o desaparecimento de bandas, principalmente as de mais baixo peso molecular, indicando assim a confirmação da sua hidrólise. Foram demonstradas na amostra antes do início da digestão bandas mais nítidas quando comparamos com o estágio após a digestão gástrica. Isto indicou a lise que ocorreu por ação da enzima proteolítica, diminuindo a quantidade de proteínas que estavam presentes na amostra. Já com o término da digestão intestinal, as bandas proteicas não foram mais evidenciadas na eletroforese SDS-PAGE, 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 pelas Unidades Totais de aminoácidos.

Com a técnica de HPLC utilizada no presente trabalho foi notada a eficiência na determinação da concentração de pequenos peptídeos que estavam presentes em cada fase do ensaio. Isto pode ser constatado observando a área da curva e o número de picos apresentados pelos cromatogramas. Os resultados do HPLC demonstrados mostraram que a digestão gastrointestinal *in vitro* ocorreu, de forma eficiente, a lise das proteínas. Foi observado diferentes estágios durante o processo de digestão gastrointestinal com o aumento gradual de peptídeos e aminoácidos, que foi evidenciado pela área das curvas e número de picos dos diversos cromatogramas, assim como do número de picos obtidos,

indicando a presença dos componentes testados. Isso é bastante nítido quando comparamos os cromatogramas que representam o interior e o exterior da membrana. Isso mostra que o método é efetivo para a constatação da dialisabilidade de peptídeos frente a um ensaio que estima *in vitro* a digestão gastrointestinal, nos fornecendo uma prévia para estudos futuros.

O perfil cromatográfico da degradação e formação de peptídeos pode ser usado como uma impressão digital das enzimas durante o procedimento experimental. Dessa forma, a técnica cromatográfica desenvolvida demonstrou ser adequada para o estudo do perfil cromatográfico de amostras hidrolisadas. O método de HPLC em fase reversa foi adequado para as amostras testadas, sendo um processo que aperfeiçoou a separação de componentes do soro do leite.

Dessa forma, concluímos que o método proposto realmente estima a dialisabilidade das proteínas do soro do leite, abrindo portas para futuros testes com as amostras hidrolisadas já obtidas em laboratório.

## **9 REFERÊNCIAS**

---

---

ANTUNES, A.J. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. Barueri: Manole, 2003. 135 p.

AKHAVAN, T.; LUHOVYY, B.L.; BROWN, P.H.; CHO, C.E.; ANDERSON, G.H. Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.91, p.966-75, 2010.

ALEXANDER, D.D.; CABANA, M.D. Partially hydrolyzed 100% whey protein infant formula and reduced risk of atopic dermatitis: a meta-analysis. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v.50, p.422-30, 2010.

BARÓ, L. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. **Ars. Pharmaceutica**, Granada, v. 42, p. 135-45, 2001.

BONANG, G.; MONINTJA, H.E.; SUJUDI; VAN DER WAAIJ, D. Influence of breastmilk on the development of resistance to intestinal colonization in infants born at the Atma Jaya Hospital, Jakarta. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.32, p.189-196, 2000.

BOUKHETTALA, N.; IBRAHIM, A.; AZIZ, M.; VUICHOUD, J.; SAUDAN, K.Y.; BLUM, S.; DÉCHELOTTE, P.; BREUILLÉ, D.; COËFFIER, M. A diet containing whey protein, free glutamine, and transforming growth factor-beta ameliorates nutritional outcome and intestinal mucositis during repeated chemotherapeutic challenges in rats. **J. Nutr.**, v.140, p.799-805, 2010.

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.

BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P.A. Influence of dietary proteins on the immune system of mice. **J. Nutr.**, v.112, p.1747-1755, 1982.

BRANS, G.; SCHROEN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M.; BOOM, R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **J. Membr. Sci.**, v.243, p.263-272, 2004.

CASTRO, G.A.; CARVALHO, J.E.; TINTI, S.V.; POSSENTI, A.; SGARBIERI, V.C. Anti-ulcerogenic effect of a whey protein isolate and collagen hydrolysates against ethanol ulcerative lesions on oral administration to rats. **J. Med. Food**, v.13, p.83-90, 2010.

CHATTERTON, D.E.W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of  $\alpha$ -lactoglobulin and R-lactalbumin technological implications for processing. **Int. Dairy J.**, v.16, p.1229-1240, 2006.

CHEISON, S.C.; WANG, Z.; XU, S.Y. Preparation of whey protein hydrolysates using a single- and two-stage enzymatic membrane reactor and their immunological and antioxidant properties: characterization by multivariate data analysis. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, p. 3896-904, 2007.

CRESPO, M.B.V. **Biodisponibilidad de calcio, hierro y cinc en leguminosas mediante ensayos *in vitro* con cultivos celulares.** 2002. 214p. Tese (Doutorado) – Facultad de Farmacia – Universidad de

Valencia, Espanha.

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

DE WIT, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.597-608, 1998.

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.

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.

GALVÃO, C.M. Controlled hydrolysis of cheese protein using trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.91-93, p. 761-776, 2001.

GILL, H.S.; RUTHERFORD, K.J.; CROSS, M.L. Functional Foods II – Claims and Evidence. **Bovine milk: a unique source of immunomodulatory ingredients for functional foods.** In: Buttriss J, Saltmarsh M, eds. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry

Press, 2000, p.82-90.

GRIJSPEERDT, K.; HAZARIKA, B.; VUCINIC, D. Application of computational fluid dynamics to model the hydrodynamics of plate heat exchangers for milk fouling. **J. Food Eng.**, v.57, p.237–242, 2003.

GUIMONT, C.; MARCHALL, E.; GIRARDET, J.M.; LINDEN, G. Biologically active factors in bovine milk and dairy byproducts: influence on cell culture. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v.37, p.393-410, 1997.

HA, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying benefits for health. **J. Nutr. Biochem.**, v.14, p.251-58, 2003.

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.

IMAFIDON, G.I.; FARKYE, N.Y.; SPANIER, A.M. Isolation, purification and alteration of some functional groups of major milk protein: a review. **Crit. Rev. Food Sci.**, v.37, p.663-689, 1997.

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.

KELLY, G. Bovine colostrums: a review of clinical uses. **Altern. Med. Rev.**, v.8, p.378-394, 2003.

KOEN, G.; BIRINCHI, H.; VUCINIC, D. Application of computational fluid dynamics to model the hydrodynamics of plate heat exchangers for milk processing. **J. Food Engineer.**, v.57, p.237-42, 2003.

KOLETZKO, B. Innovations in Infant Milk Feeding: From the Past to the Future. **Nestle Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program**, v.66, p.1-17, 2010.

KRIEG, R.C.; DONG, Y.; SCHWAMBORN, K.; KNUECHEL, R. Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS PAGE. **J. Biochem. Biophys. Met.**, v.65, p.13-19, 2005.

KRISSANSEN, G.W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.26, p.713s-23s, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANGGUTH, P.; BOHNER, V.; HEIZMANN, J.; MERKLE, H.P.; WOLFFRAM, S.; AMIDON, G.L.; YAMASHITA, S. The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery. **J. Control. Rel.**, v. 46, p.39-57, 1997.

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.

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.

LEWIS, W.; KESHAVARZ-MOORE, E.; WINDUST, J.; BUSHELL, D.; PARRY, N. Construction and evaluation of novel fusion proteins for targeted delivery of micro particles to cellulose surfaces. **Biotechnol. Bioeng.**, v.94, p.625-32, 2006.

LI, Z.K.; ZHU, Y.Y.; YIN, X.G.; PENG, C.F.; CHEN, W.; LIU, L.Q.; YIN, L.M.; XU, C.L. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus pesticide paraoxon-methyl. **Immunol. Invest.**, v. 38, p.510-25, 2009.

LIZIEIRE, R.S.; CAMPOS, O. F. Soro de queijo “in natura” na alimentação do gado de leite. **Embrapa gado de leite**, p.46, 2000.

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

LUTEN, J.; CREWS, H.; FLYNN, A.; VAN DAEL, P.; KASTENMAYER, P.; HURREL, 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.

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.

MARQUES, D.P. **Separação e hidrólise das proteínas do soro do leite: alternativas para o reaproveitamento deste resíduo.** 2005. 82p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

MARSHALL, K. Therapeutic Applications of Whey Protein. **Alt. Med. Review**, v.9, p.136-156, 2004.

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.

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.**, Bethesda, v.34, p. 2248-2256, 1981.

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

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.

MONTI, R.; GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C.; MARQUES, D.P.; GOULART, A.J.; CUSTÓDIO, M.F. Hydrolysis of cheese whey protein with trypsin, chymotrypsin and carboxypeptidase A. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.16, n.2, p.105-109, 2005.

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.

MORIFUJI, M.; ISHIZAKA, M.; BABA, S.; FUKUDA, K.; MATSUMOTO, H.; KOGA, J.; KANEGAE, M.; HIGUCHI, M. Comparison of different sources and degrees of hydrolysis of dietary protein: effect on plasma amino acids, dipeptides, and insulin responses in human subjects. **J. Agric. Food Chem.**, v.58, p.8788-97, 2010.

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

476, 1993.

MURAKAMI, K.; LAGARDE, M.; YUKI, Y. Identification of minor proteins of human colostrum and mature milk by two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v.19, p.2521–2527, 1998.

NERY-DIEZ, A.C.; CARVALHO, I.R.; AMAYA-FARFÁN, J.; ABECIASORIA, M.I.; MIYASAKA, C.K.; FERREIRA, C.D.A.S. Prolonged ingestion of prehydrolyzed whey protein induces little or no change in digestive enzymes, but decreases glutaminase activity in exercising rats. **J. Med. Food**, v.13, p.992-8, 2010.

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

PAL, S.; ELLIS, V. The chronic effects of whey proteins on blood pressure, vascular function, and inflammatory markers in overweight individuals. **Obesity (Silver Spring)**, v.18, p.1354-9, 2010.

PAL, S.; ELLIS, V.; DHALIWAL, S. Effects of whey protein isolate on body composition, lipids, insulin and glucose in overweight and obese individuals. **Br. J. Nutr.**, v.9, p.1-8, 2010.

PEREA, A.; UGALDE, U. Continuous hydrolysis of whey protein in a membrane recycle reactor. **Enz. Microb. Tech.**, Spain, n.18, p.29-34, 1996.

PHILLIPS, S.M.; TANG, J.E.; MOORE, D.R. The role of milk- and soy-

based protein in support of muscle protein synthesis and muscle protein accretion in young and elderly persons. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.28, p.343-54, 2009.

POTIER, M.; TOMÉ, D. Comparison of digestibility and quality of intact proteins with their respective hydrolysates. **J. AOAC Int.**, v.91, p.1002-06, 2008.

RAGHUNATH, M.; NARASINGA RAO, B.S. Release of peptides and amino acids from dietary proteins during sequential enzymatic digestion *in vitro* with pepsin, pancreatin + trypsin and erepsin. **Food Chem.**, v.15, p.285-306, 1984.

RICHARDS, N.S.P.S. Soro lácteo – Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Rev. Food Ingredients**, Rio Grande do Sul, v. 17, p. 20-27, 2002.

ROGNVALDARDOTTIR, N. **Icelandic Food and Cookery**. New York, NY: Hippocrene Books; 2001.

RUSU, D.; DROUIN, R.; POULIOT, Y.; GAUTHIER, S.; POUBELLE, P.E. A bovine whey protein extract stimulates human neutrophils to generate bioactive IL-1Ra through a NF-kappaB- and MAPK-dependent mechanism. **J. Nutr.**, v.140, p.382-91, 2010.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; DOMINGOS FERREIRA, F.V. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.38, p.125-141, 2002

STANTON, C.; FITZGERALD, R.J.; DONNELLY, W.J.; O'CONNOR, P. Development of Technologies for separation and functional improvement of individual milk protein fractions. **The Dairy Products Research Centre**, Moorepark, Fermoy, 2002.

STANTON, C.; FITZGERALD, R.J.; DONNELLY, W.J.; O'CONNOR, P. Development of Technologies for separation and functional improvement of individual milk protein fractions. **The Dairy Products Research Centre.**, Moorepark, Fermoy, 2002.

WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.42, p.353-375, 2002.

YAMADA, M.; MURAKAMI, K.; WALLINGFORD, J.C.; YUKI, Y. Identification of low-abundance proteins of bovine colostrum and mature milk using two-dimensional electrophoresis followed by microsequencing and mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 23, p.1153–1160, 2002.

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.

ZYDNEY, A.L. Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. **Int. Dairy J.**, v.8, p.243-250, 1998.

# CAPÍTULO 2

---

---

## ARTIGOS

---

---

**Digestibilidade das proteínas do soro do leite mediante ensaio *in vitro*****Assessing the digestibility of milk whey proteins using an *in vitro* model**

**Título resumido** - Digestibilidade das proteínas do soro do leite em ensaios *in vitro*

**Carolina Bizelli Silveira<sup>a</sup>; Daniela Parreira Marques<sup>b</sup>; Saulo S. Garrido<sup>c</sup>; Reinaldo Marchetto<sup>d</sup>, Rubens Monti<sup>e</sup>.**

<sup>a</sup>**Mestranda**, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Alimentos e Nutrição, Araraquara, São Paulo, Brasil.

<sup>b</sup>**Doutora**, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Alimentos e Nutrição, Araraquara, São Paulo, Brasil.

<sup>c</sup>**Doutor**, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Bioquímica, Araraquara, São Paulo, Brasil.

<sup>d</sup>**Professor Adjunto**, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Bioquímica, Araraquara, São Paulo, Brasil.

<sup>e</sup>**Professor Adjunto**, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Alimentos e Nutrição, Araraquara, São Paulo, Brasil.

**Auxílio** - FAPESP (2008/08252-0)

***Autor correspondente***

Carolina Bizelli Silveira

Dep. de Alimentos e Nutrição - UNESP - Univ. Estadual Paulista

Rodovia Araraquara/Jau Km 1, CEP: 14801-902 - Araraquara-SP, Brasil

E-mail: carolbizelli@gmail.com

Telefone: (16) 9164-8046

## **Digestibilidade das proteínas do soro do leite mediante ensaio *in vitro*.**

### **RESUMO**

O presente trabalho tem o objetivo de verificar, *in vitro*, a digestibilidade das proteínas do soro do leite, padronizando as características de bioacessibilidade, permitindo que esta fração possa ser utilizada em formulações de maneira funcional. Para isso, o soro lácteo foi preparado a partir de leite B e enzima renina, dialisado e filtrado, após adição de caulim. A amostra obtida foi caracterizada através de dosagens protéicas, de açúcar redutor e de gordura. O método de digestão *in vitro* foi realizado em duas etapas: digestão gástrica (realizada com a utilização da enzima pepsina em pH 2) e intestinal (aonde foi utilizada uma mistura enzimática de pancreatina-extrato biliar em pH 7,5, seguida de diálise para separação dos peptídeos e aminoácidos absorvíveis). Com o intuito de se comprovar a digestão gastrointestinal *in vitro* e padronizar o ensaio para a amostra estudada, foram utilizadas metodologias de dosagem de peptídeos e aminoácidos, eletroforese SDS-PAGE e HPLC em fase reversa. Os resultados das três metodologias demonstraram um pequeno aumento no grau de hidrólise das proteínas após a digestão gástrica e a formação de uma amostra altamente hidrolisada após a digestão intestinal, sendo que a maior parte destes produtos se apresentou no interior da membrana de diálise, indicando a sua absorção. Com base nos resultados obtidos e nos limites da metodologia empregada, conclui-se que o método que promove a digestão gastrointestinal *in vitro* realmente estima a digestibilidade das proteínas do soro do leite, abrindo portas para futuros testes.

**Palavras chave:** Soro do leite, proteínas, dialisabilidade, digestão gastrointestinal *in vitro*.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm considerado os constituintes do leite como substâncias funcionais, sugerindo que seu uso tenha efeitos diretos e mensuráveis na saúde.<sup>1,2,4</sup> Dentre esses constituintes, merece especial importância o soro do leite, um subproduto obtido durante a fabricação de queijos, de grande importância na indústria de laticínios, pelo seu elevado volume de produção e composição nutricional.<sup>14</sup>

O leite contém duas fontes primárias de proteínas, a caseína e as proteínas do soro. Após o processamento, a caseína é a proteína responsável pela produção do queijo, enquanto que o soro é o resíduo aquoso. Os componentes do soro incluem  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, soro albumina bovina, lactoferrina, imunoglobulinas, enzima lactoperoxidase, glicomacropéptídeos, lactose e minerais.<sup>26,27</sup>

Por volta de 55% dos nutrientes existentes no leite, ou seja, uma quantidade econômica e biologicamente expressiva ficam retidos no soro durante a fabricação de queijos).<sup>14</sup>

A descoberta das propriedades funcionais do soro do leite, assim como sua aplicação nutricional, fez com que essa fração fosse “promovida” a um co-produto da fabricação de queijos, e não mais um subproduto.<sup>14,26</sup> A partir daí, tais proteínas, antes uma sobra industrial, tem sido admitidas como um grupo de proteínas de alto valor, e são até mesmo produzidas com a utilização de alta tecnologia capaz de se obter produtos com altíssima pureza, capazes de promover resultados promissores como alimentos funcionais e até mesmo na indústria farmacêutica.<sup>5,6,9</sup>

Historicamente, o soro do leite era considerado uma panacéia, sendo usado na cura desde complicações gastrointestinais até problemas nas articulações. Em alguns locais do mundo, como na Groelândia, a população fermentava o soro e o estocava em

barris. Dessa forma, o soro diluído em água era ingerido ou usado para preservar carnes e outros alimentos. O soro fermentado era a bebida mais comum da população da Groelândia em substituição à cerveja, devido à falta de grãos na região.<sup>24</sup>

Hoje o soro do leite é tido popularmente como um suplemento protéico, que apresenta atividade antimicrobiana, capacidade de atuar sobre a modulação imune, melhorar a força muscular e a composição corporal, e prevenir doenças cardiovasculares e osteoporose, além de interferir na modulação de outros sistemas biológicos importantes em nosso organismo.<sup>1,2,4</sup>

Outro ponto importante no estudo do soro do leite é a necessidade de se criar alternativas para a utilização desse resíduo. A fabricação de queijos produz cerca de 145 milhões de soro/ano e no Brasil, os queijos tiveram um consumo recorde nestes últimos anos.<sup>23</sup> A minimização de impactos ambientais tornou-se preocupação de toda indústria de transformação em nível mundial, tornando o desenvolvimento de processos limpos de fundamental importância para assegurar a competitividade no mercado global e atender às leis de proteção ambiental.<sup>11,23</sup>

O soro é um potente agente de poluição que pode provocar a destruição da flora e da fauna devido a sua alta demanda biológica de oxigênio (DBO) que é cerca de 30.000 a 50.000 mg de oxigênio por litro de soro. Este valor é aproximadamente 100 vezes maior do que o de um esgoto doméstico. Além dos problemas ambientais causados, o soro do leite ainda pode comprometer a estrutura físico-química do solo, diminuir os rendimentos das colheitas e reduzir a flora e fauna.<sup>11,23</sup>

Uma das alternativas para resolver esse problema é a transformação dos resíduos protéicos em produtos comercializáveis. Com o auxílio de processos técnicos modernos

de separação, o soro de leite vem sendo transformado em produtos de amplas utilidades.<sup>7,23</sup>

Os componentes do soro do leite podem ser utilizados na formulação de bebidas lácteas, leites fermentados, misturas para sucos, ricota, bebidas nutricionais e fortificadas, chocolates, sorvetes, suplementos esportivos, alimentações enterais, dentre outros produtos.<sup>3,23</sup> Esse grande interesse na utilização dessas substâncias é refletido por testes sobre sua ação em diversas doenças com interesse para a área da Saúde Pública, tais como câncer, hepatite, obesidade, osteoporose, hipertensão e até mesmo a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).<sup>14,19</sup> Mas a qualidade das proteínas depende da sua habilidade em fornecer aminoácidos na proporção exigida. Isto depende da sua composição, mas também podem ser modulados pela sua biodisponibilidade, que está relacionada com inúmeros fatores como a digestibilidade, qualidade dos aminoácidos, alguns efeitos metabólicos específicos, assim como outros constituintes do alimento. Além disso, este valor nutritivo também varia de acordo com o estado fisiológico do indivíduo.<sup>22</sup>

Para avaliar o aproveitamento deste produto, e assim determinar a sua biodisponibilidade, pode-se utilizar alguns métodos que são classificados em dois grandes grupos: os métodos *in vivo* e *in vitro*. Os métodos ideais são aqueles realizados em seres humanos. Estes ensaios demonstram resultados mais confiáveis, mas que demandam mais tempo e trabalho para sua realização, além de serem mais custosos e muitas vezes requererem um instrumental mais sofisticado, como aqueles que avaliam a absorção se utilizando de radioisótopos. Uma desvantagem considerável, porém, dos ensaios *in vivo* baseados em modelos animais, é que os mesmos podem levantar questionamentos quanto à possibilidade de seus resultados (em relação à absorção

desses elementos) serem considerados como um preditivo confiável para o modelo humano.<sup>8</sup>

Como uma etapa prévia dos estudos de biodisponibilidade, os métodos *in vitro* de avaliação da biodisponibilidade 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 e 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.<sup>17</sup>

Dessa forma, falta ainda saber, de uma maneira cientificamente aceitável e imparcial, se o soro do leite, pode ser inteiramente aproveitado em nosso organismo. Ou seja, a literatura ainda se mostra carente de informações sobre a dialisabilidade e biodisponibilidade das proteínas do soro do leite, informações essas que mostrariam se tais proteínas, após ingeridas ou quando ministradas em formulações, tornam-se biodisponíveis em quantidades significantes em nosso organismo, estando aptas a cumprir as funções biológicas específicas para as quais tem sido designadas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O material de estudo no presente trabalho foi o soro de leite de bovino. Este material foi preparado no laboratório a partir de leite Dileto tipo B (pausterizado) do Laticínio São Carlos.

### **Preparo da amostra**

O soro láctico foi preparado a partir de leite B e enzima renina (coalho comercial), na proporção de 50 mL de leite para 0,3 mL de coalho. Para a precipitação total das caseínas, foi adicionado 0,5% de  $\text{CaCl}_2$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . A temperatura do banho-maria foi ajustada em  $35^\circ\text{C}$  e assim permaneceu até o final da precipitação. Após a coagulação, a massa foi cortada e dessorada através de processo de filtração simples com gaze. O soro obtido foi mecanicamente processado durante 72 horas sob agitação constante, contra água destilada. Após a diálise, foi adicionado ao soro, caulim, na proporção de 0,6 g de caulim para cada 30 mL de soro, e então foi realizada a filtração em funil de Büchner provido de papel filtro. O soro dialisado e filtrado foi caracterizado com os ensaios de dosagem de carboidratos, de proteínas e gordura, para que então fosse armazenado em frascos identificados, e congelados até o momento do ensaio enzimático.

### **Métodos analíticos**

#### *Dosagem de proteína do soro*

O método de Lowry modificado por Hartree<sup>12</sup> foi utilizado na dosagem das proteínas do soro do leite. É um método bastante sensível, com sensibilidade entre 20 e  $200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  e utiliza como reagentes as soluções de carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio 0,1N (solução A), tartarato de sódio e potássio 1% em água destilada (solução B) e sulfato de cobre 1% em água destilada (solução C). No momento do uso, as soluções foram misturadas na proporção de 50mL de solução A; 0,5mL de B e 0,5mL de C.

Para a dosagem das proteínas, foram realizadas diluições do soro em água destilada, para um volume final de 0,5mL. A estas diluições foram adicionados 2,5mL da mistura das soluções A, B e C citadas acima. As misturas resultantes foram fortemente agitadas e mantidas em repouso por quinze minutos, sendo adicionadas então, de 0,25mL de Folin-Ciocalteau 1N e sofrendo nova agitação. Após trinta minutos, foram realizadas leituras em  $\lambda=660\text{nm}$ . Para a determinação quantitativa foi utilizada curva de calibração com soro albumina bovina (Sigma) como padrão e utilizando como coeficiente de extinção  $3,17619 (\text{mg prot}/0,5 \text{ mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### *Dosagem de açúcar redutor do soro*

A determinação de açúcar redutor (lactose) no soro do leite foi realizada utilizando-se o método do ácido 3-5'-dinitrosalicílico – “DNS”. A efetuação das dosagens partiu de diluições do soro em água destilada para um volume final de 0,25mL, seguida da adição de 0,25mL do reagente DNS. Essa mistura foi aquecida em banho fervente por cinco minutos. Após resfriamento (aproximadamente 3 minutos) à temperatura ambiente, foram adicionadas mais 2,5mL de água destilada à mistura, que foi agitada vigorosamente para homogeneização da cor. A leitura foi feita em  $\lambda=540\text{nm}$ . A curva de calibração foi realizada com lactose (Riedel) como padrão utilizando como coeficiente de extinção molar  $0,49252 (\mu\text{mols}/0,5 \text{ mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### *Dosagem de gordura do soro*

A dosagem da gordura do soro do leite tem o intuito de verificar se a diálise e a filtração em caulim foram eficientes na retirada de gordura do soro. Foi utilizado como reagente 10mL de ácido sulfúrico que foi transferido para um lactobutirômetro de

Gerber. Foi adicionado lentamente 11mL de soro de leite juntamente com 1mL de álcool amílico. A abertura do lactobutirômetro foi fechada para que a mistura fosse agitada até sua completa dissolução. Em seguida a solução foi centrifugada a 4000rpm por 3 a 5 minutos. A solução foi levada a um banho-maria a 70°C por 3 a 5 minutos. Para a observação do resultado, o manejo da rolha de fechamento foi realizado e foi observado se ocorreu o aparecimento de uma fase oleosa.

### **Método “in vitro” para determinação da digestibilidade das proteínas do soro do leite**

Depois da caracterização da amostra foi determinado perfil peptídico da amostra após a digestão gastrointestinal *in vitro*. Foi utilizado o método de Miller modificado por Luten et al.<sup>17</sup> que envolve a simulação da digestão gastrintestinal (gástrica e duodenal), seguida da determinação da proteína dialisável.<sup>16</sup>

#### *Digestão gástrica*

Utilizando um erlenmeyer de 250mL, foi pesado 95g de soro. Para a realização de um branco, foi utilizada a mesma quantidade de água destilada. O pH do soro foi ajustado para 2 com HCl 6M, com constatação após 15 minutos. Caso necessário, o pH era novamente ajustado. Com a estabilização do pH, foi adicionado 3g de uma solução de pepsina (0,48g de pepsina – Sigma – em 3mL de HCl 0,1M) e completado com água até atingir 100g. Os erlenmeyer foram tampados com Parafilm® e incubados à 37°C em banho de água com agitação controlada (140 rev/min) durante 2 horas. Transcorrido este tempo, o digerido gástrico foi colocado em banho de gelo por 10 minutos para cessar a atividade enzimática. Após a obtenção do digerido gástrico, foram coletadas

alíquotas de 20g da amostra para a determinação da acidez, para que em seguida fosse realizada a digestão intestinal.

#### *Determinação da acidez*

Foi determinado o número de equivalentes de NaOH necessários para a obtenção de um pH de 7,5, e em seguida foi adicionado uma solução de pancreatina - extrato biliar, com o intuito de reproduzir as condições intestinais. Para isto, foi pesado 20g do digerido gástrico e adicionou-se 5g da solução de pancreatina - extrato biliar (20mg de pancreatina e 125mg de extrato biliar, em 5mL de  $\text{NaHCO}_3$  0,1M) para posterior homogeneização. O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 0,5M e o volume necessário para esta titulação foi anotado. Transcorridos 30 minutos, a conferência foi realizada e o pH é novamente acertado caso necessário. Na digestão intestinal foi utilizada uma membrana de diálise (tamanho do poro variando entre 12000 a 14000 Da), através da qual se reproduz o processo de difusão. Dessa forma há a simulação da parede intestinal.

#### *Digestão intestinal*

Em cinco béqueres de 250mL, foi pesado 20g do digerido gástrico. Um das amostras foi utilizada como indicativo da acidez titulável. Em seguida foi adicionado, em cada béquer, uma membrana de diálise que contem 25g de uma solução de  $\text{NaHCO}_3$ . Esta solução apresenta os mesmos equivalentes em moles de NaOH utilizados na determinação de acidez. Os béqueres foram tampados com Parafilm® e incubados em banho-maria a 37°C sob agitação de 140 rev/min. por 90 minutos para o início da digestão. Assim que o pH da amostra se aproximou de 5, foi adicionado 5g da

solução de pancreatina - extrato biliar às amostras, e as mesmas foram mantidas a 37°C por mais 2 horas. Transcorrido este tempo, os frascos foram retirados do banho e o pH do digerido intestinal foi medido, e os tubos de diálise foram lavados com água para posterior secagem com papel filtro. Finalmente os tubos de diálise foram pesados e o pH dos dialisados foi medido. As soluções dialisadas foram conservadas a -18°C, em tubos de plástico de 10mL, até o momento em que se procedeu a determinação dos aminoácidos. Após a hidrólise enzimática, foram realizados ensaios para caracterização das amostras.

### **Caracterização da proteína digerida**

Para a caracterização das amostras da digestão *in vitro*, foram realizados os testes de determinação de proteínas e de açúcares redutores já descritos anteriormente, além de alguns testes específicos descritos na seqüência.

#### *Método de McDonald & Chen*

A caracterização dos hidrolisados teve o intuito de estimar o produto de reação liberado pelas proteinases, com a utilização do método de McDonald & Chen.<sup>20</sup> Este método permite estimar baixos níveis de peptídeos e aminoácidos formados na reação. As alíquotas retiradas em diversos intervalos de tempo de reação foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% da solução final (v/v). Após serem mantidas por 12 horas sob refrigeração a 4°C, as misturas foram centrifugadas a 4000 rev. durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com cuidado dos tubos e transferido para Eppendorfs identificados.

À 100 $\mu$ L da solução assim obtida, diluída com 400 $\mu$ L de água, foram adicionados 2,5mL de uma mistura recém preparada, que continha 2% de carbonato de sódio em hidróxido de sódio 0,1N (solução A), 10% de hidróxido de sódio em água destilada (solução B), 1% de sulfato de cobre em água destilada (solução C) e 2,7% de tartarato de sódio e potássio em água destilada (solução D). A mistura foi preparada no momento do uso na proporção de 20mL de solução A; 2,0mL de solução B; 0,2mL de solução C e 0,2mL de solução D. As soluções obtidas, após a adição da mistura, foram mantidas em repouso por 10 minutos para adição de 0,25mL do reagente Folin-Ciocalteau 1N para o desenvolvimento da cor. A mistura do produto de hidrólise (aminoácidos e peptídeos) adicionada dos reagentes de Lowry, deve ter um pH próximo a 10.0 para favorecer o desenvolvimento da cor. As leituras de absorvância foram realizadas em  $\lambda=700\text{nm}$ . A curva de calibração foi realizada utilizando-se tirosina da Riedel-de-Haën como padrão.

#### *Eletroforese em gel de poliacrilamida – Condição desnaturante*

As amostras para as eletroforeses foram preparadas adicionando-se à 150 $\mu$ L de tampão de ruptura, 500 $\mu$ L das alíquotas de diversos estágios da digestão *in vitro*. A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS foi realizada utilizando-se acrilamida a 12%. O tempo de corrida foi de aproximadamente 3 horas em 20 mA. O volume aplicado de cada uma das amostras obtidas pelos ensaios foi de 25 $\mu$ L de alíquotas de cada estágio e 10 $\mu$ L de padrão. A polimerização da acrilamida se iniciou com a adição de persulfato de amônio, e é acelerada pela adição de temed. O composto utilizado para efetuar a dissociação é o detergente iônico SDS. A amostra é desnaturada por aquecimento a

cerca de 100°C, durante 3 minutos, na presença de excesso de SDS e de reagente sulfidrílico ( $\beta$ -mercaptoetanol).

A coloração do gel foi feita com Brilliant Blue G-Coloidal. Utilizou-se como padrão um kit de massa molecular da Amersham Biosciences GE, constituído de fosforilase b (97kDa); soro albumina bovina (66kDa); ovoalbuminabovina (45kDa); anidrase carbônica (30kDa); inibidor de tripsina (20,1kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4kDa).

#### *Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)*

Durante o ensaio foram retiradas amostras no início do processo, após a digestão gástrica e após a digestão intestinal (amostra interna e externa a membrana) para análise em HPLC. Estas amostras foram fervidas por 3 minutos e congeladas para posterior aplicação em HPLC. Alíquotas de 20 $\mu$ L foram injetadas. A análise em HPLC utilizou uma coluna de fase reversa Nucleosil C18 (25 x 0.46 cm; 5  $\mu$ m; 300 Å) com gradiente linear de 5 – 95% do solvente B (ACN e 0.036% TFA) em 30 min, com fluxo 1.0 mL/min e detecção UV em comprimento de onda 220 nm. Os dados gerados pela workstation para posterior análise.

## **RESULTADOS**

O ensaio que avalia a dialisabilidade *in vitro* foi realizado com as proteínas integrais, com o intuito de obter uma padronização e validação do método. Isto possibilitará a utilização desta metodologia em outras amostras.

### *Dosagem de proteínas*

Para que fossem obtidos resultados mais fidedignos, as amostras analisadas foram diluídas vinte vezes. Foram realizados testes antes da digestão *in vitro*, após a primeira etapa da digestão (digestão gástrica), como também do produto que se apresentava no interior e no exterior da membrana de diálise após a digestão intestinal (**Tabela 1**).

### *Dosagem de açúcar redutor*

Utilizando como parâmetro a curva padrão de dosagem de lactose já descrita anteriormente, foi determinada a concentração deste açúcar na amostra antes da digestão. O valor determinado apresentou-se na casa de 1,0 g/L, nos indicando uma redução de 95% da lactose presente no soro do leite.

### *Caracterização do perfil peptídico após a digestão gastrointestinal in vitro*

A análise foi feita com as amostras iniciais, as formadas logo após o término da digestão gástrica e por fim, dos produtos após a digestão intestinal, com a avaliação do conteúdo que se apresentava no interior e exterior da membrana de diálise. A absorção das amostras foi avaliada em  $\lambda=700\text{nm}$ , utilizando como coeficiente de extinção molar o valor de 1,022 (**Tabela 2**).

### *Caracterização das amostras utilizando eletroforese em SDS-PAGE*

A utilização do ensaio de eletroforese teve como objetivo mostrar a separação de moléculas, conforme o tamanho, peso molecular e carga elétrica (**Figura 1**). A metodologia utilizada também indicou o grau de proteólise apresentado pela digestão.

*Caracterização das amostras utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)*

Observando os resultados dos quatro cromatogramas apresentados na **Figura 2**, notamos a seqüência da digestão através da hidrólise das proteínas e a formação de pequenos peptídeos, que é demonstrado pela área da curva apresentada nos gráficos. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é um método bastante fidedigno e sensível na determinação de peptídeos.<sup>10</sup>

## **DISCUSSÃO**

A dosagem de proteínas é um indicativo que auxilia a comprovação da digestão gastrointestinal *in vitro*. Nossos resultados mostram uma diminuição dos valores obtidos durante a digestão *in vitro*. Um dado a ser ressaltado é o valor mais baixo (1,75 g/L) no interior da membrana comprovando que a membrana comporta-se como uma barreira a grandes proteínas igualmente a membrana intestinal humana. Já a dosagem de açúcares reductores antes do início do ensaio que avalia a bioacessibilidade das proteínas do soro do leite é interessante para verificar, antes da utilização das amostras, a quantidade dessa substância que está presente. Isto se faz necessário já que, como citado anteriormente, os açúcares são interferentes na determinação de proteínas.<sup>15</sup> Os açúcares reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo.<sup>28</sup>

Com a observação dos valores das Unidades Totais de aminoácidos, notamos um aumento ao longo da digestão, nos indicando que a hidrólise estava sendo concretizada. Este aumento foi gradual, demonstrando que após a digestão gástrica, este aumento foi de 4 vezes, e de 70% com a digestão intestinal. Mas também é verídico que após a digestão intestinal, notamos que a quantidade absorvida é duas vezes maior do que a

quantidade externa a membrana. A atividade proteolítica é talvez um dos maiores obstáculos na administração oral de proteínas. Isto pode ser explicado pelo fato de estarmos trabalhando com proteínas integrais, que apresentam, *in vivo*, uma absorção de 94 – 98% do total de proteínas quando ingeridas por via oral, sobretudo, por rápida e intensa degradação pré-sistêmica pelas enzimas proteolíticas e por sua permeabilidade intestinal, face à sua elevada massa molecular (MM), sendo a extensão da degradação protéica dependente da estrutura do peptídeo ou proteína.<sup>25</sup>

Os resultados da eletroforese em SDS-PAGE indicaram apenas as proteínas ainda presentes nas amostras, dessa forma, observa-se com o decorrer da digestão o desaparecimento de bandas, principalmente as de mais baixo peso molecular, indicando assim a confirmação da sua hidrólise. São observadas na amostra antes do início da digestão bandas mais nítidas quando comparamos com o estágio após a digestão gástrica. Isto indica a lise que ocorreu por ação das enzimas proteolíticas, diminuindo 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 SDS-PAGE, 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 pelas Unidades Totais de aminoácidos, já descritas anteriormente.

Como descrito por Kananen<sup>13</sup> a utilização da eletroforese SDS-PAGE consegue demonstrar as modificações proteicas que ocorreram durante a digestão, sendo um bom método para a comprovação da hidrólise. No nosso trabalho, ocorreu a redução do número de bandas como também de sua nitidez. Isto também é observado nos ensaios realizados por Mandalari<sup>18</sup> com a diminuição do número de bandas ao longo da digestão gastrointestinal constatando a redução do peso molecular dos componentes avaliados.

Com a técnica de HPLC utilizada no presente trabalho foi notada a eficiência na determinação da concentração de pequenos peptídeos que estavam presentes em cada fase do ensaio. Isto pode ser constatado observando a área da curva apresentada pelos cromatogramas. Os resultados do HPLC demonstrados mostraram que a digestão gastrointestinal *in vitro* promoveu, de forma eficiente, a lise das proteínas. Inicialmente, a amostra continha uma pequena quantidade de peptídeos e esta quantidade recebeu um pequeno aumento após a digestão gástrica realizada pela enzima pepsina (**Figura 2A e 2B**). A pepsina é uma protease que age preferencialmente sobre ligações peptídicas formadas pelo aminogruppo de aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina). Os produtos principais da ação da pepsina são peptídeos grandes e poucos aminoácidos.<sup>25</sup>. Isso explica o leve aumento da área da curva após a digestão gástrica.

Já após a digestão intestinal, há um aumento bastante considerável de pequenos peptídeos, o que é demonstrado pelos valores da área descritos nos cromatogramas (**Figura 2C e 2D**). Um dado bastante relevante e interessante sobre estes dados é a demonstração através dos valores das áreas da curva, da quantidade de pequenos peptídeos no interior e no exterior da membrana. Observamos uma grande diferença quando comparamos estes dois valores. Isso mostra que o método é efetivo para a constatação da dialisabilidade de peptídeos frente a um ensaio que estima *in vitro* a digestão gastrointestinal, nos fornecendo uma prévia para estudos futuros.

De acordo com Mota<sup>21</sup>, a utilização da técnica de HPLC em fase reversa demonstra confiabilidade na detecção de peptídeos após hidrólise, fornecendo dados sobre a extensão hidrolítica. O perfil cromatográfico da degradação e formação de peptídeos pode ser usado como uma impressão digital das enzimas durante o procedimento experimental. Dessa forma, a técnica cromatográfica desenvolvida

demonstrou ser adequada para o estudo do perfil cromatográfico de amostras hidrolisadas. O método de HPLC em fase reversa é preciso, sensível e confiável, sendo um processo que otimiza a separação de componentes do soro do leite. Além disso, estas informações que demonstram a heterogeneidade dos peptídeos podem futuramente ser adicionadas a resultados de outros métodos, como a Espectrometria de Massas.

## **CONCLUSÃO**

Pode-se concluir que os dados quantitativos obtidos pelo método de HPLC em fase reversa apresentam boa concordância com outros métodos (eletroforese SDS-PAGE e método de McDonald & Chen) de análise de proteínas do soro do leite e que o método proposto para padronização realmente estima a dialisabilidade das proteínas do soro do leite, abrindo portas para futuros testes com outras amostras.

## **AGRADECIMENTOS**

Este estudo foi financiado pela FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Auxílio regular à pesquisa, 2008/08252-0), e pela CAPES, na forma de bolsa de estudo.

## **ABSTRACT**

This study aims to determine the *in vitro* digestibility of milk whey proteins, standardizing the characteristics of its bioaccessibility, allowing this fraction to be used in formulations at a functional way. For this, the whey was prepared from milk and B enzyme renin, dialyzed and filtered after the addition of kaolin. The sample obtained was characterized by measurements of protein, reducing sugar and fat. The method of *in*

*in vitro* digestion was performed in two steps: gastric digestion (performed using the enzyme pepsin at pH 2) and intestinal (where we used an enzyme mixture of pancreatin-bile extract at pH 7.5, followed by dialysis for separation of peptides and absorbable amino acids). Aiming to confirm the *in vitro* gastrointestinal digestion and standardize the assay for the study samples, it were used methodologies for measuring the peptides and amino acids, SDS-PAGE and reverse phase HPLC. The results of the three used methods showed a small increase in the degree of hydrolysis of proteins after gastric digestion and the formation of a highly hydrolyzed sample after intestinal digestion, and most of these products are presented within the dialysis membrane, indicating its absorption. Based on the results and limitations of the employed methodology, it is concluded that the method which promotes gastrointestinal *in vitro* digestion actually estimated the digestibility of whey proteins, opening doors for future tests.

**Keywords:** Milk whey, proteins, digestibility, *in vitro*, digestion.

## REFERÊNCIAS

1. AKHAVAN, T.; LUHOVYY, B.L.; BROWN, P.H.; CHO, C.E.; ANDERSON, G.H. Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.91, p.966-75, 2010.
2. ALEXANDER, D.D.; CABANA, M.D. Partially hydrolyzed 100% whey protein infant formula and reduced risk of atopic dermatitis: a meta-analysis. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v.50, p.422-30, 2010.
3. BARÓ, L. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. **Ars.**

**Pharmaceutica**, Granada, v. 42, p. 135-45, 2001.

4. BOUKHETTALA, N.; IBRAHIM, A.; AZIZ, M.; VUICHOUD, J.; SAUDAN, K.Y. et al. A diet containing whey protein, free glutamine, and transforming growth factor-beta ameliorates nutritional outcome and intestinal mucositis during repeated chemotherapeutic challenges in rats. **J. Nutr.**, v.140, p.799-805, 2010.

5. BRANS, G.; SCHROEN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M.; BOOM, R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **J. Membr. Sci.**, v.243, p.263-272, 2004.

6. CHATTERTON, D.E.W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of  $\alpha$ -lactoglobulin and R-lactalbumin: technological implications for processing. **Int. Dairy J.**, v.16, p.1229-1240, 2006.

7. CHEISON, S.C.; WANG, Z.; XU, S.Y. Preparation of whey protein hydrolysates using a single- and two-stage enzymatic membrane reactor and their immunological and antioxidant properties: characterization by multivariate data analysis. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, p. 3896-904, 2007.

8. CRESPO, M.B.V. **Biodisponibilidad de calcio, hierro y cinc en leguminosas mediante ensayos in vitro con cultivos celulares**. 2002. 214p. Tese (Doutorado) – Facultad de Farmacia – Universidad de Valencia, Espanha.

9. DE WIT, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.597-608, 1998.

10. 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.

11. GRIJSPEERDT, K.; HAZARIKA, B.; VUCINIC, D. Application of computational fluid dynamics to model the hydrodynamics of plate heat exchangers for milk fouling.

**J. Food Eng.**, v.57, p.237–242, 2003.

12. 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.

13. KANANEN, A.; SAVOLAINEN, J.; MÄKINEN, J.; PERTTILÄ, U.; MYLLYKOSKI, L. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. **Int. Dairy J.**, v.10, p.691-697, 2000.

14. KRISSENSSEN, G.W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.26, p.713s-23s, 2007.

15. 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.

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

17. LUTEN, J.; CREWS, H.; FLYNN, A.; VAN DAEL, P.; KASTENMAYER, P. et al. 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.

18. MANDALARI, G.; ADEL-PATIENT, K.; BARKHOLT, V.; BARO, C.; BENNETT, L.E. et al. 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.

19. MARSHALL, K. Therapeutic Applications of Whey Protein. **Alt. Med. Review**, v.9, p.136-156, 2004.

20. 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.

21. MOTA, M.V.T.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; OLIVEIRA, M.B.P.; ROCHA, C. et al. Enzymatic Hydrolyses of Whey Protein Concentrates: Peptide HPLC Profiles. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.**, v.27, n.16, p.2625-2639, 2004.

22. POTIER, M.; TOMÉ, D. Comparison of digestibility and quality of intact proteins with their respective hydrolysates. **J. AOAC Int.**, v.91, p.1002-06, 2008.

23. RICHARDS, N.S.P.S. Soro lácteo – Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Rev. Food Ingredients**, Rio Grande do Sul, v. 17, p. 20-27, 2002.

24. ROGNVALDARDOTTIR, N. **Icelandic Food and Cookery**. New York, NY: Hippocrene Books; 2001.

25. SILVA, C.; RIBEIRO, A.; DOMINGOS FERREIRA, F.V. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.38, p.125-141, 2002

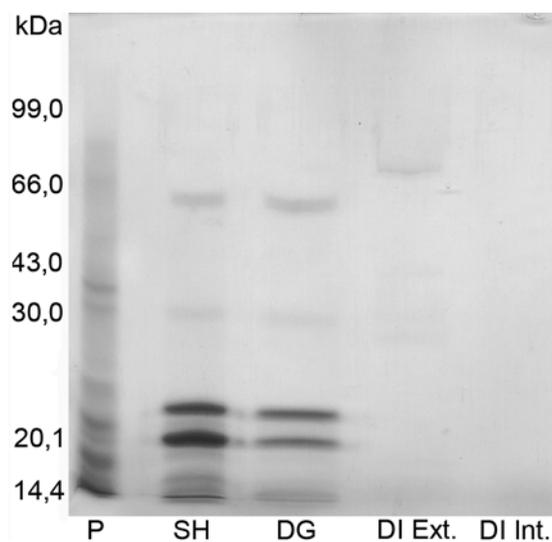
26. WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.42, p.353-375, 2002.

27. YAMADA, M.; MURAKAMI, K.; WALLINGFORD, J.C.; YUKI, Y. Identification

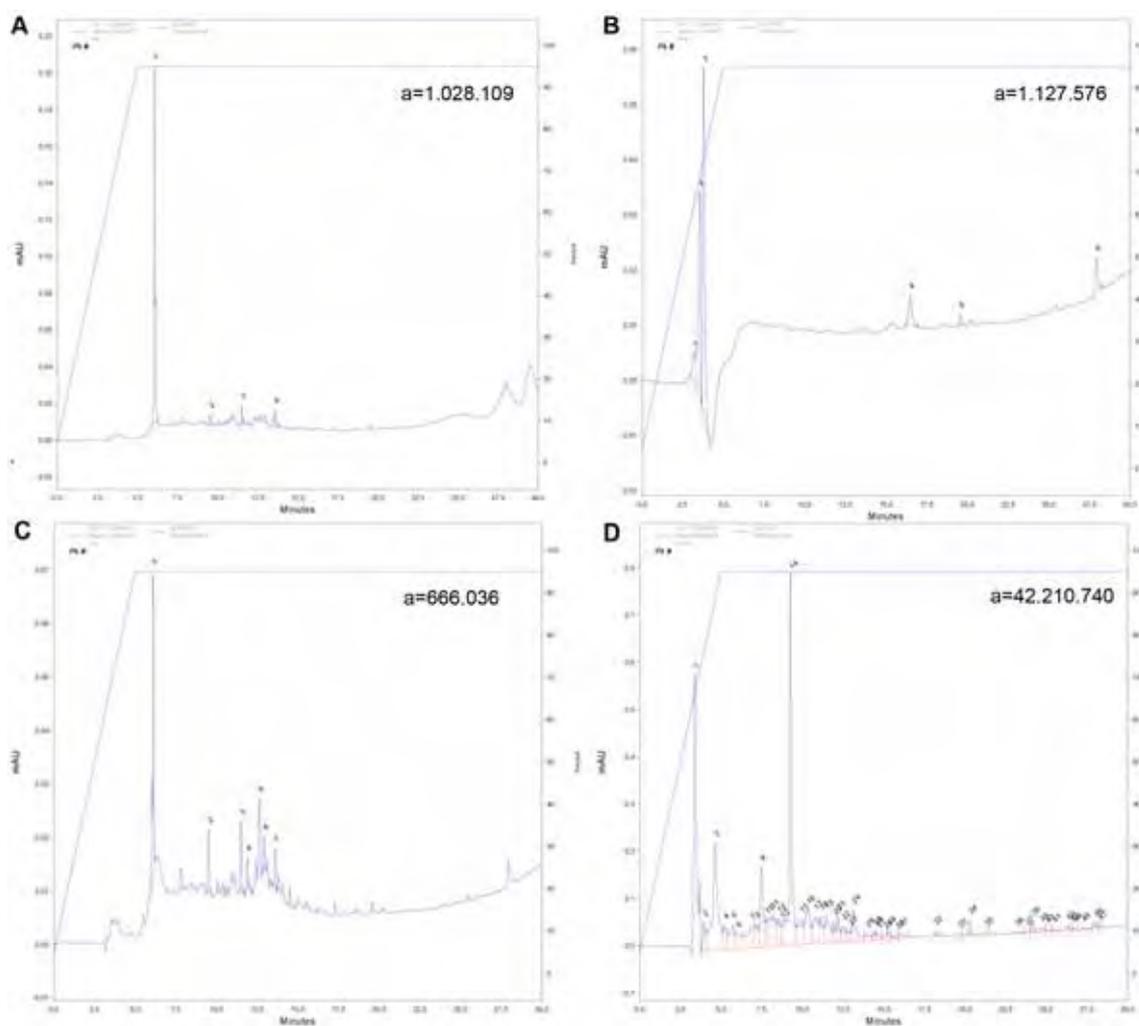
of low-abundance proteins of bovine colostrum and mature milk using two-dimensional electrophoresis followed by microsequencing and mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 23, p.1153–1160, 2002.

28. 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.

## FIGURAS COM LEGENDAS



**Figura 1** - Eletroforese em gel desnaturante das amostras retiradas durante a digestão gastrointestinal: SH= soro sem hidrólise; DG= após a digestão gástrica;  $DI_{ext.}$  = após a digestão intestinal externa a membrana;  $DI_{int.}$  = amostra absorvida – interna a membrana e P= padrão de massa molecular da Amersham pharmacia biotech).



**Figura 2** - HPLC da amostra inicial (SH) em A, após a digestão gástrica (DG) em B, após a digestão intestinal – amostra externa a membrana ( $DI_{ext.}$ ) em C e interna a membrana ( $DI_{int.}$ ) em D ( a indica a área da curva).

## TABELAS COM LEGENDAS

**Tabela 1** - Dosagem de proteínas em diferentes estágios da digestão gastrointestinal *in vitro*.

<i>Amostras de soro (dilução de 20x)</i>	<i>g/L</i>
Soro antes da digestão	5,44
Soro após digestão gástrica	5,45
Soro após digestão intestinal (externo)	4,16
Soro após digestão intestinal (interno)	1,75

**Tabela 2** - Produtos da reação da digestão gastrointestinal *in vitro*.

<i>Amostras de soro</i>	<i>U totais de aa</i>
Soro antes da digestão	0,087
Soro após digestão gástrica	0,368
Soro após digestão intestinal (externo)	0,253
Soro após digestão intestinal (interno)	0,488

1 **Influence of different parameters of reaction on bovine whey protein hydrolysis**  
2 DANIELA P. MARQUES<sup>1\*</sup>, CAROLINA B. SILVEIRA<sup>1</sup>, SAULO S. GARRIDO<sup>2</sup>,  
3 REINALDO MARCHETTO<sup>2</sup> and RUBENS MONTI<sup>1</sup>

4 <sup>1</sup>*Department of Food and Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP- Univ.*  
5 *Estadual Paulista, Rod. Araraquara-Jaú Km 01, 14801-902, Araraquara-SP, Brazil*

6 <sup>2</sup>*Department of Biochemistry and Chemical Technology, Institute of Chemistry- UNESP –*  
7 *Univ. Estadual Paulista, Rod. Araraquara-Jaú Km 01, 14801-970, Araraquara-SP, Brazil.*

8 \*Corresponding author. E-mail: danipmarques@hotmail.com or motiru@fcar.unesp.br

9 RUNNING TITLE: Influence of reaction on whey hydrolysis

10 *Abstract:* Bovine cheese whey proteins have been widely studied because of its high  
11 nutritional value and high pollutant degree that it can take when dispensed in nature without  
12 treatment. The purpose of the present study was to demonstrate if bovine cheese whey protein  
13 hydrolysis is highly influenced by reaction time, temperature, sequence and time of addition  
14 in which the hydrolytic enzymes are used. Four different conditions of reaction were tested. In  
15 all experiments, the longer time (120 minutes) allowed a better degree of hydrolysis when  
16 compared with 40 minutes of reaction and the best catalytic efficiency was achieved at 50 °C.  
17 The priority addition of pepsin followed by the other enzymes used (trypsin, chymotrypsin  
18 and carboxypeptidase-A) in sequence but respecting an interval of 10 minutes between each  
19 enzyme addition, allowed a degree of hydrolysis at least 163 % higher in treatment 4 when  
20 compared with the other three treatments tested.

21 *Keywords:* bovine cheese whey, proteins, hydrolysis, proteolytic enzymes.

## 22 INTRODUCTION

23 Bovine cheese whey, an aqueous greenish-yellow phase that appears after the  
24 separation of the casein coagulated by the action of the enzyme rennin, is a byproduct of  
25 cheese and casein manufacturing in the dairy industry.<sup>1</sup> On average, the world production of  
26 whey grows in proportion to the dairy industry, around 42 % per year.<sup>2</sup> This expansion is  
27 related to the main volume of cheese, casein/caseinates and other dairy products delivered  
28 worldwide, resulting in an increased volume of whey.

29 A comparative analysis shows that approximately 50 % of total milk solids are in the  
30 serum and 20 % of this total consists of protein. Among the most abundant proteins,  $\alpha$ -  
31 lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin have outstanding nutritional value (high content of essential  
32 amino acids), as well as being important providers of bioactive peptides.<sup>3, 4, 5</sup>

33 Bioactive peptides which are inactive while embedded in the amino acid sequence of  
34 the original protein, become active when they are released by enzymatic hydrolysis, which

35 may occur during digestion, milk fermentation or the action of proteolytic enzymes produced  
36 by microorganisms.<sup>6, 7</sup> The industrial enzymatic hydrolysis of proteins is a process of  
37 considerable importance that has been used to improve physical, chemical and functional  
38 properties of foods, without affecting their nutritional value. This process improves the  
39 digestibility and bioactivity of the proteins. Furthermore, the hydrolysis of whey proteins has  
40 been identified as a key process for the recovery of this highly nutritive but polluting waste.<sup>8,</sup>  
41 <sup>9, 10, 11, 12</sup> The properties of bioactive peptides formed in the hydrolytic process depend not  
42 only on the substrate protein and enzyme used, but also on the hydrolysis conditions  
43 (temperature, pH, and reaction time).<sup>13, 14</sup>

44 The choice of proteolytic enzymes is particularly important, because the composition  
45 of the final product is dependent on the specificity and efficacy of the hydrolysis reaction and  
46 consequently on the enzymes employed in the process.<sup>15</sup> In this connection, Schmid & Pool  
47 have tested the action of 14 different enzymes in the hydrolysis of two major whey proteins  
48  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin and demonstrated that the action of the enzymes on these  
49 proteins varies with the medium composition, pH and temperature.

50 The present study presented here aims to determine the best conditions for the  
51 enzymes pepsin, trypsin, chymotrypsin and carboxypeptidase to hydrolyze the greatest  
52 amount of cheese whey proteins.

## 53 EXPERIMENTAL

### 54 *Bovine cheese whey production and analysis of pH, reducing sugar and protein content*

55 Cheese whey prepared according to Marques<sup>16</sup> was analyzed for pH in one equipment  
56 Micronal B374, São Paulo, Brazil. Protein content<sup>17</sup> and reducing sugar<sup>18</sup> were analyzed in a  
57 Ultrospec 3100 pro- Amershan Biosciences- USA.

### 58 *Hydrolytic enzymes*

59 Stock solutions 0.5 mg mL<sup>-1</sup> of Pepsin (EC 3.4.23.1-1290 units mg<sup>-1</sup> protein),  
60 chymotrypsin (EC 3.4.21.1-55 units mg<sup>-1</sup> protein) and trypsin (EC 3.4.21.4-1300 of BAEE  
61 units mg<sup>-1</sup> solid) were prepared. Carboxypeptidase-A (EC 3.4.17.1-50 units mg<sup>-1</sup> protein) was  
62 prepared at a concentration of 0.025  $\mu$ L mL<sup>-1</sup>. All enzymes were diluted in deionized water  
63 and purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

### 64 *Cheese whey hydrolysis*

65 Whey protein (6 mg mL<sup>-1</sup> protein) was subjected to four hydrolysis treatments. Under  
66 treatments 1 and 2, whey protein was buffered with 1 % ascorbic acid to final pH 3.0. The  
67 temperature of hydrolysis was set at 37 °C in treatment 1 and 50 °C in treatment 2. At the start  
68 pepsin was added at a ratio of 0.066  $\mu$ L mL<sup>-1</sup>. After 20 minutes of reaction, the pH was

69 adjusted to 9.5 with 0.1 mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide and the enzymes trypsin, chymotrypsin and  
70 carboxypeptidase-A were added in sequence with no intervals of time at the same volume  
71 ratio as the pepsin. After 40 minutes of reaction a sample was taken of each experiment. The  
72 hydrolysis reaction was maintained until total of 120 minutes. Treatments 3 and 4 followed  
73 the same temperature pattern as in 1 and 2, respectively. The main difference was that after  
74 buffering to pH 9.5, the other enzymes were added in sequence at 10 minute intervals: trypsin  
75 at 30 minutes, chymotrypsin at 40 minutes and carboxypeptidase at 50 minutes of reaction. A  
76 sample was taken immediately after chymotrypsin addition.

#### 77 *Characterization of hydrolysates: Amino acid content and peptides HPLC analysis*

78 Under all treatments, samples were taken at final 120 minutes of reaction to estimate  
79 the total amount of amino acids released by hydrolysis<sup>19</sup> and peptide contents (High-  
80 performance liquid chromatography (HPLC)). Analytical HPLC was carried out on a  
81 Shimadzu LC 10A (Kyoto, Japan) apparatus. Data generated by the workstation were treated  
82 in Origin 5.0 to obtain the chromatograms.

#### 83 *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS- PAGE)*

84 At several time intervals (10, 20, 40, 60, 90 and 120 minutes), aliquots of 200 µL were  
85 removed from the enzymatic assay. Sample preparation buffer (Tris-glycine, glycerol, SDS,  
86 β-ME and bromophenol blue) was added. After one minute at 100 °C, the samples were  
87 stored at 4 °C until electrophoresis. SDS-polyacrylamide (12 % w/v) electrophoresis was  
88 performed based on the Laemmli method.<sup>20</sup> Samples of 25 µL were added to wells and  
89 running time was 2 h at 40 mA, with 10 µL of a standard molecular weight ladder (Amersham  
90 Biosciences GE), consisting of phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa),  
91 ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α-  
92 lactalbumin (14.4 kDa). The gel was stained with colloidal Brilliant Blue G.<sup>21</sup>

#### 93 *Statistical analysis*

94 Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5 version program (GraphPad  
95 Software Inc., La Jolla, USA). Analysis of ANOVA variance and Tukey test were performed  
96 to detect differences between total Uaa per 40 or 120 minutes. The significance level used  
97 was 0.05.

## 98 RESULTS AND DISCUSSION

### 99 *Analysis of amino acid content*

100 As shown in Table I, the total amount of amino acids released in all four treatments increased  
101 between 40 and 120 min approximately 500 % in treatment 1, 470 % in treatment 2, 127 % in  
102 treatment 3, and 113 % in treatment 4. These values demonstrate that there was an appreciable

103 variation in the rate of whey protein hydrolysis among the treatments and over the course of  
104 the experiment. Analyzing the values obtained at 120 min reaction time, it is seen that, under  
105 the same conditions but at different temperatures, better efficiency was achieved in treatment  
106 4 at 50 °C. Experiments 3 and 4 achieved the best catalytic efficiency in the first 40 minutes  
107 of reaction, possibly due to the addition of the enzymes separately (at pH 9.5). Pepsin and  
108 trypsin are endopeptidases. Each enzyme is specific for different amino acids residues then,  
109 when they are used separately, they can do their work well. Probably when the enzymes are  
110 putted together, one enzyme can hydrolyze another and then this enzyme loss specificity and  
111 can not hydrolyze whey proteins.

#### 112 *HPLC and SDS-PAGE analysis of whey proteins after various enzymatic treatments*

113 Figures 1 and 2 display the results for bovine cheese whey protein hydrolysis  
114 (treatment 1), analyzed by HPLC and SDS-PAGE, respectively. Under huge hydrolytic  
115 conditions, SDS-PAGE (Fig. 2) revealed that some protein bands did not disappear  
116 completely. The HPLC analysis (Fig. 1) confirmed this. Peaks attributed to small proteins can  
117 be observed with retention times up to approximately 25 minutes. Thus, hydrolysis was not  
118 complete under these conditions.

119 Figures 3 (HPLC) and 4 (SDS-PAGE) display the results for the products of whey protein  
120 hydrolysis obtained in treatment 2 (see Methods). Catalytic efficiency under these conditions  
121 was better than in treatment 1 (Figs. 1 and 2). After the first 15 minutes of reaction, the  
122 hydrolyzed proteins were not detected and protein bands did not appear (Fig. 4). However,  
123 Figure 3 show several peaks at lower retention times, indicating that there were still peptides  
124 in these samples. Moreover some have hydrophobic features exposed in the aqueous  
125 environment by the hydrolytic cleavage increasing their interaction with the reversed-phase  
126 matrix. Bound proteins, under typical conditions, are desorbed from the reversed-phase gel  
127 matrix by lowering the polarity of the mobile phase, with higher retention times than those of  
128 small peptides, which generally are in a random coil state. The better chromatographic  
129 resolution observed in Figure 3 indicates a more efficient enzymatic hydrolysis after 120  
130 minutes. The results obtained in treatment 1 corroborate with these findings.

131 The results obtained from treatments 3 and 4, which differ only in the temperature of  
132 hydrolysis, are displayed in Figures 5 and 6 (treatment 4) as well as 7 and 8 (treatment 5). The  
133 whey protein hydrolysis was most effective when the enzyme assayed was at 50 °C for 120  
134 minutes. The total amino acid results (Table I) confirm these.

135

## CONCLUSION

136 Cheese whey protein hydrolysis was more efficient at 50 °C and when hydrolytic enzymes  
 137 were added in sequence at 10 minute intervals (treatment 4) (Fig. 2). Regarding the time of  
 138 exposure of substrate to the enzymes, the best catalytic efficiency was achieved at 120  
 139 minutes, irrespective of the conditions. Treatments 3 and 4 were the most appropriate for  
 140 whey protein hydrolysis, because they resulted in a smaller amount of low molecular weight  
 141 peptides and no protein as end-products. Total hydrolysis of the whey proteins was not  
 142 possible in any of the treatments employed. However, the significantly higher catalytic  
 143 efficiency, in treatments 3 and 4, may have resulted in a mix of free amino acids and small  
 144 peptides with appreciable nutritional value.

145 *Acknowledgments.* D. P. Marques and C. B. Silveira are grateful to the Brazilian  
 146 research fostering agency CAPES. R. Monti was supported by a research grant from FAPESP,  
 147 FUNDUNESP and PAD-FCFAR. R. Marchetto and R. Monti are Research Fellows of CNPq.

#### 148 REFERENCES

- 149 1. G. W. Smithers, *Int. Dairy J.* **18** (2008) 695.
- 150 2. FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations,  
 151 [www.fao.org/docrep/004/x6512e/X6512E09.htm](http://www.fao.org/docrep/004/x6512e/X6512E09.htm), (22/10/2009)
- 152 3. D.A. Clare, H.E. Swaisgood, *J. Dairy Sci.* **83** (2000) 1187.
- 153 4. A. Pihlanto- Leppala, T. Rokka, H. Korhonen, *Int. Dairy J.* **8** (1998) 325.
- 154 5. N.P. Shah, *Braz. J. Nutr.* **84** (2000) S3.
- 155 6. E.A. Foegeding, J.P. Davis, D. Doucet, M.K. McGuffey, *Trends Food Sci. Technol.* **13**  
 156 (2002) 151.
- 157 7. A. Pihlanto, H. Korhonen, *Int. Dairy J.* **16** (2006) 945.
- 158 8. J.C. Monti, R. Jost, *Biotechnol. Bioeng.* **20** (1978) 1173.
- 159 9. J.C. Monti, R. Jost, *Lait* **62** (1982) 521.
- 160 10. A. Guadix, E.M. Guadix, M.P. Páez- Dueñas, P González- Tello, F. Camacho, *ARS*  
 161 *Pharm.* **41** (2000) 79.
- 162 11. C.M. Galvão, A.F.S. Silva, M.F. Custódio, R. Monti, R.L.C Giordano, *Appl. Biochem.*  
 163 *Biotechnol.* **91** (2001) 761.
- 164 12. M.F. Custódio, A.J. Goulart, D.P. Marques, R.C. Giordano, R.L.C. Giordano, R. Monti,  
 165 *Rev. Aliment. Nutr.* **16** (2005) 105.
- 166 13. L. Baró, J. Jiménez, A. Martínez- Férez, J.J. Bouza, *ARS Phar.* **42** (2001) 135.
- 167 14. J.D. Block, M. Merchiers, L. Mortier, A. Braekman, W. Ooghe, R. V. Renterghem, *Int*  
 168 *Dairy J.* **13** (2003) 87.
- 169 15. D. G. Schmid, J.K. Pool, *Milk Dairy J.* **45** (1991) 225.

- 170 16. D.P. Marques, D.P. *Produção e aplicação de hidrolisado de proteínas do soro de queijo*  
171 *bovino no preparo de suplemento nutricional: minimização da sarcopenia em ratos idosos.*  
172 Doctor Thesis in *Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Univ. Estadual Paulista, Brazil*  
173 (2009), p. 125.
- 174 17. E.F. Hartree, *Anal. Biochem.* **48** (1972) 422.
- 175 18. G.L. Miller, *Anal. Chem.* **31** (1959) 426.
- 176 19. C.E. McDonald, L.L Chen, *Anal. Biochem.* **10** (1965) 175.
- 177 20. U.K. LAEMLLI, *Nat.* **227** (1970) 680.
- 178 21. V. Neuhoff, R. Stamm, H. Eibl, *Electrophoresis*, **9** (1998) 255.
- 179
- 180
- 181
- 182
- 183
- 184
- 185
- 186
- 187
- 188
- 189
- 190
- 191
- 192
- 193
- 194
- 195
- 196
- 197
- 198
- 199
- 200
- 201
- 202

203 TABLE I. Total Units of Amino acid (aa) released after bovine whey protein hydrolysis by  
 204 four different enzymatic assays.

Assays	Total Uaa	Total Uaa
	( $\mu\text{mmols amino acid mg prot}^{-1}$ ) per 40 min	( $\mu\text{mols amino acid mg prot}^{-1}$ ) per 120 min
<b>Treatment 1</b> <sup>aa</sup>	0.19 $\pm$ 0.011 a	0.95 $\pm$ 0.012 a
<b>Treatment 2</b> <sup>bb</sup>	0.27 $\pm$ 0.019 b	1.27 $\pm$ 0.018 b
<b>Treatment 3</b> <sup>aa</sup>	1.22 $\pm$ 0.030 c	1.56 $\pm$ 0.012 c
<b>Treatment 4</b> <sup>bb</sup>	2.24 $\pm$ 0.046 d	2.55 $\pm$ 0.010 d

205 <sup>aa</sup> Treatments performed at 37 °C.

206 <sup>bb</sup> Treatments performed at 50 °C.

207 Values are given as mean  $\pm$  standard deviation: values with different letter in column are significantly  
 208 different ( $p < 0.05$ ).

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

## FIGURE CAPTIONS

- 227
- 228 Fig. 1. Treatment 1: whey hydrolysis product analyzed by HPLC at 120 min.
- 229 Fig. 2. Electrophoresis of whey hydrolysis products (treatment 1) at 10, 20, 40, 60, 90 and 120
- 230 min. of reaction. P: protein standart ladder (GE: 99-14.4 Kg mol<sup>-1</sup>).
- 231 Fig. 3. Treatment 2: whey hydrolysis product analyzed by HPLC at 120 min.
- 232 Fig. 4. Electrophoresis of whey hydrolysis products (treatment 2) at 10, 20, 40, 60, 90 and 120
- 233 min of reaction. P: protein standart ladder (GE: 99-14.4 Kg mol<sup>-1</sup>).
- 234 Fig. 5. Treatment 3: whey hydrolysis product analyzed by HPLC at 120 min.
- 235 Fig. 6. Electrophoresis of whey hydrolysis products (treatment 3) at 10, 20, 40, 60, 90 and 120
- 236 min of reaction. P: protein standart ladder (GE: 99-14.4 Kg mol<sup>-1</sup>).
- 237 Fig 7. Treatment 4: whey hydrolysis product analyzed by HPLC at 120 min.
- 238 Fig. 8. Electrophoresis of whey hydrolysis products (treatment 5) at 10, 20, 40, 60, 90 and 120
- 239 min of reaction. P: protein standart ladder (GE: 99-14.4 Kg mol<sup>-1</sup>).
- 240
- 241
- 242
- 243
- 244
- 245
- 246
- 247
- 248
- 249
- 250
- 251
- 252
- 253
- 254
- 255
- 256

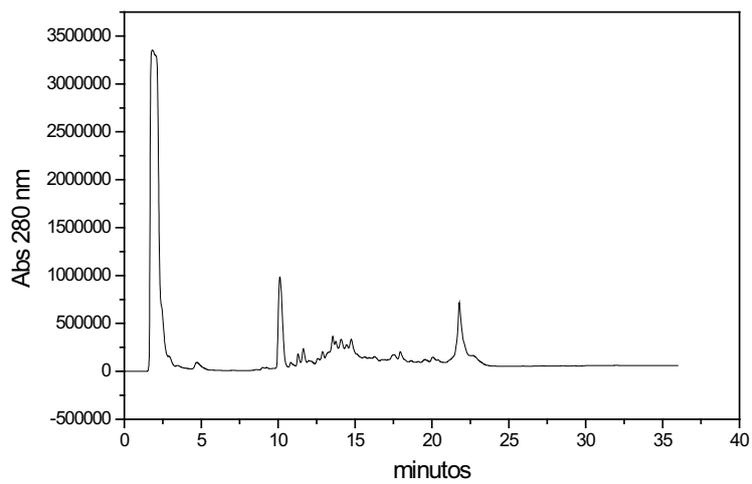


Fig.1.

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

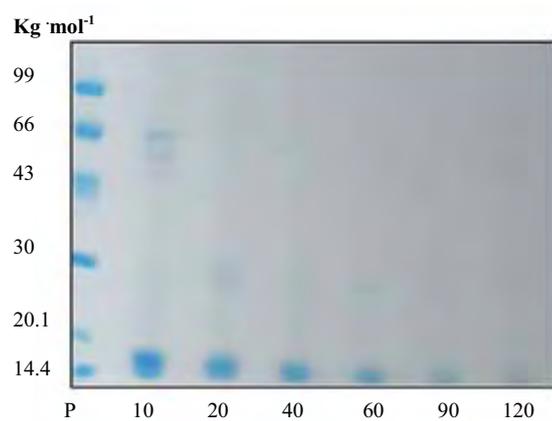


Fig.2.

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

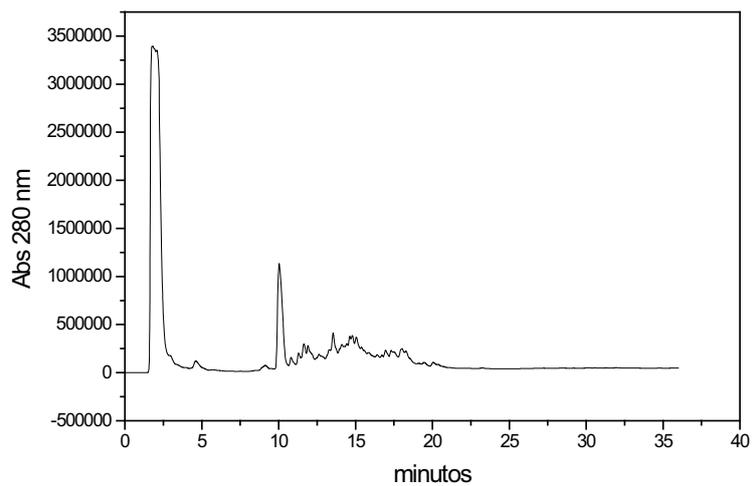


Fig.3.

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

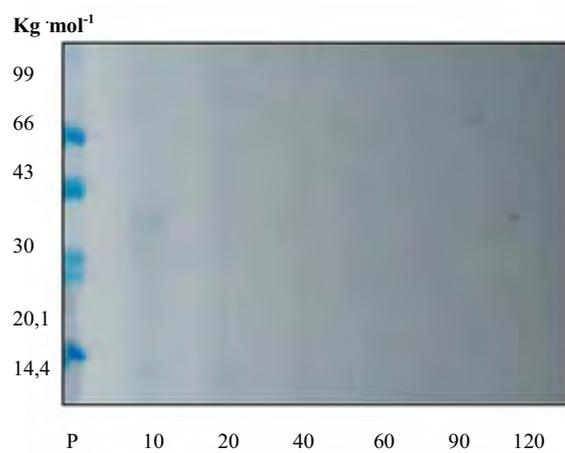
328

329

330

331

332



333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

Fig 4.

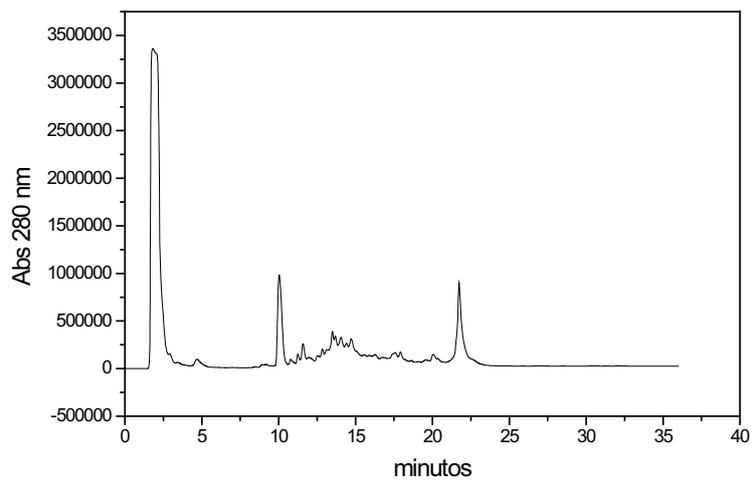


Fig.5.

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

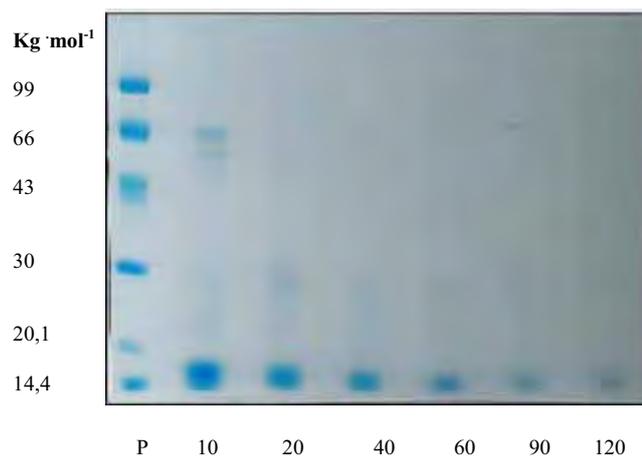


Fig. 6.

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

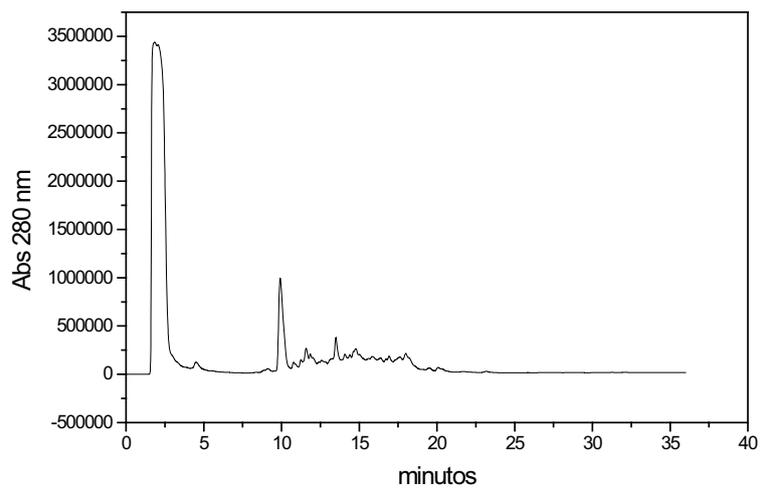


Fig. 7.

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

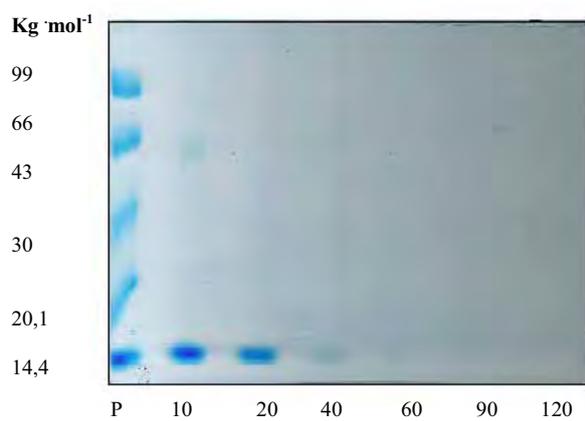
429

430

431

432

433



434

435

Fig. 8.

436