

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

**PROPRIEDADES IMUNOESTIMULATÓRIAS E ANTITUMORAL DE  
CONCENTRADOS PROTÉICOS DE SORO DE LEITE BOVINO, DE  
CASEÍNA E DE UM ISOLADO PROTÉICO DE SOJA**

**Nádia Fátima Gibrim Pereira Dias**

**Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição

Campinas, SP

2004

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

D543p Dias, Nádia Fátima Gibrim Pereira  
Propriedades imunoestimulatórias e antitumoral de  
concentrados protéicos de soro de leite bovino, de caseínas e de  
um isolado protéico de soja / Nádia Fátima Gibrim Pereira Dias.  
– Campinas, SP: [s.n.], 2004.

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

1.Soro de leite. 2.Células. 3.Camundongos. I.Sgarbieri,  
Valdemiro Carlos. II.Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri (Presidente)  
Universidade Estadual de Campinas

---

Prof. Dr Jaime Amaya Farfan  
Universidade Estadual de Campinas

---

Prof. Dr. Gilberto Paixão Rosado  
Universidade Federal de Viçosa

---

Prof. Dr. Célio K. MIYASAKA  
Universidade Estadual de Campinas

---

Dra. Alda Luiza S. Lerayer  
Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas.

---

Prof. Dra. Flávia Maria Neto  
Universidade Estadual de Campinas

---

Dra. Vera Lúcia Signoreli Baldini  
Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas

*Os inspirados, os criadores de ordens religiosas, os fundadores de linhagens, os grandes iniciados, os videntes e os poetas foram livres exploradores, investigadores da alma humana, inventores de mundos tomados por uma paixão absolutamente autêntica. Não nos cabe atingir seus objetivos nem tampouco reproduzir seus resultados. Cabe-nos, sim, despertar em nós mesmos a febre de verdade e de amor que os animava.*

*Pierre Lévy*

*Ao Prof. Sgarbieri, meu eterno mestre, exemplo de conduta pessoal e científica  
e minha grande inspiração;*

*Às minhas filhas Gabriela, Isabela e Rafaela, eterna motivação e razão  
de toda a luta;*

*À Helaine, amiga e irmã a quem devo grande parte deste trabalho;*

*A Deus, presença constante em minha vida,*

*Dedico*

À Verinha, amiga de todas as horas e exemplo de profissional, por estar sempre presente em todas as etapas desse trabalho;

À Helaine, amiga sincera e companheira de lutas e PFCs, por jamais me deixar desanimar, fazendo-me acreditar que seria possível vencer mais essa etapa;

Ao Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel, pela enorme e imprescindível ajuda durante todo este trabalho;

À Cristina Tanikawa, sempre presente aos inúmeros ensaios biológicos e incontáveis PFCs, pela amizade e preciosa ajuda;

À Ana Maria Rauen, pelo apoio, confiança e ajuda incondicionais.

*Meus mais sinceros agradecimentos!*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação sempre segura e dedicada.

Ao Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel, pela solicitude, ajuda e ensinamentos, indispensáveis.

Ao Programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Ao Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada – QUÍMICA e ao Centro de Hortifrutículas, FRUTOTEC e ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios, TECNOLAT do ITAL onde foram desenvolvidos os experimentos desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro por meio do projeto temático, coordenado pelo Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela concessão da bolsa que permitiu que este trabalho se realizasse.

Aos membros da Banca Examinadora pelas contribuições e sugestões a esta tese.

Aos pesquisadores do ITAL Vera Lúcia, Ana Maria Rauen, Ercília, Dalmo, Elza, Alda, Dilza, Flávio, Leonardo, Marcelo e Paulo pela amizade e apoio.

Aos amigos Margareth e Clodoaldo pela amizade, apoio e ajuda incondicionais durante todos esses anos.

Aos Srs. Cosme e Marcelo da Secretaria de Pós-Graduação – FEA, pela amizade e pronto atendimento todas as vezes que necessitei.

Ao amigo Luiz Renato, pela eterna boa vontade e grande auxílio no biotério.

À Patrícia, Eloísa, Izabela, Tereza, Carol, Elke, Flávia, Janesca, Denise, Saula, Márjorie, Leonídia e Leonice, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do DEPAN, em especial ao Chico, Suzana, Eliete, Fátima, Karla, Soely, Cidinha e Yara, pela grande ajuda durante todos esses anos.

À Sandra, Luzimara, Cecília e Tatiane pela ajuda, apoio, amizade e grande paciência.

À Beth Lima, Beth Gomes, Kátia, Eliana, Renatinho, José Rubens, Aparecido, Kinu, Sr. João e Carlos Eduardo, pela colaboração na execução dos experimentos.

Aos professores e funcionários da Microbiologia e Imunologia do Departamento de Biologia da UNICAMP, em especial à Dirce e ao Prof. Paulo, pela amizade e grande ajuda.

Ao Sr. Atílio e à Cidinha, por permitirem que fizéssemos parte integrante de sua família.

Ao amigo Eloy, a quem devo meu amor à pesquisa.

A todos, que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para que este trabalho se efetivasse.

*Muito obrigada!*

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xvi
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xx
<b>RESUMO GERAL</b> .....	xxii
<b>GENERAL SUMMARY</b> .....	xxii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	01
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1.1 REVISÃO DE LITERATURA: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, NUTRITIVAS E FISIOLÓGICAS DAS PROTEÍNAS DE LEITE BOVINO E DA SOJA:.....	04
1.1 Proteínas do leite .....	04
1.2 Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite bovino .....	05
Tecnologias de membranas .....	06
1.3 Proteínas de soro de leite bovino .....	09
Propriedades físico-químicas .....	09
Propriedades nutritivas .....	10
Propriedades funcionais tecnológicas .....	10
Propriedades funcionais fisiológicas .....	12
1.4 Caseínas .....	23
Propriedades físico-químicas .....	23
Propriedades nutritivas .....	25
Propriedades funcionais tecnológicas .....	25

Propriedades funcionais fisiológicas .....	26
1.5 Proteínas de soja .....	27
Propriedades físico-químicas .....	28
Propriedades nutritivas.....	30
Propriedades funcionais tecnológicas .....	31
Propriedades funcionais fisiológicas .....	33
1.6 Proteínas do leite e da soja como ingrediente de alimentos fisiologicamente funcionais .....	39
1.7 Referências bibliográficas.....	42
<b>CAPÍTULO 2</b>	
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CONCENTRADOS PROTÉICOS DE LEITE BOVINO .....	65
RESUMO .....	65
2.1 INTRODUÇÃO .....	65
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	68
2.2.1 Matéria-prima .....	68
2.2.2 Produção de concentrado protéico de soro doce (CSD) e coágulo de caseína (CoC), concentrado protéico de soro ácido (CSA) e caseinato de sódio (CNa) .....	68
2.2.3 Caracterização dos concentrados protéicos desidratados.....	75
Composição centesimal.....	75
Determinação de aminoácidos.....	75
Escore de aminoácidos essenciais (EAE) .....	75
Solubilidade .....	76
Análises microbiológicas .....	76

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	77
2.4 CONCLUSÕES .....	83
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86
<b>CAPÍTULO 3</b>	
PROPRIEDADE IMUNOESTIMULANTE: METODOLOGIA DE ESTUDO .....	88
RESUMO .....	88
3.1 INTRODUÇÃO .....	88
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	90
3.2.1 Materiais .....	90
3.2.2 Ensaio biológico.....	91
Animais de experimentação.....	91
Dietas utilizadas.....	92
Ganho de peso.....	98
Teste imunológico para verificação de células formadoras de placas IgM (CFP) .....	98
3.2.3 Análises estatísticas .....	98
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	98
3.4 CONCLUSÃO .....	106
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
<b>CAPÍTULO 4</b>	
PROPRIEDADE ANTITUMORAL: METODOLOGIA DE ESTUDO E MONITORAMENTO .....	110
RESUMO.....	110

4.1 INTRODUÇÃO .....	111
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	114
4.2.1 Composição química da fonte protéica .....	114
4.2.2 Ensaio biológico com camundongos .....	115
Dietas experimentais.....	116
Indução de câncer .....	119
Monitoramento .....	119
4.2.3 Análises estatísticas .....	120
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	123
4.3.1 Caracterização do material utilizado em ensaio biológico .....	123
4.3.2 Crescimento dos animais .....	126
4.3.3 Criptas aberrantes .....	127
4.3.4 Testes imunológicos .....	130
4.3.5 Dosagens de glutatona (GSH) .....	132
4.3.6 Quantificação dos tumores .....	134
4.4 CONCLUSÃO.....	140
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
CONCLUSÃO GERAL .....	147
ANEXO .....	148

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO 2</b>	Pág.
Tabela 1 - Composição centesimal aproximada e valores de solubilidade (média $\pm$ desvio da média) em base seca, apresentados por proteínas de leite bovino .....	79
Tabela 2 - Perfil de aminoácidos essenciais (g/100g de proteína) e escore químico (EAE) de concentrados protéicos obtidos de leite bovino .....	80
Tabela 3 - Perfil microbiológico de alguns lotes de concentrado protéico de soro doce, desidratados por liofilização produzidos na planta piloto do ITAL, Campinas .....	82
Tabela 4 - Efeitos de irradiação (raios $\gamma$ ), nas doses de 3,0, 5,0, 7,5 e 10 KGy, no perfil microbiológico do lote 142/00 do CSD liofilizado....	83
<b>CAPÍTULO 3</b>	
Tabela 1 - Formulações de dietas semi-purificadas e a referência AIN-93G, utilizadas por camundongos das linhagens Swiss, C <sub>57</sub> Bl/6, Balb C e A/J para verificação da resposta imune humoral.....	94
Tabela 2 - Composição centesimal aproximada (média $\pm$ desvio padrão), em base seca, dos concentrados protéicos de soro de leite bovino, caseína comercial e isolado protéico de soja.....	99
<b>CAPÍTULO 4</b>	
Tabela 1 - Composição das misturas mineral e vitamínica, recomendadas para roedores segundo a AIN-76, utilizadas nas formulações nas proporções de 35 e 10g, respectivamente.....	120

Tabela 2 - Composição de dietas semi-purificadas e a referência AIN-76A (AIN, 1977), utilizadas para ensaio de indução de câncer de cólon intestinal, em fêmeas de camundongos da linhagem A/J. Tratamentos: CSD (concentrado protéico de soro doce); IM (Immunocal™); CC (caseína comercial); IPS (isolado protéico de soja).....	120
Tabela 3 - Composição centesimal aproximada (g/100g) em base seca de fontes protéicas utilizadas no preparo de dietas em ensaios com camundongos para indução de câncer.....	126
Tabela 4 - Perfil de aminoácidos e escore de aminoácidos essenciais (EAE), com base no perfil teórico da FAO/WHO (crianças de 2 a 5 anos de idade), de fontes protéicas utilizadas no preparo de dietas para ensaio de indução de câncer, em camundongos.....	128
Tabela 5 - Evolução de peso (média $\pm$ desvio padrão) apresentada por fêmeas de camundongos da linhagem A/J submetidos à dieta com 20% de proteína durante 32 semanas e injetados com azoximetano (5mg/kg de peso corpóreo semanalmente, por 6 semanas).....	124
Tabela 6 - Incidência de focos de criptas aberrantes – FCA (média $\pm$ desvio padrão) na mucosa intestinal de fêmeas de camundongos da linhagem A/J, injetadas durante 6 semanas consecutivas com 5mg/kg de peso corpóreo de azoximetano e alimentados com dietas contendo 20% de proteína de diferentes fontes .....	132
Tabela 7 - Resultados de testes de células formadoras de placas - CFP (média $\pm$ desvio padrão) efetuados com fêmeas de camundongos da linhagem A/J, injetados com 5mg/kg de peso	

	corpóreo (6 semanas consecutivas) e submetidos a dietas com diferentes fontes de proteínas.....	134
Tabela 8 -	Concentrações de glutathiona (média $\pm$ desvio padrão) medidas em fígados de camundongos da linhagem A/J, estando por 4 semanas em dietas e após serem injetados com 5mg/kg de peso corpóreo (6 semanas consecutivas) de AOM e submetidos a dietas com diferentes fontes de proteínas.....	137
Tabela 9 -	Incidência de tumores de cólon (média $\pm$ desvio padrão) 80 fêmeas de camundongos da linhagem A/J (n = 60) injetadas durante 6 semanas consecutivas com 5mg/kg de peso corpóreo de azoximetano, e mantidas em dietas contendo 20% de proteína de diferentes fontes .....	138

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 2</b>	Pág.
Figura 1 - Processo de obtenção do coágulo de caseína desidratado (CoC), caseinato de sódio – CNa; concentrado protéico de soro doce - CSD e concentrado protéico de soro ácido – CSA.....	70
Figura 2 - Etapas do processamento para obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e de caseínas: A, verificação da temperatura antes do aquecimento; B, aquecimento do leite até 32°C para coagulação; C, coagulação enzimática (soro doce); D, coagulação ácida (soro ácido).....	72
Figura 3 - Materiais resultantes de processamento para obtenção de concentrados protéicos de soro doce e caseína: A, retentado de soro doce; B, coágulo de caseína.....	73
Figura 4 - Equipamentos e membranas utilizados no processamento de concentrados protéicos de soro e de caseína: A, equipamento de concentração WGM; B, conjunto de membranas; C, "spray dryer" marca Niro Atomizer; D, Liofilizador marca Stokes.....	74
Figura 5 - Câmara fria (marca Kit Frigor) utilizada para congelamento a -20°C dos concentrados protéicos de soro para liofilização.....	75
<b>CAPÍTULO 3</b>	
Figura 1 - Ensaio imunológico efetuado com camundongos machos submetidos a dietas com 20% de caseína.....	95
Figura 2 - Ensaio imunológico efetuado com camundongos machos isogênicos submetidos a dietas com diferentes fontes de proteínas e caseína, os concentrados protéicos de soro doce	

	proteínas, a saber: os concentrados protéicos de soro doce (CSD-L, CSD-S e IM), caseína comercial (CC) e isolado protéico de soja (IPS).....	96
Figura 3 -	Ensaio imunológico efetuado com camundongos machos isogênicos, recebendo dietas com 20% de proteínas mantidos em ambiente normal e em isolador. Tratamentos: CC, caseína comercial; CSD-L, concentrado protéico de soro doce liofilizado.....	97
Figura 4 -	Ensaio imunológico efetuado com camundongos machos isogênicos, recebendo dietas com 20% de proteínas. Tratamentos: CSD-L (concentrado protéico de soro doce liofilizado), CSD-L3 e CSD-L5 (concentrados protéicos de soro doce liofilizados e irradiados com doses de 3 e 5kgy).....	98
Figura 5 -	Resposta imune humoral observada em camundongos de quatro linhagens, alimentados durante 21 dias com dieta contendo 20% de proteína. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).....	103
Figura 6 -	Resposta imune humoral observada em camundongos alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteína, a saber: IM, imunocal; CSD-L (concentrado protéico de soro de leite liofilizado); CSD-S (CSD seco em “spray dryer”); CC (caseína comercial) e IPS (isolado protéico de soja). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).....	105
Figura 7 -	Resposta imune humoral observada em camundongos alimentados (caseína comercial) e CSD (concentrado protéico de soro de leite liofilizado). CSDI e CCI foram mantidos em isolador. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).....	106

Figura 8 -	Resposta imune humoral observada em camundongos da linhagem A/J alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteína, a saber: CSD-L (concentrado protéico de soro doce liofilizado); CSD-L3 (irradiado com 3kgy) e CSD-L5 (irradiado com 5kgy). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).....	108
------------	--	-----

#### **CAPÍTULO 4**

Figura 1 -	Protocolo experimental para ensaio de indução de câncer efetuado com fêmeas de camundongos da linhagem A/J. Tratamentos: CSD (concentrado protéico de soro doce); IM (Immunocal <sup>TM</sup> ); CC (caseína comercial); IPS (isolado protéico de soja) .....	118
Figura 2 -	Representação esquemática do ensaio biológico para indução de câncer de cólon intestinal .....	124
Figura 3 -	Representação esquemática das análises efetuadas no ensaio biológico de indução de câncer de cólon. Tempos nos quais foram efetuadas as imunizações: 4, 20-22 e 30-32 semanas em ensaio .....	125
Figura 4 -	Segmento de cólon de camundongo da linhagem A/J corado com azul de metileno. Setas apontam focos de criptas aberrantes (FCA) contrastando com a mucosa normal (MN).....	131
Figura 5 -	Camundongos A/J utilizados em ensaio: A - animal sadio; B – animal apresentando sinais característicos do desenvolvimento da doença (perdas de peso, falhas na pelagem e olhos opacos)..	135
Figura 6 -	Correlações lineares entre os resultados de CFP (células formadoras de placas) e glutathiona obtidos com fêmeas de camundongos da linhagem A/J, em dois tempos distintos ( $T_1 = 4$	

	semanas e $T_2 = 30-32$ semanas), após injeção com carcinógeno....	136
Figura 7 -	Correlação linear entre a incidência de FCA (focos de criptas aberrantes) e o aparecimento de tumores obtidos com fêmeas de camundongos da linhagem A/J injetados com azoximetano...	139
Figura 8 -	Tumores encontrados em segmentos de cólon intestinal (abertos no sentido longitudinal) de camundongos injetados com azoximetano.....	139
Figura 9 -	Cortes histológicos efetuados em segmentos de cólon intestinal de camundongos injetados com azoximetano e corados com hematoxilina e eosina, H&E (x 200). A: mucosa com aspecto normal. B: adenocarcinoma.....	140
Figura 10 -	Cortes histológicos efetuados em segmentos de cólon intestinal de camundongos injetados com azoximetano. A e B: regiões com adenocarcinoma .....	141

## ABREVIATURAS

AOM	-	azoximetano
AUS	-	ausente
CA	-	criptas aberrantes
CPS	-	concentrado protéico de soro
CSD	-	concentrado protéico de soro doce
CC	-	caseína comercial
CSA	-	concentrado protéico de soro ácido
CoC	-	coágulo de caseína
CFP	-	células formadoras de placa
CNa	-	caseinato de sódio
DMH	-	1,2-dimetilhidrazina
DAB	-	4-dimetilaminobenzaldeído
EAE	-	escore de aminoácidos essenciais
FCA	-	focos de criptas aberrantes
FC	-	fator de concentração
GMP	-	glicomacropéptido
GSH	-	glutathiona reduzida
IM	-	immunocal <sup>TM</sup>
IPS	-	isolado protéico de soja
Ig	-	Imunoglobulina
IGF 1	-	Fator de crescimento semelhante à insulina
LDL	-	lipoproteínas de baixa densidade
MF	-	microfiltração
OR	-	osmose reversa
PFC	-	plaque forming cells
PL	-	proteína de leite
PER	-	quociente de eficiência protéica
PDCAAS	-	protein digestibility corrected amino acid scoring

PTK	-	receptores de tirosina quinase
IPS	-	isolado protéico de soja
SDS	-	dodecilsulfato de sódio
UFC	-	unidade formadora de colônia
UF	-	ultrafiltração

## RESUMO GERAL

Os objetivos desse trabalho foram investigar as propriedades imunomoduladoras e anticâncer apresentadas por concentrados de proteínas de leite bovino, com atenção especial às proteínas do soro. Para tal, foi estabelecida uma metodologia adequada para a produção de concentrados de caseínas e de proteínas de soro, que possibilitasse preservar ao máximo suas propriedades estruturais e funcionais. Os concentrados protéicos produzidos foram caracterizados quanto à composição centesimal e o perfil de aminoácidos. Para a obtenção do caseinato de sódio (CNa) e do concentrado protéico de soro ácido (CSA), empregou-se a precipitação da caseína no pH isoeletrico (pH 4,6, 20°C), usando-se ácido láctico (85%). O soro ácido obtido foi concentrado por ultrafiltração, diafiltração e liofilização para obtenção do CSA. O caseinato foi obtido por neutralização da caseína isoeletrica (NaOH, pH 7-7,5) e desidratado em *spray dryer*. A obtenção do coágulo de caseína (CoC) e do concentrado protéico de soro doce foi por coagulação do leite desnatado e pasteurizado (quimosina, 34°C, 45 min.), usando-se coágulo comercial (Há-La, Christian Hansen Brasil). O coágulo de caseína foi lavado, neutralizado e seco em *spray dryer*. O soro doce foi concentrado e desidratado pelo mesmo processo do soro ácido. O emprego de tecnologias de membranas (ultrafiltração/diafiltração) permitiu a obtenção de concentrados protéicos de soro de leite com mais de 80% de proteínas, sem que ocorresse desnaturação que prejudicasse as propriedades imunológicas das proteínas mais termolábeis. Para monitorar a desnaturação protéica e as propriedades imunomoduladoras apresentadas por concentrados protéicos de leite bovino utilizou-se o teste de CFP (células formadoras de placas), segundo modificação da metodologia de CUNNINGHAM e SZENBERG (1968). Utilizaram-se camundongos isogênicos machos de 6-8 semanas, da linhagem A/J. Esse teste permite dosar a resposta imune humoral ou p ou primária. A técnica foi padronizada e a contagem de células formadoras de placa foi efetuada em suspensão de células de baço, 5 dias após a imunização, quando acontece o pico de resposta. Após a produção de

cada lote de concentrado protéico os testes de CFP foram sistematicamente efetuados, encontrando-se bons resultados para os concentrados protéicos de soro obtidos. A irradiação do CSD com doses de 3 e 5kgy promoveu efeitos distintos na resposta imune, observando-se valores mais elevados de CFP/baço na dose menor de irradiação. A existência de propriedades imunomoduladoras e anticâncer em proteínas de soro de leite foi avaliada em comparação com a caseína e o isolado protéico de soja, comerciais. Utilizaram-se 132 fêmeas de camundongos da linhagem A/J, sendo 33 animais para cada tratamento, recebendo a dietas contendo 20% de proteína e 15% de lipídios (óleo de milho, banha de porco e gordura de coco), segundo AIN-76 (1977), durante 32 semanas. Como fonte de proteína foram utilizados o concentrado protéico de soro doce (CSD), o Immunocal™ (IM), a caseína comercial (CC) e o isolado protéico de soja (IPS). Após 4 semanas em dieta, os animais foram injetados com azoximetano (5mg/Kg de peso corporal), durante 6 semanas consecutivas, para indução de câncer de cólon. Os animais foram sacrificados em 3 tempos diferentes, quando foram efetuadas as análises da resposta imune humoral (CFP) em baços, dosagens de glutathione nos fígados e monitoramento do desenvolvimento da doença (focos de criptas aberrantes - FCA), quantificação e análise histológica de tumores no cólon. Não houve diferença entre os ganhos de peso, para todos os tratamentos. Verificou-se correlação positiva entre as concentrações de glutathione no fígado e o número de células produtoras de anticorpos (CFP), no baço dos camundongos ( $r = 0,998$  e  $r = 0,995$ ), com 4 semanas e 30-32 semanas, respectivamente. Maior número de tumores foi observado nos camundongos alimentados com IPS ( $18,20 \pm 5,46$ ), seguido daqueles em dieta contendo CC ( $14,33 \pm 3,43$ ), diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do CSD e IM ( $9,33 \pm 2,96$  e  $8,56 \pm 3,09$ ), respectivamente. Nas condições utilizadas neste trabalho, as proteínas de soro de leite ofereceram considerável proteção ao animal contra a indução de tumores, em relação às outras fontes protéicas analisadas.

## GENERAL SUMMARY

The objective of the present work was the investigation of immunomodulation and anticancer properties presented by bovine milk proteins with special attention to the whey proteins, in the form of whey protein concentrate (WPC). For such a task, adequate methodology was established for the production of concentrates of caseins and whey proteins, which permitted maximum preservation of their structural and functional properties. The protein concentrates produced were characterized for percentual components composition and their amino acid profiles. For the obtention of sodium caseinate (NaC) and of acid whey protein concentrate (aWPC) precipitation of casein at the isoelectric pH (pH 4.6, 20°C) was used. The acidic whey was concentrated by ultrafiltration/diafiltration and liophilization to obtain the WPC. The caseinate was obtained by neutralization of the isoelectric casein clot with sodium hydroxide solution, then dehydrated in spray dryer. Coagulated casein (CoC) and the "sweet" whey were obtained by treating defatted and pasteurized milk (72°C , 20 sec) with commercial preparation of coagulum (Há-La, Chr Hansen Brasil) containing chymosin, for approximately 45 min at 34°C. Coagulum and "sweet" whey were separated by filtration. The coagulum was washed several times with water, homogenized (hammer mill and colloidal mill), neutralized and the suspension was spray dried. The whey was concentrated by ultrafiltration, submitted to diafiltration, freeze-dried and lyophilized. Whey protein concentrates (WPC) containing 80-85% protein was obtained with minimum denaturation of the most labile proteins. Protein denaturation was monitored by solubility tests in aqueous solutions at pH 4.6. Immunomodulating activity of the WPC was monitored by the plaque forming cells method (PFC), according to modification of Cunningham and Szenberg (1968) procedure. Isogenic male mice of the A/J line (6-8 weeks of age) were used in the tests. The test measures humoral or primary immune response by the spleen cells. The technique was standardized and the PFC counting was done in spleen cells suspension five days after immunization when the immune response was at maximum. PFC tests were

performed for each lot of WPC produced. The immunomodulating and anticancer properties of WPC and WPI (IM) from cows milk were studied in comparison with casein and soy protein isolate, commercial preparations. One hundred and thirty two A/J female mice were used in the experiments, 33 for each treatment. They were maintained in isolators and fed diets containing 20% to protein and 15% lipids (corn oil, lard and cocoa fat), modified according to AIN-76 (1977), during 32 weeks. The following protein sources were utilized: whey protein concentrate (WPC), Immunocal™ (IM), commercial casein (CC) and soy protein isolate (SPI). After 4 weeks on the diets the animals were subcutaneously injected with azoxymethane (5mg/kg bw) for 6 consecutive weeks, for colon cancer induction. The animals were sacrificed at 3 different time intervals, when spleen immune response (PFC), liver glutathione concentration, monitoring of carcinogenesis (aberrant crypt foci, ACF), quantification and histological analysis of colon tumors were evaluated. No statistical differences were found in body weight gain among treatments. A strong positive correlation was found between liver glutathione concentration and antibody producing cells in the spleen (PFC),  $r=0.998$ ,  $r=0.995$ , after 4 weeks and 32 weeks, respectively, their beginning the experiment. The largest number of tumors was found in the animals fed the SPI diet ( $18.20 \pm 5.46$ ), compared to CC ( $14.33 \pm 3.43$ ) and the groups fed WPC and IM, respectively  $9.33 \pm 2.96$  and  $8.56 \pm 3.09$ . No statistical difference was found between WPC and IM and both were superior and statistically different from CC and SPI. It suggested that whatever the mechanisms may be, the milk protein, in special the whey proteins protected the intestinal tissue against specific carcinogen for colon cancer in mice.

## INTRODUÇÃO GERAL

O mundo ocidental industrializado enfrentou novos desafios, frente ao crescimento exponencial dos custos com os cuidados à saúde, aumento da expectativa de vida, a evolução do conhecimento científico e o desenvolvimento de novas tecnologias que permitem mudar o estilo de vida. A ciência se adaptou a essa situação, desenvolvendo novos conceitos, dentre os quais, a nutrição otimizada, visando maximizar as funções fisiológicas de cada indivíduo para assegurar o bem-estar e a saúde e, ao mesmo tempo, diminuir o risco de doenças durante toda a vida (ROBERFROID, 2000).

O leite bovino é um fluido biológico que contém água, lipídios emulsionados, micelas de caseínas coloidais, proteínas dissolvidas em água, carboidratos, sais minerais e micronutrientes, nas seguintes porcentagens: 87% de água, 3,5 a 3,7% de gordura, 4,9% de lactose, 0,7% de cinzas e 3,5% de proteínas. É rico em minerais (cálcio, fósforo, potássio e zinco), vitaminas do complexo B e vitaminas A e D (AINSWORTH, 1996).

A composição do leite é bastante variável entre as espécies, particularmente no que diz respeito aos teores de proteína, de gordura e lactose. O leite da maioria dos mamíferos difere do leite humano sob vários aspectos, inclusive por apresentar maiores concentrações de proteínas totais e de caseína e menor concentração de proteínas de soro. Assim, o leite humano apresenta a maior relação proteínas de soro/caseínas. A baixa concentração de proteína total e a elevada proporção de proteínas do soro, no leite humano, são características que estão associadas ao crescimento lento e à dilatada longevidade da espécie humana (BOUNOUS; KONGSHAVN; GOLD, 1988; SGARBIERI, 1996).

A soja é outra fonte interessante de proteínas de boa qualidade para a alimentação humana. É de baixo custo, altamente disponível e apresenta boa funcionalidade, do ponto de vista fisiológico e tecnológico. Considerando os vários

benefícios que a soja pode trazer para os consumidores, a inclusão dessa leguminosa e de seus derivados como parte da dieta diária é altamente recomendável pois contribuem para prover energia e os nutrientes necessários ao crescimento, desenvolvimento e manutenção. Os componentes presentes, tais como os antioxidantes naturais, as isoflavonas, os fosfolipídios e outros, contribuem para uma melhor qualidade de vida auxiliando no bem-estar físico, no melhor funcionamento do organismo e na prevenção de doenças crônico-degenerativas (ENDRES, 2001).

Os concentrados e isolados protéicos de soja e de soro de leite e os caseínatos são os principais ingredientes funcionais utilizados na formulação e preparação de novos alimentos e na substituição de ingredientes em alimentos convencionais.

O presente trabalho teve como objetivos:

- Estabelecer metodologias adequadas para a produção piloto de concentrados de caseínas e de proteínas de soro de leite bovino;
- Avaliar qual linhagem de camundongos apresenta melhor resposta antigênica e qual tipo de proteína está associada a esse perfil de resposta;
- Verificar as possíveis propriedades imunoestimulatórias e antitumorais apresentadas por proteínas de soro de leite, nas formas de concentrado protéico de soro doce (CSD) e immunocal<sup>TM</sup> (IM), comparativamente à caseína (CC) e ao isolado protéico de soja (IPS).

Essa tese está dividida em quatro capítulos. O primeiro apresenta uma revisão de literatura sobre propriedades físico-químicas, nutritivas e fisiológicas apresentadas por proteínas do leite e da soja. No capítulo 2 foram descritos métodos de produção e caracterização de concentrados protéicos de leite bovino. O capítulo 3 trata da propriedade imunoestimulante apresentada por algumas proteínas do leite, propondo também uma metodologia para o seu estudo. O último capítulo descreve um estudo desenvolvido para verificar a existência de

efeito antitumoral exercido por concentrados protéicos de leite, comparados com um isolado protéico de soja, a metodologia utilizada no monitoramento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, P. Chemists in the kitchen: milk and milk proteins I. **Nutrition and Food Science**, London, v. 2, p. 27-30, 1996.

BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P.; GOLD, P. The imunoenhancing property of dietary whey protein concentrate. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 11, p. 271-278, 1988.

ENDRES, J. G. Soy protein products: characteristics, nutritional aspects, and utilization. Champaign: AOCS, 2001. 53 p.

ROBERFOID, M. B. A European consensus of scientific concepts of functional foods. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 16, n. 7/8, p. 689-691, 2000.

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

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO DE LITERATURA: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, NUTRITIVAS E FISIOLÓGICAS DAS PROTEÍNAS DE LEITE BOVINO E DA SOJA.**

#### 1.1 Proteínas do leite

A caseína representa 80% das proteínas do leite de vaca, sendo que os 20% restantes se encontram no soro. O soro contém uma mistura rica e heterogênea de proteínas com atributos funcionais, podendo ser utilizadas para fins nutricionais, biológicos e em alimentos. O soro de leite bovino contém de 4 a 7g de proteína/litro, sendo que a concentração real depende do tipo de soro (ácido ou doce), estágio de lactação e condições de processamento usados na produção do queijo ou da caseína (MARSHALL; HARPER, 1988).

O desenvolvimento das tecnologias de separação permitiu agregar valor ao leite, por meio da produção de ingredientes protéicos para usos específicos na indústria de alimentos. As caseínas e as proteínas do soro, principais proteínas do leite, podem ser isoladas por meio da manipulação de suas propriedades físicas, seguido do uso de tecnologias específicas de separação. A introdução de modificações de processamento permite obter ingredientes com amplas características funcionais, incluindo os concentrados e isolados protéicos de leite, caseínas, caseinatos, concentrados, isolados protéicos de soro, hidrolisados e outros. Dentro de cada uma dessas categorias de ingredientes existe ainda maior diferenciação, relativa às necessidades nutricionais e funcionais desejadas ao produto final (HUFFMAN; HARPER, 1999).

Do ponto de vista das propriedades funcionais tecnológicas, caseínas e proteínas de soro de leite apresentam muitas semelhanças (JOST, 1993; LEE et al., 1992).

## 1.2 Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite bovino

Soro é a designação da fase aquosa do leite que é separada por centrifugação depois da precipitação das caseínas em pH 4,6 e temperatura de 20°C, e da fase aquosa que é separada do leite pela retração do coágulo enzimático de caseínas, na fabricação do queijo. Os soros obtidos nessas condições são referidos como soros ácido e doce, respectivamente (WONG; CAMIRANT; PAVLATH, 1996).

Os concentrados e os isolados protéicos de soro são preparações contendo 25 a 95% de proteína em peso seco e são produzidos comercialmente por ultrafiltração, adsorção e troca iônica e precipitação com polifosfato ou filtração em gel, freqüentemente associada com a desmineralização e a cristalização da lactose. Os produtos protéicos de soro com mais de 90% de proteína em peso seco são chamados de isolados (MARSHALL; HARPER, 1988).

As etapas iniciais de processamento do soro doce são sempre iguais. A temperatura do soro no momento em que é separado da massa de queijo é de 35°C a 38°C. O soro contém aproximadamente 4,9% de lactose, bem como todos os nutrientes necessários para o crescimento de culturas lácteas. O objetivo da primeira etapa de processamento de soro consiste em interromper a conversão de lactose em ácido láctico. Isso pode ser feito por meio de pasteurização imediata do soro para desativar a cultura ou por resfriamento rápido do soro a uma temperatura inferior a 7°C, fazendo cessar o processo de fermentação, até que o soro seja pasteurizado. A segunda etapa visa remover resíduos de coágulo e gordura livre que não ficou aprisionada na massa do queijo. Utiliza-se para isso a centrifugação. As partículas de queijo são removidas com clarificadora e a gordura com uma ultracentrífuga separadora. O produto resultante é o soro límpido. As

demais etapas de processamento dependem da composição e das propriedades funcionais desejadas para o produto final (HUFFMAN; HARPER, 1999).

### **Tecnologias de membranas**

Essas tecnologias envolvem a passagem do soro fluido juntamente com seus componentes solúveis por uma membrana semi-permeável. Por meio de um gradiente de pressão através da membrana, as moléculas menores capazes de permear a membrana são separadas. As moléculas e/ou partículas maiores não conseguem atravessar a membrana, sendo continuamente concentradas, até que se consiga alcançar o fator de concentração (FC) pré-determinado. Com o uso de membranas com tamanhos de poros ou valores de peso molecular de corte diferentes, torna-se possível separar ou concentrar seletivamente os componentes do soro. No processo, quase toda a proteína é retida, sendo que o seu teor no retentado aumenta com o fator de concentração (EL-GAZZAR; MARTH, 1991).

Os sistemas de osmose reversa (OR) utilizam membranas com menor tamanho de poro e valor de peso molecular de corte existentes. As membranas poliméricas possuem poros que permitem a passagem de moléculas de água, retendo e concentrando ao mesmo tempo todos os componentes solúveis, incluindo as moléculas de minerais, lactose, proteínas e lipídios. Os produtos concentrados por meio de OR são submetidos a um aquecimento mínimo. Entretanto, o grau de concentração é limitado pelo aumento da viscosidade do concentrado (USDEC, 1997; HUFFMAN; HARPER, 1999).

Os sistemas de ultrafiltração (UF) utilizam membranas com peso molecular de corte variando de 1-200kDa e tamanho de poro de  $\sim 0,01\mu\text{m}$ . Quando aplicado ao soro sob um gradiente de temperatura e pressão, resulta em um retentado contendo proteínas, glóbulos de gordura, colóides e sólidos em suspensão, que fluem ao longo da membrana, sendo concentrados em relação aos outros solutos do soro original, na medida em que retornam continuamente ao sistema, até alcançar o fator de concentração desejado. Água e solutos de baixo PM fluem

através da membrana, constituindo o "permeado" (GLOVER, 1985; ROSENBERG, 1995).

O grau de concentração é determinado pelo aumento da viscosidade do retentado, sendo que existe um limite de concentração, diretamente relacionado ao volume mínimo de retentado necessário para alimentar o sistema, sendo definido pelo tipo de equipamento e condições de processamento, utilizados. A partir desse ponto tem início a diafiltração, para retirar o máximo possível de lactose e de sais minerais, aumentando, gradativamente, a relação proteínas-sólidos. Consiste em lavar continuamente o retentado, fazendo passar através das membranas, grandes volumes de água desionizada. O grau de pureza desejado define a quantidade de ciclos de diafiltração. Cada ciclo de diafiltração corresponde à passagem pela membrana de um volume de água igual ao volume de retentado. A diafiltração aumenta a pureza do concentrado protéico, a funcionalidade dos constituintes e o controle final da composição (HUFFMAN, 1996).

A UF permite concentrar solutos de alto peso molecular presentes em soluções sem aplicação de calor e sem uso de condições físicas e/ou químicas severas. Para as proteínas isso significa concentrar sem qualquer modificação mais séria na estrutura e na funcionalidade. Assim é possível concentrar as proteínas com o mínimo de desnaturação e as enzimas, sem perda significativa de atividade (MELLO, 1989). Pesquisas recentes demonstraram ser possível obter concentrados protéicos de soro contendo mais que 80% de proteínas, mediante uso de ultrafiltração, com FC variando de 10 - 12, seguido de 12 - 15 ciclos de diafiltração (JACOBUCCI, 1999; ZINSLY, 2000; JACOBUCCI et al., 2001; ZINSLY et al., 2001).

Durante a UF, com a retirada do permeado através da membrana, ocorre a formação de uma camada secundária dos componentes retidos sobre a superfície da membrana. Este fenômeno é conhecido como concentração polarizada ou, se a camada superficial se torna aderente à membrana, o termo "fouling" é mais apropriado, levando à queda gradual do fluxo, diminuição do rendimento do

processo e da eficiência de separação na membrana (MEHRA; DONNELLY, 1993; CARIÉ et al., 2000). No caso do soro, isto é causado principalmente pela precipitação dos sais de cálcio e/ou adsorção de proteínas do soro, que ocorrem na superfície e dentro dos poros da membrana (HANEMA-AIJER et al., 1989).

Existem várias propostas de pré-tratamentos do soro a ser submetido à UF visando à remoção de parte ou de toda a membrana secundária evitando ou reduzindo a precipitação dos sais de cálcio, podendo minimizar o “fouling” da membrana e melhorar a taxa de permeação, a composição e as propriedades do CPS resultante (MATTHEUS; DOUGHTY; SHORT, 1978; ENNIS; JOHN; O`CONNELL, 1981; HAYES et al., 1981; KIM et al., 1989; MELLO, 1989).

Outra técnica de utilização de membranas é a microfiltração (MF), que emprega o processo de fluxo tangencial sob um gradiente de pressão utilizando uma membrana com taxa de rejeição de peso molecular acima de 100.000 e porosidade 0,1 microm. É uma etapa anterior a ultrafiltração, podendo aumentar sua eficiência. As proteínas solúveis, bem como a lactose, os minerais e a água, permeiam as membranas sem problemas. O processo remove microrganismos e glóbulos de gordura que são concentrados e separados dos demais componentes do soro (ROSENBERG, 1995; HORTON, 1996).

Os concentrados protéicos de soro obtidos com utilização de tecnologias de membranas podem ser desidratados por dois processos: atomização (“spray drying”) e liofilização. A secagem no “spray dryer” envolve a atomização de soluções concentradas em fluxo de ar quente. Com o controle do tamanho das partículas, da temperatura e do fluxo do ar, é possível evaporar a água, ao mesmo tempo em que os sólidos ficam expostos à temperatura relativamente baixa. É o procedimento mais comum na fabricação de produtos de soro em pó. Na liofilização, a eliminação da água se processa por sublimação do gelo e assim, o produto a ser desidratado tem que se apresentar na forma congelada (-40 a -60°C) (HUFFMAN, 1996).

### 1.3 Proteínas de soro de leite bovino

Tradicionalmente, o termo “proteínas de soro” refere-se às proteínas do leite que permanecem no soro após a separação da caseína ou a produção de queijo. As principais proteínas do soro são a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\alpha$ -lactoalbumina, duas proteínas globulares de baixo peso molecular que representam de 70 a 80% das proteínas do soro, seguidas da albumina sérica e das imunoglobulinas. As imunoglobulinas incluem IgG, IgA e IgM, sendo que a IgG corresponde a 80% do total das imunoglobulinas de leite bovino. Essas proteínas, junto com a lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima e xantina oxidase são importantes com relação às propriedades antimicrobianas do colostro (REITER, 1985; JENNESS, 1988; MARSHALL; HARPER, 1988).

#### **Propriedades físico-químicas**

Quando o pH do leite é ajustado para 4,6 a caseína se precipita, separando-se do soro, que contém três frações nitrogenadas distintas: cerca de 0,1% de proteoses-peptonas, não coaguláveis pelo calor; 0,44% coagulável termicamente e 0,20% de nitrogênio protéico (MODLER, 2000).

As proteoses-peptonas originam-se da  $\beta$ -caseína, por ação da plasmina, protease nativa do leite. Esses fragmentos não são precipitados por ajuste de pH para 4,6 e nem afetados por aquecimento. A massa molecular varia de 4.100 a 40.800Da, sendo apenas, em parte, retida na ultrafiltração, consistindo de 15-20% do total de proteínas do concentrado protéico de soro (MARSHALL, 1982; SWAISGOOD, 1982).

Com o aquecimento, as proteínas do soro se precipitam na seguinte ordem: primeiro as imunoglobulinas, seguidas pela  $\beta$ -lactoglobulina, albumina sérica e  $\alpha$ -lactalbumina, seguindo as temperaturas de desnaturação. A desnaturação da  $\alpha$ -lactalbumina é altamente reversível quando comparada às outras proteínas, aparecendo por isso como mais termoresistente (MODLER, 1985).

Enzimas proteolíticas como a quimosina aumentam em cerca de 0,04% o teor de proteínas não coaguláveis por calor no soro, em relação ao soro obtido por coagulação ácida. A quimosina cliva a  $\kappa$ -caseína entre os resíduos de aminoácidos Met<sub>105</sub>-Phe<sub>106</sub> para liberar um glicomacropéptido (GMP), contendo aproximadamente 64 resíduos de aminoácidos, dependendo da variante genética da caseína. Esse fragmento protéico tem cerca de 6.800Da de massa molecular e ponto isoelétrico de 4,4, não sendo sensível ao calor, aparecendo na fração peptose-peptona do soro, derivada da produção de queijo (MODLER, 2000).

Aproximadamente 64% (3,3g/L) da proteína do soro coagulável pelo calor corresponde à  $\beta$ -lactoglobulina, existindo como um dímero de 2 subunidades idênticas com cada monômero contendo um grupamento sulfidril (—SH) e duas ligações dissulfeto (—S—S—). Cerca de 90% dos grupos —SH livres no leite são provenientes da  $\beta$ -lactoglobulina. A  $\alpha$ -lactalbumina corresponde a 19% das proteínas do leite precipitáveis por calor. Essa proteína existe como um monômero contendo 4 ligações dissulfeto e nenhum grupamento sulfidril livre (MODLER, 2000).

### **Propriedades nutritivas**

O soro de leite, na forma de concentrado protéico (CPS), representa uma mistura de proteínas com importantes propriedades físicas, químicas e funcionais, desempenhando papel na nutrição, como uma fonte excepcionalmente rica e balanceada de aminoácidos essenciais de elevada digestibilidade e rápida absorção (REGESTER et al., 1996; SMITHERS et al., 1996).

### **Propriedades funcionais tecnológicas**

As propriedades funcionais tecnológicas das proteínas dependem de sua composição, estrutura e, conseqüentemente, de suas propriedades físico-químicas. Assim, é necessário conhecer as características fundamentais das

proteínas para entender e explicar seu comportamento tecnológico e funcional (KINSELLA; RECTOR; PHILLIPS, 1994; MITCHELL; HILL, 1995; SINGH; YE; HAVEA, 2000)

A funcionalidade das proteínas é um fator complementar à qualidade nutricional. Do ponto de vista tecnológico, as propriedades funcionais importantes são aquelas que melhoram o comportamento tecnológico da proteína, melhorando as características de aparência e sensoriais dos produtos que as contêm. Dentre essas propriedades, as de maior interesse são: solubilidade, capacidade de retenção de água e gordura, capacidade de emulsificação e estabilidade de emulsões, capacidade de formação de espuma e estabilidade de espuma, capacidade de geleificação e propriedades dos géis, formação de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis, microparticulação de proteínas e interações proteína-hidrocolóides (SATTERLEE, 1981; KATO; KOBAYASHI, 1991; RAEMY; LAMBELET, 1991; QUEGUINER et al., 1992; XU et al., 1992; BOMBARA; PILOSOFF; AÑÓN, 1994; LEGAWO et al., 1996; OTTE et al., 1996; VAGHELA; KILARA, 1996).

Dentre as propriedades funcionais mais importantes apresentadas por proteínas do soro de leite destacam-se a solubilidade em amplas faixas de pH, concentração de proteína, temperatura e condições iônicas. Grande parte das proteoses-peptonas do soro são produtos de degradação das  $\beta$ -caseínas e contribuem para a propriedade formadora de espuma apresentada pelo soro (MARSHALL; HARPER, 1988). O modo de produzir concentrados ou isolados protéicos de soro pode resultar em alguma desnaturação protéica por calor, agregação da proteína com  $\text{Ca}^{+2}$ , interação com lactose e lipídios polares, tendendo a reduzir a solubilidade das proteínas. As proteínas do soro que não sofreram desnaturação térmica permanecem completamente solúveis na faixa de pH que varia de 4 a 5, sendo possível estimar o grau de desnaturação protéica, através de medidas de solubilidade de concentrados em pH 4,6 (MORR; FOEGEDING, 1990; MORR; HA, 1993).

## **Propriedades funcionais fisiológicas**

A superioridade das proteínas de soro foi observada a partir de pesquisas efetuadas para analisar os efeitos de diferentes proteínas alimentares no sistema imune de animais, quando se verificou que o isolado protéico de soro de leite contém altas quantidades dos precursores de glutathiona, cistina e glutamincistina, e que a mistura dessas proteínas desempenha papel importante na manutenção dos níveis celulares de glutathiona (GSH), necessários para garantir uma resposta imune eficiente (BOUNOUS; KONGSHAVN, 1978). As proteínas de soro de leite apresentam ações fisiológicas específicas, “in vivo”, estando associadas a vários efeitos biológicos observados em estudos com animais e humanos, que variam desde atividade anticâncer até uma possível influência na função digestiva. Essa propriedade fisiológica funcional só foi observada em proteínas de soro que não sofreram desnaturação (BRINK, 1996; McINTOSH et al., 1998).

As proteínas de soro representam uma alternativa para aumentar os níveis celulares de GSH sempre que necessário. O efeito fisiológico observado depende dos peptídios glutamincistina contidos na albumina,  $\beta$ -lactoglobulina, lactoferrina e imunoglobulina G, sendo importante manter a integridade desses componentes protéicos (BRINK, 1996; BOUNOUS, 2000).

A diminuição nos níveis celulares de glutathiona foi observada em várias doenças, incluindo Parkinson, Alzheimer, aterosclerose, catarata, fibrose cística, AIDS e câncer (MONTAGNIER; OLIVIER; PASQUIER, 1998). Por outro lado, a demanda fisiológica do organismo por GSH pode existir sob várias condições, incluindo: produção de oxiradicais endógenos durante atividade imune e exercício muscular intenso; desintoxicação de poluentes e proteção contra radiação. Aceita-se que em situações de desafio, a competição por precursores de GSH pode levar a deficiências funcionais isoladas ou múltiplas. O sistema imune necessita de GSH, podendo competir por seus precursores com outros órgãos envolvidos na defesa do organismo contra poluentes ou radiação ultravioleta (BOUNOUS, 1997).

Como a disponibilidade sistêmica de glutathiona de origem oral é irrisória no homem, e pelo fato de não haver evidências de seu transporte para o interior das células, a GSH tem que ser sintetizada intracelularmente (MEISTER; ANDERSON, 1983; KAPLOWITZ; AW; OOKHEENS, 1984). O fluxo interno de cisteína, glutamato e glicina pode ser insuficiente sob determinadas circunstâncias e a cisteína torna-se limitante na síntese de GSH. O fornecimento de cisteína livre não é recomendado por ser tóxica e facilmente oxidada. Por outro lado, a cisteína presente como cistina (duas cisteínas ligadas por ligações dissulfeto), liberada durante a digestão no trato gastrointestinal, é mais estável do que o aminoácido livre porque a ligação dissulfeto é resistente à tripsina e pepsina, podendo ser clivada por calor e atrito mecânico (BOUNOUS; GOLD, 1991). Desse modo, a cistina atravessa a barreira intestinal sem ser alterada, podendo ser reduzida em duas moléculas de cisteína ao entrar na célula (BOUNOUS, 1997). Alguns dos efeitos fisiológicos comprovados são descritos a seguir.

- *Ação estimuladora do hormônio de crescimento*

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) é liberado durante o metabolismo do hormônio de crescimento. A quantidade de IGF-1 produzida determina a extensão dos efeitos do hormônio de crescimento no desenvolvimento de crianças e na formação de músculos em adultos. Vários estudos demonstraram que a quantidade de IGF-1 é diretamente proporcional à qualidade da proteína dietética. A hidrólise das proteínas de soro para se obter di-, tri- e oligopeptídios (peptídios de cadeias curtas e médias), aumenta o valor biológico do soro e a liberação de IGF-1 (BRINK, 1996).

- *Imunomodulação*

A habilidade dos linfócitos em compensar danos oxidativos é medida pela capacidade apresentada por essas células em regenerar estoques intracelulares

de GSH, promovendo assim uma resposta mais eficiente ao estímulo antigênico (NOELLE; LAWRENCE, 1981; FIDELUS; TSAN, 1987).

A resposta imune humoral apresentada por camundongos alimentados com uma dieta contendo 20g de concentrado protéico de soro de leite por 100g de dieta foi significativamente maior do que a apresentada por animais alimentados com outras dietas de eficiência nutricional similar, nas quais o soro bioativo foi substituído por outras proteínas como caseína, e oriundas de soja, trigo, milho, ovo, peixe, carne, proteína das algas *Scenedesmus* e *Spirulina maxima* ou ração comercial (BOUNOUS; KONGSHAVN; GOLD, 1988).

A diminuição dos níveis de glutathione está associada com a diminuição da resposta imune. A glutathione intracelular está diretamente relacionada à habilidade dos linfócitos em responder a estímulos imunogênicos em animais. A resposta imune humoral, envolvida na produção de anticorpos, requer rápida síntese protéica que, por sua vez, requer uma adequada ingestão dietética de aminoácidos essenciais encontrados em proteínas como as do soro de leite (BOUNOUS; GOLD, 1991).

Outras evidências para o envolvimento de GSH na modulação da função imune vêm de pesquisas com o Vírus da Imunodeficiência Humana - HIV. O sistema oxidante-antioxidante nos humanos encontra-se amadurecido desde o nascimento, podendo ser considerado um bom marcador de resposta inflamatória como aquela causada pelo HIV-1 (MORENO, 2002). O sistema enzimático com ação antioxidante superóxido dismutase, catalase, glutathione, glutathione peroxidase e redutase e outros, como ácido ascórbico, tocoferóis e ácido úrico promovem equilíbrio entre os dois sistemas evitando o estresse oxidativo (BARUCHEL; WAINBERG, 1992; GRIMBLE, 1999; GALÍZIA; WAITZBERG, 2001). Na infecção pelo HIV-1, a depleção de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e a indução de apoptose são decorrentes do estresse oxidativo, contribuindo para a progressão da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS e o desenvolvimento da imunodeficiência (STAAL, 1997; ALLARD et al., 1998; PATRICK, 2000).

A deficiência de GSH é uma das conseqüências mais precoces da infecção pelo HIV-1. Indivíduos infectados apresentam menor concentração de glutatona nos linfócitos e aqueles que apresentam GSH em suas células T de defesa, primeiro alvo do vírus HIV, apresentam maior sobrevida (STAAL et al., 1992; HERZENBERG et al., 1997). Em estudo piloto com crianças infectadas pelo HIV-1 e suplementadas com proteínas de soro de leite por 6 meses, foi observado, em algumas delas, aumento da GSH nos linfócitos (BARUCHEL et al., 1998). A suplementação nutricional de crianças com AIDS, com o concentrado protéico rico em cisteína, aumenta os níveis de GSH nos eritrócitos e sugere a melhora da relação entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (MORENO, 2002). Adultos infectados pelo HIV-1 com suplementação alimentar semelhante, apresentaram aumento dos níveis de GSH plasmática e de células mononucleadas (BOUNOUS et al., 1993; MICKE et al., 2001).

- *Efeito hipocolesterolêmico*

Alguns dos resultados obtidos com relação ao efeito das proteínas de soro nas concentrações séricas e hepáticas de colesterol são contraditórias. Stahlenlin e Ritzer (1979) afirmaram que as proteínas de soro de leite não exerceram efeito nos níveis de colesterol sérico. Yoshida, Yahiro e Ahiko (1988) observaram para as mesmas proteínas um efeito redutor do colesterol sérico, enquanto Lovati e outros (1990) verificaram elevação nesses níveis.

Nagaoka, Kanamaru e Kuzuia (1991) estudaram os efeitos das proteínas de soro e da caseína nos níveis séricos e hepáticos de lipídios em ratos, verificando que as proteínas de soro apresentaram efeito hipocolesterolêmico, comparadas à caseína. O modo pelo qual as proteínas de soro reduziram o colesterol hepático foi atribuído, principalmente, à diminuição do LDL-colesterol. Em outro experimento, utilizando as mesmas fontes protéicas, acrescentadas de 1% de colesterol, eles encontraram concentrações de colesterol sérico total significativamente menor no grupo alimentado com proteína de soro lácteo.

Sautier e outros (1983) observaram nas concentrações séricas, um efeito hipocolesterolêmico das proteínas de soro de leite em relação à caseína, utilizando dietas sem adição de colesterol, embora as concentrações de colesterol hepático não tenham sido reduzidas significativamente. Choi, Ikeda e Sugamo (1989) contudo, só encontraram esse efeito hipocolesterolêmico, quando as dietas foram adicionadas de colesterol. Lapré e outros (1989) sugeriram que esse efeito das proteínas de soro não foi observado em ratos alimentados com dietas contendo 0,15% de colesterol, resultados confirmados por outros pesquisadores. É possível que em ratos alimentados com altas quantidades de proteínas de soro de leite, a síntese de colesterol seja inibida, o que ficou mais evidente por observação da redução nos níveis de VLDL-colesterol. As menores concentrações de colesterol hepático observadas em ratos com dietas de proteínas de soro de leite podem também apontar para a diminuição da colesterogênese (ZANG; BEYNEM, 1993).

As proteínas de soro de leite, utilizadas em concentrações de 20 e 30% da dieta de ratos, apresentaram efeito hipocolesterolêmico. O efeito foi mais evidente no soro sangüíneo e fígado, respectivamente. Não houve tendência definida quanto a lipídemia sérica e hepática (JACOBUCCI, 1999; JACOBUCCI et al., 2001).

- *Doenças crônico-degenerativas*

Existe relação entre as doenças neurodegenerativas e os níveis orgânicos de glutathione. Com o envelhecimento, o suprimento de glutathione diminui e há aumento na produção de radicais livres, mediadores de várias doenças. Os tecidos do cérebro de pessoas que morreram com mal de Alzheimer apresentavam níveis reduzidos de glutathione e glutathione peroxidase, além de níveis mais elevados de lipídios peroxidados do que o mesmo tipo de tecido vindo de idosos que vieram a óbito sem doença neurológica significativa. Aqueles pacientes também apresentavam níveis normais de vitamina E, outro importante antioxidante, sugerindo que o declínio de glutathione e não de vitamina E,

associado ao envelhecimento, pode ser uma das causas da doença de Alzheimer. Essa doença também foi associada a níveis altos de alumínio no cérebro. Tendo em vista que uma das funções da glutatona é eliminar materiais tóxicos, parece que o declínio de GSH, associado ao envelhecimento, pode causar acúmulo de metais tóxicos e ação de radicais livres nas células do cérebro, ricas em oxigênio, o que pode, por sua vez, levar a doenças neurodegenerativas (BRINK, 1996).

A diminuição dos níveis de GSH nos tecidos do cérebro foi associada à gravidade da invalidez de pacientes com Parkinson, embora tais relações não tenham sido encontradas para os níveis de ascorbato (vitamina C). Parece que a habilidade das células sobreviverem aos processos oxidativos está associada à sua habilidade em manter seus níveis de glutatona. A vitamina C pode não ser capaz de proteger os neurônios envolvidos na doença de Parkinson porque essa doença é caracterizada pela presença de altos níveis de ferro, o qual é reduzido pela vitamina C para gerar níveis altos de radicais livres. O ferro pode também causar danos ao cérebro porque se complexa com a melanina, e não com a melatonina, dando origem a radicais hidroxilas tóxicos que levam à destruição das células (BRINK, 1996).

O declínio dos níveis de glutatona com o envelhecimento também foi associado ao aumento do risco de aterosclerose. Isso porque a glutatona é capaz de prevenir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) associada ao colesterol. Quando as frações LDL-colesterol se oxidam elas provocam lesões nas paredes das artérias que, gradualmente, são transformadas em placas que vão se fechando e bloqueiam a passagem do sangue, podendo provocar infarto do miocárdio e ou acidente vascular cerebral – AVC (BOUNOUS, 1997).

A administração, durante 3 meses, de CPS a pacientes com hepatite B e durante 12 semanas a 25 pacientes crônicos com hepatite B ou C, restituiu as concentrações de GSH nos linfócitos à níveis normais. A suplementação por longo prazo com CPS é efetiva em melhorar as disfunções do fígado nos casos de hepatite B. Não foi observado efeito associado à suplementação em 17 pacientes crônicos com hepatite C (WATANABE et al., 1996). O sucesso desse tipo de

tratamento usando precursores naturais de GSH indica, claramente, que na maioria das condições clínicas e experimentais caracterizadas por diminuição nos níveis de GSH, a capacidade das células em promover a síntese é mantida. Assim, concentrações ótimas de GSH podem ser obtidas por meio de um “sistema adequado de entrega de cisteína”, tal qual aquele fornecido pelo concentrado protéico de soro de leite (WATANABE et al., 2000).

- *Longevidade*

Em ensaio para verificar longevidade, hamsters adultos e filhotes foram alimentados com ração comercial e com dietas contendo 10, 20 ou 40% de proteínas de soro. Os animais alimentados com proteína de soro viveram significativamente mais tempo do que os animais alimentados com dieta comercial. Não houve diferença estatisticamente significativa no crescimento e ganho de peso em hamsters que receberam maiores quantidades de proteína de soro. Um maior tempo de vida foi observado em hamsters machos recebendo dieta com 20% de proteína de soro. Os animais mais velhos do grupo controle que receberam ração comercial chegaram a 88 semanas de idade enquanto que aqueles alimentados com dietas contendo soro de leite como fonte protéica viveram 140 semanas, representando aumento na longevidade de 60%. Animais alimentados com proteína de soro chegaram a viver três anos (superior à expectativa para hamsters), enquanto que nenhum dos animais alimentados com dieta comercial chegou a dois anos de vida, sugerindo um efeito positivo contra o envelhecimento (BIRT; BAKER; HRUZA, 1982; BRINK, 1996).

- *Inibição de tumores*

As duas teorias mais citadas a respeito da origem do câncer levam em conta a função protetora exercida pela glutathiona, agindo como antioxidante e desintoxicante. Também se sugeriu que exista forte correlação entre os mecanismos associados ao envelhecimento e ao aparecimento do câncer uma

vez que a incidência do câncer em seres humanos e em animais aumenta, consideravelmente, com a idade. Além disso, as teorias do envelhecimento baseiam-se na existência de um acúmulo de lesões, tal é a teoria de radicais livres e outras que explicam a origem de certos tumores. Outros atribuem o aumento na incidência de câncer associado à idade ao maior tempo de exposição aos agentes promotores da doença ao longo do tempo (RICHIE, 1992; BOUNOUS, 1997).

Vários ensaios com animais demonstram que o concentrado de proteínas de soro exerce efeito anticarcinogênico. Isso se dá via aumento nas concentrações de GSH nos tecidos, podendo exercer efeito inibidor de tumores menores, via estimulação da imunidade por meio da produção da GSH. A produção de radicais de oxigênio é um passo crítico na carcinogênese e, assim, a eliminação desses radicais é importante para inibir a doença (BOUNOUS, 2000).

O crescimento de diversos tipos de tumores malignos foi inibido em camundongos alimentados com dietas contendo uma quantidade de proteínas ou aminoácidos essenciais menor do que a necessária para promover crescimento normal do animal. O teor de caseína das dietas controle, em alguns estudos, variou de 12 a 28% (p/p). As dietas foram oferecidas por poucos dias ou semanas. A restrição nas dietas de um aminoácido essencial diminuiu o crescimento dos tumores mais do que qualquer diminuição na quantidade de dieta fornecida (THEUER, 1971; PINE, 1978).

Outros trabalhos sugerem que o efeito antitumoral apresentado por dietas com baixo teor de proteínas possa ser devido a efeitos imunológicos diferenciais da carência de proteínas. A carência de proteínas ou de aminoácidos em camundongos reduz drasticamente a produção de anticorpos, embora aumente o vigor contra células cancerosas. Também se observou que uma dieta contendo menos que a necessidade mínima de aminoácidos essenciais inibe o crescimento de carcinomas mamários em camundongos e aumenta a resistência do hospedeiro a *Listeria monocytogenes* (BOUNOUS; STEVENSON; KONGSHAVN, 1981).

Todos os estudos efetuados anteriormente levavam em conta a relação entre a ingestão de proteínas e calorias e o crescimento de tumores, preocupando-se com os efeitos de grandes quantidades de um tipo único de proteínas, seja a caseína ou seu hidrolisado. Bounous, Letorneau e Kongshavn (1983) compararam os efeitos de duas proteínas diferentes e os hidrolisados de caseína e de lactalbumina, no crescimento de tumores em camundongos. Eles também correlacionaram os resultados imunológicos com estudos realizados em outros animais sem tumores e alimentados com as mesmas dietas. Como resultado, a ingestão de aminoácidos em excesso propiciou o crescimento de fibrosarcomas implantados e de carcinomas mamários. Esses efeitos não estavam associados à qualidade das proteínas ou à distribuição de aminoácidos, parecendo ser somente dependentes da concentração de nitrogênio ou de aminoácidos na dieta.

O efeito modulador da resposta imune foi observado em camundongos de várias linhagens com idade aproximada de 7 semanas (BOUNOUS; KONGSHAVN, 1982) a 6 meses (BOUNOUS et al., 1985). Bounous, Kongshavn e Gold (1988) verificaram os efeitos das proteínas do soro no desenvolvimento de tumores induzidos por 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em camundongos alimentados com dietas contendo 20% de proteína. O grupo que recebeu soro lácteo apresentou maior resposta imune humoral. Na fase avançada da doença a resposta imune caiu bastante, em todos os grupos dietéticos. Essas medidas, contudo, refletiram o padrão de resposta imune humoral para alimentos com os mesmos tipos de proteínas que foram observados em estudos prévios com animais saudáveis.

O aumento considerável nos níveis de glutathione no cólon, obtido por ingestão de proteínas de soro, foi associado à diminuição nos tumores, em experimento piloto feito com carcinoma humano de cólon, sugerindo que os níveis de glutathione nos tecidos modulam a formação do tumor (ENKER; JACOBITZ, 1976; CORBETT; GRISWOLD; ROBERTS, 1977). Os estudos de McIntosh e outros (1995) confirmaram que as proteínas da dieta, em particular as proteínas

do soro de leite, protegem contra o desenvolvimento de câncer induzido por DMH. Ripple e outros (1997) encontraram relação entre nível hormonal, redução de glutatona em células de próstata e câncer.

As observações anteriormente descritas ajudam a entender a inibição de tumores observada “in vitro”. A albumina sérica bovina inibiu a produção de estrógenos em meio contendo células humanas de câncer de mama (LAURSEN; BRIAND; LYEKESFELDT, 1990). A adição de soro de leite bovino em meios de cultura contendo células humanas de câncer de próstata e de mama resultou em redução significativa do crescimento celular, o que se manifestou após 24 horas de incubação (BOURTOURAUULT et al., 1991). A albumina sérica, a  $\alpha$ -lactalbumina e a lactoferrina, proteínas do CPS com maiores concentrações de cistina (GOODMAN; SCHANBACHER, 1991). A incubação com  $\alpha$ -lactalbumina promoveu apoptose seletiva em células de câncer humano (HAKANSON et al., 1995). A lactoferrina exibiu efeito antitumoral em cultura de células pancreáticas humanas (SAKAMOTO, 1998). As três proteínas citadas têm em comum, concentrações relativamente altas de cisteína.

Os efeitos do isolado protéico de soro na citotoxicidade de uma potente droga anticâncer foram avaliados em células de hepatomas humanos, colocadas a crescer em diferentes meios: basal, com o isolado protéico, com a droga ou em meio contendo droga e isolado protéico. As células que cresceram em meio combinado apresentaram menor taxa de sobrevivência do que aquelas que cresceram em meio contendo somente a droga. Há indicativos de que o isolado protéico de soro aumentou a citotoxicidade da droga, induzindo mais apoptose. O aumento de células em apoptose pode ser associado com a diminuição da GSH nos hepatomas (TSAI et al., 2000).

A modulação nutricional da GSH, pelo uso de proteínas isoladas de soro de leite em AIDS e câncer, pode muito bem encontrar outras aplicações em situações onde o estresse oxidativo e doenças do metabolismo de GSH estão intimamente relacionados. Serão necessários estudos farmacoepidemiológicos extensos no

metabolismo de GSH intracelular que possibilitem uma definição clínica do novo tipo de terapia (BOUNOUS, 2000).

- *Atividade anti-ulcerogênica*

O estado nutricional tem influência direta na maior ou menor incidência de úlcera, câncer gástrico e intestinal, além de outros processos inflamatórios, que têm seus fatores determinantes agravados por situações comuns da realidade atual, como o estilo de vida, dieta, estresse e predisposição genética, que somadas, reduzem os processos de defesa do revestimento mucoso do estômago (BRUNTON, 1996; PONTES; MARCHESI; MAGALHÃES, 1998; WALZEM, 1999; RANG et al., 2001).

A glutatona está distribuída nas células da mucosa gastrintestinal, de animais e do homem, em concentrações elevadas. É um importante agente antioxidante natural na mucosa gástrica (MARTIN et al., 1998; ROSANELI et al., 2001). As concentrações encontradas estão relacionadas intimamente com a citoproteção gástrica, por impedir a ação nociva de radicais livres tóxicos sobre as células da mucosa (HIRAISHI et al., 1994; SMITH et al., 1996; BIGHETTI, 1999).

A administração de glutatona antes da indução de úlcera por estresse, promove maior proteção da mucosa gástrica (DAS; BANERJEE, 1993). A utilização de sulfoximina de butionina, droga inibidora da enzima  $\gamma$ -glutamilcisteína-sintetase, que atua na síntese de glutatona, demonstrou que o bloqueio dessa enzima induz a danos graves na mucosa gástrica (YAMAGUCHI et al., 1998; HULTBERG; ANDERSON; ISAKSSON, 1999), visto que a função antioxidante exercida pela glutatona, deixa de acontecer (WAKULICH; TEPPERMAN, 1997; YAMAGUCHI et al., 1998).

As proteínas do leite exercem papel importante na potencialização dos mecanismos de defesa da mucosa gastrintestinal (DIAL; LICHTENBERGER, 1993). A  $\alpha$ -lactalbumina que se encontra em concentrações significativas no

concentrado protéico de soro de leite mostrou efeito protetor de indução de úlcera por indometacina (MATSUMOTO et al., 2001).

O uso do CPS no tratamento prévio de animais em modelos de úlcera induzida por indometacina e por etanol, foi capaz de reduzir as lesões gástricas produzidas, o que demonstra um possível envolvimento desse produto protéico no mecanismo de citoproteção. Além disso, o efeito protetor parece ser mais eficaz a partir de duas doses, parecendo estabelecer um nível máximo de proteção próximo ao tratamento subcrônico. A análise comparativa do efeito do CPS e da cimetidina, droga anti-ulcerogênica, sugere que o CPS pode ser utilizado como coadjuvante dietético no controle e/ou tratamento de úlcera gástrica provocada por antiinflamatórios não esteroidais, provavelmente como mecanismo de proteção à mucosa gástrica (ROSANELI, 2002).

#### 1.4 Caseínas

Consistem em grupo heterogêneo de fosfoproteínas que podem ser isoladas pelos seguintes procedimentos físicos e químicos: centrifugação do leite para separar as micelas de caseína, filtração em gel, hidrólise enzimática limitada da  $\kappa$ -caseína e o método clássico de precipitação isoelétrica em pH 4,6, entre 20 e 35°C, seguido de centrifugação para recolher o precipitado de caseínas. As caseínas do leite bovino se dividem em quatro frações:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína (XU, 1999) nas proporções de 44, 13, 33 e 10%, respectivamente (MARSHALL, 1982).

#### **Propriedades físico-químicas**

As caseínas apresentam resíduos serina fosfato que contribuem para a estabilidade de suas micelas. Também apresentam alto teor de prolina, uniformemente distribuída na cadeia polipeptídica, o que limita a formação de estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice ou  $\beta$ -pregueada. Com isso, as caseínas

apresentam estruturas mais abertas do que as proteínas do soro, tornando-as muito mais susceptíveis à proteólise (MARSHALL, 1982).

Existem diversas variantes genéticas das caseínas e as diferentes variantes influenciam a carga, o peso molecular e o ponto isoelétrico. A caseína  $\alpha_{s1}$  tem quatro variantes genéticas (A, B, C e D). A  $\alpha_{s2}$  também apresenta quatro variantes: P<sub>10</sub> ( $\alpha_{s6}$ ), P<sub>11</sub> ( $\alpha_{s4}$ ), P<sub>12</sub> ( $\alpha_{s3}$ ) e P<sub>13</sub> ( $\alpha_{s2}$ ). A  $\beta$ -caseína tem cinco variantes: A<sup>3</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>1</sup>, B e C, enquanto que a  $\kappa$ -caseína tem duas, A e B (SWAISGOOD, 1982).

A caseína  $\alpha_{s1}$  apresenta forte tendência de interação hidrofóbica, o que sugere que essa proteína desempenhe função importante na formação das micelas de caseína. A seqüência de aminoácidos da  $\beta$ -caseína revela um segmento amino terminal com elevada densidade de carga negativa, e bastante hidrofílico, apresentando quatro grupos fosfato no segmento 15-19. O restante do polipeptídio é fortemente hidrofóbico, contendo alta concentração de prolina. As  $\kappa$ -caseínas não reagem com o Ca<sup>++</sup> mas, em presença desses íons, reagem com as  $\alpha_{s1}$  e com as  $\beta$  para formar micelas termodinamicamente estáveis (MODLER, 1996).

Ao contrário das séries  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ , as cargas da  $\kappa$ -caseína não são provenientes do fosfato, o que provavelmente explica a não reatividade da  $\kappa$ -caseína com o cálcio. As cargas negativas da extremidade C-terminal da molécula são reforçadas pela presença de resíduos de carboidratos. A  $\kappa$ -caseína constitui substrato para a ação da renina. A clivagem ocorre entre os resíduos Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>, liberando um peptídio C-terminal de PM 6.800, solúvel e um peptídio N-terminal, p- $\kappa$ -caseína insolúvel, de 12.271Da. A grande hidrofobicidade inerente à para- $\kappa$ -caseína favorece a agregação das micelas de caseína após a ação da renina (SGARBIERI, 1996).

As caseínas encontram-se em forte associação devido à combinação de fatores como regiões hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto e hidrostáticas (SWAISGOOD, 1982).

## **Propriedades nutritivas**

As proteínas do leite apresentam um quociente de eficiência protéica (PER) elevado. A caseína, considerada proteína de referência, apresenta um PER acima de 2,5 e o caseinato de sódio, 2,6 (MING, 2000). As análises do valor nutricional de caseinato de sódio e coágulo de caseína, produzidos em planta-piloto do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas - SP, apresentaram valores de PER iguais a 3,15 e 3,65, respectivamente (ZINSLY et al., 2001).

## **Propriedades funcionais tecnológicas**

As caseínas são de natureza anfotérica, possibilitando reações desejáveis em sistemas alimentícios, nas interfaces óleo-água e ar-água como componente de sistemas funcionais ou pelo aumento do valor protéico do produto final (MODLER, 1985; MODLER, 2000).

A caseína comercial, produzida por meio da precipitação ácida ou com uso de coalho (pepsina mais quimosina), é uma das principais proteínas funcionais alimentares, conferindo aos produtos formulados melhor aparência e propriedades sensoriais (LAWSON, 1994).

As propriedades dos caseinatos são influenciadas pelo procedimento de obtenção e características dos alimentos aos quais são incorporados. Os caseinatos de sódio e de potássio são solúveis em água, em valores de pH acima de 5,5. Já o caseinato de cálcio, em água, forma suspensão coloidal de baixa viscosidade e excelentes características de cremosidade. Os caseinatos de sódio e de potássio em concentração acima de 15% formam dispersões de alta viscosidade porque exibem boas propriedades de ligação de água. Esses produtos são utilizados para formular alimentos que necessitam solubilidade, estabilidade ao calor e propriedades de estabilidade de superfície. São agentes emulsionantes, espumantes e espessantes eficazes; formam géis em concentração de 17% de proteína, são termoestáveis, podendo ser mantidos a

140°C por 15min em pH 9,0, sem coagulação (WONG; CAMIRANT; PAVLATH, 1996).

Caseínas e caseinatos de sódio e cálcio podem ser utilizados na formulação de produtos cárneos, lácteos, produtos de panificação, chocolates e confeitos, coberturas comestíveis, bebidas lácteas e achocolatados, salgadinhos e “snacks” (KINSELLA, 1984; SOUTHWARD, 1989; GIESE, 1994; TORRES, 1994). A utilização de caseinatos desidratados na elaboração de queijos leva a uma melhor hidratação e rápida dispersão dos componentes, tendo como resultado melhor textura no produto final (MANN, 1991).

### **Propriedades funcionais fisiológicas**

Até pouco tempo atrás, o principal papel fisiológico conhecido das caseínas era servir como fonte dos aminoácidos necessários ao crescimento do recém-nascido. Holt (1997) propôs como função fisiológica principal do sistema micelar da caseína a prevenção da calcificação patológica nas glândulas mamárias, uma vez que o cálcio e o fósforo ligados à micela de caseína são assim transportados ao organismo da criança em crescimento sem haver perigo de precipitação de cálcio nos tecidos produtores de leite.

- *Peptídios bioativos*

Embora nenhuma propriedade fisiológica específica tenha sido associada à caseína total ou a frações isoladas, vários peptídios existentes na seqüência de aminoácidos já foram estudados. Os peptídios bioativos mais importantes são as casomorfina, com atividade opióide por se ligarem a receptores opióides no epitélio intestinal e em outras células (TESCHEMACHER; KOCH, 1991; SCHLIMME; MEISEL, 1995); antagonistas opióides (FIAT; MIGLIORE-SAMOUR; JOLLÈS, 1993); peptídios com a atividade imunoestimulante (ELLIS; JOHN; O'CONNELL, 1996; SCHANBACHER et al., 1998); peptídios com atividade anti-hipertensiva; e fosfopeptídios com habilidade para seqüestrar cálcio (SGARBIERI;

PACHECO, 1999), ferro (BOUHALLAB; LÉONIL; MAUBOIS, 1991; PÉRÈS et al., 1999; AÎT-OUKHATAR et al., 1999; 2000) e possivelmente outros minerais, agindo como biocarreadores.

A habilidade dos fosfopeptídios de caseína ligarem cálcio já é bem conhecida, mas não está claro se esses peptídios são efetivos no estímulo do metabolismo de cálcio (transporte, absorção e/ou utilização na mineralização óssea) (JELEN; LUTZ, 1998).

Os resíduos fosfoseril das caseínas se ligam fortemente ao ferro (EMERY, 1992), tornando-se solúveis no pH alcalino do duodeno (BOUHALLAB; LÉONIL; MAUBOIS, 1991), o que previne a liberação do ferro durante a digestão, melhorando sua absorção (HURRELL, 1997).

### 1.5 Proteínas de soja

Aproximadamente 80 a 90% das proteínas totais da soja são de reserva, precipitáveis em pH 4,5 a 5,5. São insolúveis em água em seu ponto isoelétrico, mas se dissolvem em água ou soluções salinas diluídas, em valores de pH acima ou abaixo de seu ponto isoelétrico. Constituem uma mistura de macromoléculas de tamanhos, densidade de carga e estruturas diferentes, podendo ser separadas por ultracentrifugação em quatro frações, com velocidades de sedimentação equivalentes a 2, 7, 11 e 15S. As frações 7S e 11S perfazem 70% da proteína total da soja. O restante sedimenta com as frações 2S e 15S. A globulina 11S, também denominada glicinina representa cerca de um terço do total das proteínas da soja. A fração 15S apresenta peso molecular acima de meio milhão com base na velocidade de sedimentação (MESSINA, 1999).

O fracionamento dos componentes 2S e 7S revelou a existência de várias proteínas. A fração 2S é composta por vários inibidores de tripsina, citocromo C, alantoinase, mais duas globulinas isentas de atividade biológica. A fração 7S representa mais de um terço do total das proteínas de soja, sendo formada de pelo menos quatro proteínas importantes: beta-amilase, lectina, lipoxigenase e

globulina 7S. Existem várias formas de lectina e de lipoxigenase. Embora desprovida de atividade biológica, as globulinas 7S, da mesma forma que as lectinas, são classificadas como glicoproteínas (LIENER, 1994).

Quando a farinha de soja desengordurada, suspensa em uma solução a 20% de sacarose em pH 5,0, é centrifugada em um gradiente de sacarose, obtêm-se os corpúsculos protéicos na forma de “pellets” e um homogenado solúvel em pH 5,0, semelhante em composição protéica, às proteínas solúveis obtidas pela precipitação isoeletrica. A fração solúvel em pH 5,0 contém a fração 2S e porções da fração 7S. Os corpúsculos protéicos contêm elevada proporção da fração 7S, toda a fração 11S e pequena quantidade da fração 2S (SGARBIERI, 1996).

A fração 7S ( $\beta$ -conglucina) é uma glicoproteína trimérica que apresenta PM entre 140-180kDa, consistindo de três subunidades. Sua estrutura quaternária é constituída de nove resíduos amino-terminais, possuindo nove polipeptídios na molécula. Essas subunidades são associadas através de ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. Essa fração possui menor quantidade de cisteína, metionina, triptofano e treonina do que a globulina. As ligações cruzadas dissulfídicas são limitadas pela presença de apenas 2 a 3 grupos de cisteína por mol de proteína (ARRESE et al., 1991).

### **Propriedades físico-químicas**

Quando a farinha de soja desengordurada é dispersa em água destilada (pH 6,5), observa-se solubilidade quase máxima das proteínas. Elevando-se a acidez pela adição de ácido, a solubilidade decresce atingindo um mínimo em pH 4-5, região do ponto isoeletrico. Em pHs mais baixos as proteínas se tornam eletricamente positivas e se redissolvem. A elevada capacidade de extrair as proteínas de soja com água indica que as membranas fosfolipídicas que envolvem os corpúsculos protéicos são facilmente rompidas, liberando as proteínas. As proteínas de soja quando úmidas ou em soluções mostram-se sensíveis ao

tratamento térmico e são rapidamente insolubilizadas ao serem tratadas com vapor (SGARBIERI, 1996).

A fração 11S apresenta estrutura hexamérica com peso molecular aproximado de 360kDa. A estrutura quaternária é estabilizada por interações eletrostáticas, hidrofóbicas e pontes de hidrogênio entre os seus polipeptídios A (ácido) e B (básico), formando a subunidade AB. Logo, as propriedades de superfície (formação de espuma e emulsificação) dessa proteína são limitadas por sua conformação globular muito compacta, baixa hidrofobicidade superficial e pequena flexibilidade molecular (WAGNER; GUÉGUEM, 1995).

A glicinina e a  $\beta$ -conglucina são proteínas oligoméricas complexas, onde o estado de associação-dissociação e a estabilidade térmica são altamente dependentes do pH e da força iônica (PETRUCELLI; AÑÓN, 1994).

A desnaturação térmica conduz à dissociação da proteína em subunidades, ao desdobramento de sua estrutura e à exposição de seus grupos hidrofóbicos. A desnaturação de suas frações depende de diversas condições como pH, força iônica, presença de grupamentos sulfidrilas, tempo de aquecimento e taxa de aquecimento e resfriamento (PETRUCELLI; AÑÓN, 1995).

Quando a glicinina é aquecida a 100°C, aproximadamente 50% é convertida rapidamente em agregado solúvel e com a manutenção do aquecimento, este agregado solúvel aumenta de tamanho e se precipita. O precipitado é formado por polipeptídio básico, enquanto que o polipeptídio ácido permanece solúvel (MORI; NAKAMURA; UTSUMI, 1982).

O aquecimento promove a dissociação da fração 7S em subunidades, assim permanecendo, a menos que sejam adicionados sais ao sistema. Este comportamento também foi observado para a fração 11S, onde o tratamento térmico conduzido na presença da fração 7S, inibiu a formação de agregados do polipeptídio B-11S, como conseqüência da associação preferencial entre a

subunidade  $\beta$ -7S e o polipeptídeo B-11S (IWABUCHI; WATANABE; YAMAUCHI, 1991).

Tratamentos térmicos intensos (98°C/30') e alta concentração de proteína (10%) em pH 7 ou 9 resultam em agregação e perda da solubilidade. As globulinas 7S e 11S são completamente desnaturadas, formando agregados das subunidades AB-11S ligados por pontes dissulfídicas e formação de agregados entre  $\beta$ -7S e B-11S. Em tratamentos térmicos menos intensos (80°C/6') em pH 7 e 4% de concentração protéica, há aumento da solubilidade e de hidrofobicidade superficial, fato atribuído à desnaturação total da fração 7S e parcial da fração 11S. O aumento de pH de 9 para 10 ou a presença do agente redutor Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> também favorecem a agregação entre a subunidade  $\beta$  da fração 7S e o polipeptídeo B da glicinina. A interação entre a subunidade  $\beta$ -7S e o polipeptídeo B-11S requer um aumento de sulfidrilas livres, o que pode ser obtido com a adição de agentes redutores durante o tratamento térmico ou por aumento de pH. Inicialmente, este agregado é estabilizado por interações hidrofóbicas e posteriormente por pontes dissulfetos (PETRUCCELI; AÑÓN, 1995).

O estado de associação-dissociação das frações protéicas da soja é influenciado pela força iônica e por variações de pH. Em pH 7,6 e força iônica 0,5, as estruturas das frações 7S e 11S são muito compactas apresentando-se nas formas trimérica e hexamérica, respectivamente. A subunidade  $\beta$ -7S em valores de força iônica acima de 0,5 apresenta forma trimérica, enquanto que, abaixo de 0,2 exibe a forma hexamérica (9S e 10S). Entretanto, entre a faixa de 0,2-0,5, ambas as formas coexistem em equilíbrio numa ampla faixa de pH (4,8-11,0). Em valor de força iônica extremamente baixo e pH ácido, a subunidade  $\alpha$  dissocia-se do trímero, configurando-se nas formas 2S e 5S. Do mesmo modo, com força iônica acima de 0,5, a glicinina está na forma hexamérica - 11S(AB)<sub>6</sub>, que é convertida na forma dodecamérica quando a força iônica é abaixo de 0,1 (LUSAS; RIAZ, 1995).

## **Propriedades nutritivas**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Food and Drug Administration (FDA) têm adotado o PDCAAS (“protein digestibility corrected amino acid scoring”) como método alternativo de avaliação da qualidade nutricional de proteínas, podendo ser utilizado em substituição ao PER (“protein efficiency ratio”) quando a aplicação desse método não for desejável. A qualidade da proteína é estimada efetuando-se comparação entre o teor de aminoácidos da proteína analisada e as recomendações da Food Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) para os aminoácidos essenciais, sendo os valores corrigidos para digestibilidade. Alguns produtos protéicos de soja apresentam o PDCAAS igual ou próximo a 1, o maior valor possível (SAWAR; McDONOUGH, 1990). O alto PDCAAS encontrado para a proteína de soja está de acordo com estudos de balanço de nitrogênio efetuados, provando que a proteína de soja é capaz de suprir as necessidades de aminoácidos, quando utilizada como única fonte de proteínas da dieta, nos níveis recomendados de ingestão (YOUNG, 1991). A digestibilidade dos produtos de soja é boa. O tofu, os concentrados e isolados protéicos apresentam digestibilidade acima de 90% (SYNDER; KWON, 1987).

## **Propriedades funcionais tecnológicas**

Além das características nutricionais apresentadas pela soja e por seus derivados, os produtos protéicos de soja são muito utilizados por suas características funcionais. As proteínas da soja exibem características que permitem a sua utilização em alimentos, tais como, retenção de água, textura, capacidade ligante, coesão, palatabilidade, dentre outras (CHILDS, 1995).

Vários ingredientes protéicos de soja podem ser utilizados em produtos de panificação. Farinhas de soja ricas em enzimas são utilizadas para melhorar a resistência da mistura e ajudar na brancura do pão. A farinha de soja é incorporada na formulação para substituir 3-5% de farinha de trigo na produção de pães, sem alterar a formulação, apenas incorporando mais água. Pode melhorar a

absorção e a retenção de água, possibilitando melhor manuseio da massa, firmeza e elasticidade, melhorando a cor da crosta e mantendo o produto fresco por mais tempo (GIESE, 1994; KLEIN; PERRY; ADAIR, 1995).

A soja não contém prolaminas, proteínas solúveis em álcool semelhantes à gliadina, nem proteínas semelhantes a glutenina, proteínas que formam o glúten do trigo. Por esse motivo as proteínas e a farinha de soja não apresentam as propriedades do trigo de formar massa visco-elástica. A farinha de soja não pode ser usada em substituição à farinha de trigo em quantidade muito superior a 5% na confecção de pães (SGARBIERI, 1996).

A aplicação da soja em alimentos tradicionais é cada vez maior e pela simples mesclagem a níveis adequados, o produto de soja reduz o custo e complementa os produtos tradicionais, devido às suas propriedades funcionais. As proteínas da soja auxiliam na formação e estabilidade nas emulsões óleo-água. Elas são tensoativas, agrupam nas interfaces óleo-água estabilizando as emulsões. Na absorção de gordura, as proteínas da soja permitem a sua retenção, reduzindo as perdas em diversas etapas do processamento e consumo e ajudam a manter as dimensões originais dos alimentos evitando seu encolhimento. As proteínas de soja contêm regiões polares ao longo de suas moléculas o que facilita a absorção de água, mantendo-as no produto final, características estas importantes, por exemplo, em iogurte e análogos de carnes. A capacidade de melhorar a textura é talvez a propriedade mais importante das proteínas de soja, pois no iogurte, por exemplo, as suas propriedades geleificantes conferem melhor textura ao produto (ENDRES, 2001).

As lecitinas da soja são muito utilizadas como emulsificantes. Os fosfolipídios têm uso potencial como ingrediente na formulação de cereais, tabletes ou barras de doces e bebidas não alcoólicas (CHILDS, 1995).

Os polissacarídios solúveis, além do enriquecimento das fibras, podem ser usados como emulsificantes, adesivos e estabilizantes. Estes ingredientes podem ser usados em iogurte líquido, emulsões aromáticas, aromas em pó, pães,

alimentos fortificados com fibras e outros produtos. Dissolvem-se facilmente na água quente ou fria sem formar géis, permitindo a preparação de soluções aquosas, com 30% ou mais de concentração; possuem uma baixa viscosidade, são resistentes ao calor e aos ácidos e pouco afetadas pelos sais. Películas transparentes comestíveis e solúveis em água podem ser preparadas em soluções aquosas (HOLLINGSWORTH, 1998; PSZEZOLA, 1999; SOY INGREDIENTS, 1999).

Produtos fermentados da soja como farinhas podem ser usados para melhorar o sabor, o aroma e o paladar de molhos, lanches, produtos à base de queijos e alimentos assados. Também, contribuem para acentuar o sabor de pimentas e condimentos e ajudam na substituição de gordura acentuando a percepção de cremosidade (PSZEZOLA, 1999).

### **Propriedades funcionais fisiológicas**

A soja desempenha papel importante na prevenção de enfermidades crônicas, como o câncer, doenças coronarianas, osteoporose e doenças renais. Dentre os agentes benéficos, estão os inibidores de proteases, os fitatos, as saponinas e as isoflavonas (ANDERSON; WOLF, 1995; MESSINA, 1995),.

As isoflavonas ou isoflavonóides são compostos pertencentes à classe dos fitoestrógenos, apresentando propriedades antioxidantes extensivamente pesquisadas pelo seu potencial em reduzir os riscos de problemas crônicos de saúde, tais como câncer, doenças coronárias e osteoporose. As principais isoflavonas encontradas na soja e em seus derivados são a daidzeína, a genisteína e a gliciteína. Do total das isoflavonas, dois terços são de glicosídios conjugados de genisteína, sendo o restante composto por conjugados de daidzeína e pequenas quantidades de gliciteína. Nos produtos fermentados de soja, predominam não só a genisteína, mas também a daidzeína, devido à ação das glicosidases bacterianas (SETCHELL, 1998).

Alguns efeitos fisiológicos apresentados pelo uso da soja e de seus produtos são apresentados a seguir.

- *Ação hipocolesteremiante*

O uso da proteína de soja é indicado como alternativa não-farmacológica para redução do colesterol. A proteína de soja, incorporada a uma dieta baixa em gorduras, pode reduzir as concentrações de colesterol total e das lipoproteínas de baixa densidade (GOLDBERG, 1995; KRITCHEVSKY, 1995).

As isoflavonas possuem propriedades antioxidantes e podem eliminar radicais livres, auxiliando na prevenção da oxidação da LDL-colesterol, ligada à formação de placas ateroscleróticas que espessam as paredes das artérias. O uso de soja pode auxiliar no combate às doenças cardiovasculares (WITZUM, 1994; TRABER, 1997). Populações que consomem habitualmente dietas ricas em soja e seus produtos, apresentam menor taxa de mortalidade por doenças coronarianas (LICHTENSTEIN, 1998). A genisteína da soja exerce papel importante contra a formação de placas ateroscleróticas, inibindo a adesão de células, alterando a atividade do fator de crescimento, inibindo, assim, a proliferação de células envolvidas na formação da lesão (RAINES; ROSS, 1995). Esses dados foram confirmados por Wilcox e Blumenthal (1995) que afirmaram ainda que a genisteína é capaz de inibir a formação da trombina e a ativação de plaquetas "in vitro".

Estudos efetuados por Anthony, Clarkson e Hughes (1996) demonstraram que as isoflavonas desempenham papel importante na regulação das lipoproteínas, reduzindo a LDL e aumentando a HDL-colesterol, além de proteger contra placas de ateroma.

Assume-se que as saponinas da soja não constituem um verdadeiro fator antinutricional, podendo provocar efeitos positivos. Há estudos que atestam sua capacidade de provocar a diminuição nos níveis de colesterol sérico em ratos,

efeito atribuído a complexação das saponinas com ácidos biliares, resultando em diminuição de sua reabsorção no intestino (LIENER, 1994).

O efeito hipocolesteremiante apresentado pela proteína de soja foi demonstrado em humanos e animais. Dentre os possíveis mecanismos responsáveis por esse efeito, encontra-se o aumento na excreção dos ácidos biliares, principalmente em ratos e coelhos. Neste caso, há uma alteração no metabolismo hepático de colesterol e aumento na síntese de ácidos biliares. A biossíntese de colesterol aumenta com a diminuição da atividade dos receptores de LDL. Como resultado, há um aumento na remoção do colesterol sérico, via receptor LDL, e deste modo, há redução em suas concentrações, particularmente da fração LDL. É provável que o efeito redutor de colesterol apresentado pela soja resulte da ação combinada de seus componentes (proteínas, aminoácidos e peptídios, saponinas, ácido fítico, inibidores de tripsina, fibras e isoflavonóides) promovendo uma situação em que o metabolismo de colesterol é alterado resultando em diminuição das concentrações séricas (POTTER, 1995).

O efeito hipocolesteremiante das proteínas de soja versus caseína pode ser explicado pelo estímulo na excreção fecal de ácidos biliares e esteróides neutros (BEYNEN, 1990). Isso foi observado com coelhos e ratos, embora pesquisas efetuadas com outras espécies, incluindo humanos, tenham sido menos consistentes. Em estudos efetuados com aminoácidos simulando a composição da proteína intacta, notou-se uma diminuição nas concentrações de colesterol sérico, embora menos pronunciada do que usando a proteína intacta, sem influenciar a excreção biliar (POTTER, 1995).

As fibras presentes na soja, tanto as solúveis quanto as insolúveis, apresentam vantagens para a saúde e podem ajudar a evitar o câncer de cólon. A fibra solúvel pode diminuir o colesterol e ajudar a reduzir o teor de glicose do sangue. As pesquisas têm demonstrado que uma dieta rica em fibras pode ajudar a reduzir o teor de colesterol, melhorar e reduzir o risco de algumas doenças (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001).

- *Ação anti-câncer*

Vários componentes da soja apresentam efeito anticâncer: os inibidores de proteases tipo Bowman-Birk, as isoflavonas, os ácidos fenólicos e fítico, e as saponinas (MESSINA; BARNES, 1991; MESSINA, 1999). Desses, as isoflavonas e os inibidores de proteases são os mais investigados (KENNEDY, 1995).

As primeiras evidências de que a soja pode diminuir o risco de câncer de mama vieram de estudos com animais (TROLL et al., 1980; HAWRYLEWITZ; HUANG; BLAIR, 1991). Esses dados foram revistos e publicados (MESSINA et al., 1994; BARNES, 1995; 1997). Há também evidências de efeito na redução do risco de câncer de próstata, em animais (POLLARD; LUCKERT, 1997; DALU et al., 1998; GELLER et al., 1998), efeitos do inibidor de protease de Bowman-Birk (KENNEDY et al., 1996) e da genisteína em modelos de câncer cólon intestinal (PEREIRA et al., 1994), embora no último caso, esses efeitos sejam contestados (RAO et al., 1997). Os efeitos da soja em câncer de intestino são limitados ao inibidor de Bowman-Birk (WITSCHI; KENNEDY, 1989).

O tempo de exposição aos componentes anticâncer da soja é determinante dos efeitos. A genisteína suprime tumores de mama induzidos em ratas com o 7,12-dimetilbenzantraceno, após 6 meses de exposição, em 50% (LAMARTINIERI et al., 1995a; 1995b; MURRILL et al., 1996). Quando a genisteína foi administrada a partir de 35 dias de idade, a redução de tumores foi de 27% (CONSTANTINO; MEHTA; VAUGHAN, 1996).

Estudos epidemiológicos indicam que populações que consomem regularmente produtos de soja apresentam menor incidência de câncer de mama, cólon e próstata (MESSINA et al., 1994; KENNEDY, 1995). A incidência é particularmente baixa para cânceres dependentes de hormônios, o que levou a investigações dos possíveis efeitos dos fitoestrógenos no câncer. Mulheres com níveis altos de estrógenos apresentam maior risco de câncer de mama. Os

fitoestrógenos podem se ligar aos receptores de estrógenos, agindo como antiestrogênicos e reduzindo os riscos de câncer (ZAVA; DUWE, 1997).

As isoflavonas apresentam outros efeitos anticâncer (WEI; WEI, 1993). Estudos “in vitro” demonstraram que a genisteína inibiu a tirosina quinase e, por conseguinte, a proliferação celular e a angiogênese. (FRITZ et al., 1998). Outros estudos “in vitro” mostraram que a genisteína foi capaz de inibir o crescimento de células humanas de tumores de próstata (PETERSON; BARNES, 1993) e de câncer de mama (PETERSON; BARNES, 1991; ZAVA; DUWE, 1997).

A genisteína é a única isoflavona que apresenta efeito potencial na inibição de células cancerígenas em concentrações fisiológicas, sendo que a daidzeína só exerce algum efeito se combinada com a genisteína (ZAVA; DUWE, 1997). É eficientemente absorvida no intestino e, apesar dos níveis sanguíneos serem insuficientes para inibir o crescimento de um câncer de mama estabelecido via mecanismos quimioterapêuticos, são suficientes para regular a proliferação de células epiteliais em câncer, podendo exercer efeito quimiopreventivo (BARNES et al., 1996).

O consumo de dietas contendo proteína de soja inibiu o crescimento de diversos tumores em ratas. Esse efeito inibidor foi atribuído aos fitoestrógenos e aos inibidores de proteases. Estudos recentes indicam que outros fatores, inerentes aos produtos protéicos de soja, podem contribuir, também, para a inibição da tumorigênese, especialmente a deficiência de metionina. A metástase de um tumor pulmonar foi inibida em animais alimentados com proteína de soja, efeito revertido quando fortificaram a dieta com metionina. O mesmo aconteceu com tumores mamários, quando a caseína da dieta foi substituída por isolado protéico de soja (HAWRYLEWICS; ZAPATA; BLAIR, 1995).

A genisteína, como agente quimiopreventivo do câncer, foi testada especialmente em um modelo experimental de câncer de cólon induzido com azoximetano, mostrando-se capaz de promover inibição de células cancerosas (BARNES, 1995; STEELE et al., 1995). Resultados similares foram obtidos com o

uso do mesmo agente carcinogênico em ratos que receberam genisteína. Houve redução significativa na multiplicidade e a invasão total de adenocarcinoma no cólon (RAO et al., 1997).

Rao e Sung (1995) consideraram que a natureza da estrutura química das saponinas seja responsável pelo efeito anticâncer. O mecanismo proposto envolveria citotoxicidade direta, efeitos imunomoduladores e a normalização da proliferação de células cancerígenas induzidas.

- *Fitoestrógenos e saúde óssea*

A osteoporose ocorre quando a taxa de degradação óssea dos osteoclastos excede a sua formação. Vários estudos epidemiológicos sugerem que a incidência de osteoporose pós-menopausa é menor na Ásia que no ocidente. Em parte, essa diferença pode ser explicada pela alta ingestão de produtos de soja por asiáticos (POTTER et al., 1998). Por outro lado, estudos conduzidos com animais demonstraram que altas doses apresentaram menores benefícios e baixas doses resultaram em melhoria na retenção de massa óssea (MOLTENI; BRIZIO-MOLTENI; PERSKY, 1995). Em outro estudo com animais, extratos enriquecidos com isoflavonas aumentaram a densidade óssea (ANDERSON; AMBROSE; GARNER, 1998). Mulheres tratadas durante 6 meses com preparações de soja enriquecidas com isoflavonas, apresentaram melhoria na densidade óssea (POTTER et al., 1998).

Estudos “in vitro” confirmaram essas evidências e estenderam os conhecimentos a respeito da resposta bifásica observada em animais, estabelecendo que a genisteína e o estradiol, em altas concentrações, são tóxicos às células ósseas, enquanto em baixas concentrações aumentam a produção de biomarcadores ósseos (ANDERSON; AMBROSE; GARNER, 1998). Vários mecanismos de ação foram propostos para explicar a ação das isoflavonas no tecido ósseo, prevenindo a osteoporose. Osteoblastos e osteoclastos são células

alvo para ação da genisteína e da daidzeína. Estudos em culturas de células sugerem que a genisteína combina-se com receptores de estrógenos, exercendo seus efeitos pelo mesmo mecanismo que o hormônio (WILLIAMS; JORDAN; BARNES, 1998).

Os efeitos também podem ser exercidos por outros mecanismos, independentes dos receptores de estrógenos. Alguns pesquisadores sugerem que a genisteína inibe a topoisomerase II, interferindo com a progressão do ciclo celular. Outros sugerem a ativação de receptores peptídicos ligados à membrana, iniciando outros efeitos independentes de estrógenos. Os osteoclastos são dependentes da atividade de receptores tirosina quinase (PTK). A genisteína e a daidzeína são inibidoras de PTK, podendo agir por esse mecanismo (WILLIAMS; JORDAN; BARNES, 1998).

Outros estudos efetuados com mulheres que receberam isoflavonas resultaram em melhoria na densidade e conteúdo mineral dos ossos. Os efeitos das isoflavonas na perda óssea foram testados em ratas ovariectomizadas. A daidzeína promoveu efeito preventivo na perda óssea por supressão do “turnover” ósseo e a genisteína exerceu efeito diferente (ERDMAN; STILLMAN; LEE, 1996).

#### 1.6 Proteínas do leite e da soja como ingredientes de alimentos fisiologicamente funcionais

As doenças associadas à dieta como as coronarianas, o câncer, o derrame cerebral e o diabetes, concorrem para explicar mais de 55% das mortes em muitos países ocidentais, incluindo os Estados Unidos e Austrália. Além disso, os custos de cuidados com a saúde associados a essas doenças são altos (SMITHERS et al., 1996).

Sabe-se que a dieta é capaz de modular funções específicas no organismo, promovendo efeitos fisiológicos e psicológicos benéficos, que vão além dos nutricionais, modulando funções relevantes na promoção do bem-estar, da saúde e na redução do risco de doenças (DIPLOCK et al., 1999).

Os alimentos funcionais podem ser produzidos por meios tecnológicos ou biotecnológicos que venham a aumentar a concentração, adicionar, remover ou modificar um componente em particular, bem como aumentar a biodisponibilidade do componente que tenha efeitos funcionais demonstrados (ROBERFROID, 1999; 2000).

Várias características da composição de aminoácidos das proteínas de soro de leite bovino são altamente desejadas para a elaboração de fórmulas infantis, como por exemplo: a relação para cisteína/metionina (~ 1,0); teores mínimos de aminoácidos aromáticos, particularmente fenilalanina e tirosina, favorecendo crianças com fenilcetonúria (HAMBRAEUS, 1982); elevados teores de aminoácidos essenciais de cadeia ramificadas, particularmente leucina e isoleucina, considerados importantes para o desempenho de esportistas (STEELE; HARPER, 1990). Estudos demonstram que a ingestão de teores elevados de aminoácidos ramificados auxiliam na recuperação de traumas múltiplos (BRENAN et al., 1986) e de queimaduras (ALEXANDER; GOTTSCHLISH, 1990).

Os componentes biologicamente ativos do leite bovino podem ser incorporados em alimentos funcionais promotores de saúde, destinados à alimentação humana. Esses componentes incluem os moduladores das funções digestivas, gastrointestinais e hemodinâmicas (FIAT; MIGLIORE-SAMOUR; JOLLÈS, 1993; SCHLIMME; MEISEL, 1995); hormônios e fatores de crescimento capazes de influenciar no desenvolvimento do trato gastrointestinal e de outros órgãos específicos (PORTER; WILES; FRAWLEY, 1993; KOLDOVSKY, 1996); imunoregulação (ELLIS; MASTRO; PICCIANO, 1996); defesa não imune a doenças e modulação da microflora intestinal (ELLISON, 1994; NUIJENS; VAN BERKEL; SCHANBACHER, 1996; SCHAMBACHER et al., 1998).

Do ponto de vista nutricional e metabólico, a caseína, ao contrário das proteínas do soro, apresentam a propriedade de coagular e permanecer mais tempo no estômago originando um certo retardamento na passagem do estômago para o intestino e assim, na digestão e absorção de seus aminoácidos (BOIRIE et

al., 1997). O comportamento metabólico das caseínas e das proteínas do soro difere fundamentalmente quanto à velocidade de digestão e absorção de aminoácidos. As proteínas do soro, por serem digeridas e absorvidas rapidamente e apresentarem composição de aminoácidos bem diferentes das caseínas, estimulam mais intensamente que as caseínas a síntese de proteínas nos órgãos e tecidos. Por outro lado, as caseínas apresentaram um efeito conservador das proteínas do organismo, diminuindo a intensidade do catabolismo protéico (FRÜHBECK, 1998).

Os diferentes perfis de aminoácidos das caseínas e das proteínas de soro podem estimular de maneira diferente a síntese e a degradação de proteína devido às diferenças na secreção de insulina e glucagon. A possibilidade de aumentar a síntese e inibir a degradação de proteínas de maneira seletiva representa muitas possibilidades terapêuticas a serem usadas com pacientes que apresentam perdas de proteína corporal. Uma das metas do suporte nutricional de pacientes com grandes queimaduras, AIDS, trauma ósseo ou falência múltipla de órgãos é minimizar a perda de proteína corporal. Como a perda acelerada de proteína do corpo pode ser diminuída ou revertida por administração de proteínas específicas, é possível oferecer um suporte nutricional efetivo aos pacientes em estado crítico. Além disso, o conceito de proteínas de digestão e metabolização lenta e rápida, pode ser aplicado quando altas concentrações de aminoácidos no plasma forem prejudiciais ao paciente, como acontece em casos de insuficiência renal ou encefalopatia hepática (BOIRIE et al., 1997).

A adequação nutricional de produtos protéicos de soja já foi bem demonstrada em fórmulas infantis, quando as necessidades de proteínas e de outros nutrientes são críticas. Representam uma fonte alternativa de proteínas em caso de alergia à proteína do leite bovino (BUSINCO et al., 1992; LUSAS; RIAZ, 1995). Esses produtos fornecem fibras, que atuam no controle do colesterol sanguíneo, podendo agir na prevenção de câncer de cólon e no aumento na tolerância à glicose (ENDRES, 2001). As fibras solúveis reduzem a quantidade de colesterol no sangue minimizando o risco de doenças cardiovasculares, enquanto

as insolúveis aumentam o volume das fezes com melhoria das condições intestinais (ESTEVES; MONTEIRO, 2001).

### 1.7 Referências bibliográficas

AÎT-OUKHATAR, N.; BOUHALLAB, S.; ARHAN, P.; MAUBOIS, J. L.; DROSDOWSKY, M.; BOUGLÉ, D. L. Iron tissue storage and hemoglobin levels of deficient rats repleted with iron bound to the caseinophosphopeptide 1-25 of  $\beta$ -casein. **Journal of Agriculture and Food Chemists**, Washington, v. 47, n. 7, p. 2786-2790, 1999.

AÎT-OUKHATAR, N.; BOUHALLAB, S.; BUREAU, F.; ARHAN, P.; MAUBOIS, J. L.; BOUGLÉ, D. L. In vitro digestion of caseinophosphopeptide-iron complex. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 67, n. 1, p. 125-129, 2000.

ALEXANDER, J. W.; GOTTSCHLISH, M. M. Nutritional immunomodulation in burned patients. **Critical Care in Medicine**, New York, v. 18, n. 2, p. S149-153, 1990.

ALLARD, J. P.; AHDASSI, E.; CHAU, J.; SALIT, I.; WALMSLEY, S. Oxidative stress and plasma antioxidant micronutrients in humans with HIV infection. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 67, n. 1, p.143-147, 1998.

ANDERSON, J. J.; AMBROSE, W. W.; GARNER, S. C. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized rat model. **Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine**, New York, v. 217, n. 3, p. 345-350, 1998.

ANDERSON, R. L.; WOLF, W. J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 581S-588S, 1995.

ANTHONY, M. S.; CLARKSON, T. B.; HUGHES, C. L. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 126, n. 1, p. 43-50, 1996.

ARRESE, E. L.; SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R.; AÑÓN, M. C. Eletrophoretic, solubility and functional properties of commercial soy protein isolates. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 6, p. 1029-1032, 1991.

BARNES, S. Effects of genistein in *in vivo* and *in vitro* models of cancer growth. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 777S-783S, 1995.

BARNES, S. The chemopreventive properties of soy isoflavonoids in animal models of breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**, Boston, v. 46, n. 2/3, p. 169-179, 1997.

BARNES, S.; SFAKIANOS, J.; COWARD, L.; KIRK, M.; PETERSON, T. G. Soy isoflavonoids, and cancer prevention: underlying biochemical and pharmacological issues. In: BUTRUN, R. (Ed.) **Dietary phytochemicals and cancer prevention**. New York: Plenum, 1996. p. 87-100.

BARUCHEL, S.; WAINBERG, M. A. The role of oxidative stress in individuals infected by the human immunodeficiency virus. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 52, n. 1, p. 111-114, 1992.

BARUCHEL, S.; BOUNOUS, G.; OLIVIER, R.; VIAU, G.; WAINBERG, M. A. Nutraceutical modulation of glutathione with a humanized native milk serum protein isolate, Immunocal™: application in AIDS and cancer. In: MONTAGNIER, L.; OLIVIER, R.; PASQUIER, C. (Ed.). **Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative disease**. New York: Marcel Dekker, 1998.

BEYNEN, A. C. Mode of cholesterolemic action of dietary protein. In: SUGANO, M.; BEYNEN, A. C. (Ed.). **Monographs in atherosclerosis: dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis**. Basel, v. 16. 1990. p. 153-159.

BIGHETTI, A. E. **Atividade Antiulcerogênica do extrato bruto e da Cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schultz Bip.** Campinas, SP: UNICAMP, 1999. 100p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

BIRT, D. F.; BAKER, P. Y.; HRUZA, D. S. Nutritional evaluations of three dietary levels of lactalbumin throughout the lifespan of two generation of Syrian hamsters. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 112, n. 11, p. 2151-2160, 1982.

\_\_\_\_\_; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, San Diego, v. 90, n. 2/3, p. 157-177, 2001.

BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M. P.; MAUBOIS, J. L.; BEAUFRÈRE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academic of Science**, Washington, v. 94, n. 26, p. 14930-14935, 1997.

BOMBARA, N.; PILOSOF, A. M. R.; AÑÓN, M. C. Mathematical model for formation rate and collapse of foams from enzyme modified wheat flours. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, p. 626-628, 1994.

BOUHALLAB, S.; LÉONIL, J.; MAUBOIS, J. L.  $\beta$ -casein phosphopeptide (1-25)-iron complex: action of alcalase and acid fosfatase. **Lait**, Paris, v. 71, p. 435-443, 1991.

BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P. A. L. The effect of dietary amino acids on immune reactivity. **Immunology**, Buenos Aires, v. 35, n. 2, p. 257-266, 1978.

\_\_\_\_\_; STEVENSON, M. M.; KONGSHAVN, P. A. L. Influence of dietary lactalbumin hydrolysate on the immune system of mice and resistance to salmonellosis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 144, n. 3, p. 281-282, 1981.

\_\_\_\_\_; KONGSHAVN, P. A. L. Influence of dietary proteins on the immune system in mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 112, n. 9, p. 1747-1755, 1982.

\_\_\_\_\_; LETORNEAU, L.; KONGSHAVN, P. A. L. Influence of dietary protein type on the immune system of mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 113, p. 1415-1421, 1983.

\_\_\_\_\_; SHENOUDA, N.; KONGSHAVN, P. A. L.; OSMOND, D. G. Mechanism of altered B-cells response induced by changes in dietary protein type in mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 115, n. 11, p. 1409-1417, 1985.

\_\_\_\_\_; KONGSHAVN, P.; GOLD, P. The immunoenhancing property of dietary whey protein concentrate. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 11, n. 4, p. 271-278, 1988.

\_\_\_\_\_; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.

\_\_\_\_\_; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.; GOLD, P. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 16, n. 3, p. 204-209, 1993.

\_\_\_\_\_. **The fascinating story behind a health-promoting product-patented milk serum (whey) protein concentrate**. Scottsdale: Immunotec Clinical Foundation, 1997. 15 p.

BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, Ulrich, v. 20, n. 6C, p. 4785-4792, 2000.

BOURTOURAUULT, M.; BULEON, R.; SAMPEREZ, S.; JOUAN, P. Effect des protéines du lactosérum bovin sur la multiplication de cellules cancéreuses humaines. **Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et des ses Filiales**, Paris, v. 185, n. 5, p. 319-323, 1991.

BRENAN, M. F.; CERRA, F.; DALI, J. M.; FISCHER, J. E., MOLDAWER, L. L.; SMITH, R. J.; WINNARS, E. WANNEMA CHERR, R.; YUNG, V. R. Report on a research workshop: branched-chain amino acids in stress and injury. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Tokyo, v. 10, n. 5, p. 446-452, 1986.

BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. **Life Extension Report**, Life Extension Foundation, Scottsdale, v. 1 p. 21-28, 1996.

BRUNTON, L. L. Fármacos para controle da acidez gástrica e tratamentos de úlceras pépticas. In: HARDMAN, J.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). **GOODMAN e GILMAN:**

as bases farmacológicas da terapêutica. 9. ed. New York: Mc Graw Hill, 1996. p. 663-674.

BUSINCO, L.; BRUNO, G.; GIAMPIETRO, P. G.; CANTANI, A. Allergenicity and nutritional adequacy of soy protein formulas. **Journal of Pediatric**, Stuttgart, v. 121, p. S 21-S28, 1992.

CARIÉ, M. D.; MILANOVIÉ, S. D.; KRISTIÉ, D. M.; TEKIÉ, M. N. Fouling of inorganic membranes by adsorption of whey proteins. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 165, n. 5 pt. 2, p. 83-88, 2000.

CHILDS, N. M. Functional foods and market entry. **The World of Ingredients**, Chicago, v. 1, n. 1, p. 36-39, 1995.

CHOI, Y. S.; IKEDA, I.; SUGAMO, M. The combined effects of dietary proteins and fish oil on cholesterol metabolism in rats of different ages. **Lipids**, Champaign, v. 24, n. 6, p. 506-510, 1989.

CONSTANTINO, A. I.; MEHTA, R. G.; VAUGHAN, A. Inhibition of N-methyl1-N-nitrosourea-induced mammary tumors in rats by the soybean isoflavones. **Anticancer Research**, Ulrich, v. 16, n. 6A, p. 3293-3298, 1996.

CORBETT, T. H.; GRISWOLD, D. P.; ROBERTS. Evaluation of single agents in mouse colon carcinogenesis. **Cancer**, Shanghai, v. 40 (suppl. 5), p.2650-2657, 1977.

DALU, A.; HASKELL, J. F.; COWARD, L.; LAMARTINIERE, C. A. Genistein, a component of soy, inhibits the expression of the EGF and ErbB/Neu receptors in the rat dorsolateral prostate. **Prostate**, Boston, v. 37, n. 1, p. 36-43, 1998.

DAS, D.; BANERJEE, R. K. Effects of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 115-125, 1993.

DIAL, E. J.; LICHTENBERGER, L. M. Milk protection against experimental ulcerogenesis in rats. **Digestive Diseases and Science**, New York, v. 125, n. 2, p. 115-125, 1993.

DIPLOCK, A. T.; AGGETT, P. J.; ASHWELL, M.; BORNET, F.; FERN, E. B.; ROBERFROID, M. B. Scientific concepts of functional foods in Europe Consensus Document. **British Journal of Nutrition**, London, v. 81 (suppl.), p. S1-S27, 1999.

EL-GAZAR, F. E.; MARTH, E. H. Ultrafiltration and reverse osmosis in dairy technology: a review. **Food Protection**, Cacak, v. 54, n. 10, p. 801-809, 1991.

ELLIS, L.; MASTRO, A. M.; PICCIANO, M. F. Milk-borne prolactin and neonatal development. **Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia**, New York, v. 1. n. 3, p. 259-269, 1996.

ELLISON, R. T. The effects of lactoferrin on gram-negative bacteria. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 357, p. 71-90, 1994.

EMERY, T. Iron oxidation by casein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 182, p. 1047-1052, 1992.

ENDRES, J. G. **Soy protein products**: characteristics, nutritional aspects, and utilization. Champaign: AOCS, 2001. 53 p.

ENKER, W. E.; JACOBITZ J. L. Experimental carcinoma of the colon induced by 1,2-dimethylhydrazine: value as a model of human disease. **Journal of Surgical Research**, San Diego v.21, n. 4, p. 291-296, 1976.

ENNIS, B. M.; JOHN, J. E. M.; O'CONNELL, M. T. The Effect of the Replacement of Calcium with Sodium on the Ultrafiltration of Acid Whey. **New Zealand Journal Dairy Science Technology**, Wellington, v. 15, p. 69-78, 1981.

ERDMAN Jr., J. W.; STILLMAN, R. J.; LEE, K. F. Short-term effects of soybean isoflavones on bone in postmenopausal women. In: INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON THE ROLE OF SOY IN PREVENTING AND TREATING CHRONIC DISEASE, 2., 1996, Belgium. **Program and Abstract Book**, Belgium, 1996. p. 21.

ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeito benéfico das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2001.

FIAT, A. M.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; JOLLÈS, P. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on the examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 301-310, 1993.

FIDELUS, R. K.; TSAN, M. F. Glutathione and lymphocyte activation: a function of aging and auto-immune disease. **Immunology**, Buenos Aires, v. 61, n. 4, p. 503-508, 1987.

FRITZ, W.; COWARD, L.; WANG, J.; LAMARTINIERE, C. A. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. **Carcinogenesis**, New York, v. 19, n. 12, p. 2151-2158, 1998.

FRÜHBECK, G. Slow and fast dietary proteins. **Nature**, London, v. 39, p. 843-845, 1998.

GALIZIA, M. S.; WAITZBERG, D.L. Mecanismos de ação dos radicais livres e antioxidantes. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v. 16, p. 79-89, 2001.

GELLER, J.; SIONIT, L.; PARTIDO, C.; LI, L. N.; TAN, X. Y.; YOUNGKIN, T.; NACHTSHEIN, D.; HOFFMAN, R. M. Genistein inhibits the growth of human-patient BPH and prostate cancer in histoculture. **Prostate**, Boston, v. 34, n. 2, p. 75-79, 1998.

GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Technology**, Chicago, v. 48, p. 50-60, 1994.

GLOVER, F. A. **Ultrafiltration and reverse osmosis for the dairy industry**. England Reading, National Institute for Research in Dairying, 1985. 207p.

GOLDBERG, A. C. Perspectivas de la proteína de soya como propuesta no-farmacológica para reducir el colesterol. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 675S- 678S, 1995.

GOODMAN R. E.; SCHAMBACHER, F. L. Bovine lactoferrin in RNA: sequence, analysis, and expression in the mammary gland. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 180, n. 1, p. 75-84, 1991.

GRIMBLE, R. F. Nutritional Influences on Inflammation. *In*: BISTRAN, B.R.; WALKER-SMITH, J.A. **Inflammation Bowel Diseases**. Nestlé Nutrition Workshop Series Clinical and Performance Programme. Vevey: Nestlé Ltda, v. 2, p. 63-81, 1999.

HAKANSON, A.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; SABHARWAL, H.; SVANBORG, C. Apoptosis induced by a human milk protein. **Proceedings of the National Academic of Science**, Washington, v. 92, p. 8064-8068, 1995.

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

HANEMA-AIJER, J. H.; ROBERTSEN, T.; BOOMGAARD, TH. VAN DEN; GUNNINK, J. W. Fouling of Ultrafiltration Membranes. The Role of Protein Adsorption and Salt Precipitation. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 40, p. 199-217, 1989.

HAWRYLEWITZ, E. J.; HUANG, H. H.; BLAIR, W. H. Dietary soybean isolate and methionine supplement affect mammary tumor progression in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 121, p. 1693-1698, 1991.

\_\_\_\_\_; ZAPATA, J. J.; BLAIR, W. H. La soya y el cáncer experimental: estudios com animales. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 698S-708S, 1995.

HAYES, J. F.; DUNHERLEY, J. A.; MULLER, L. L.; GRIFFIN A. T. Studies on whey processing by ultrafiltration II. Improving permeation rates by preventing fouling. **Australian Journal of Dairy Technology**, North Melbourne, v. 29, n. 3, p. 132-140, 1981.

HERZENBERG, L.; DE ROSA, S.; DUBS, G.; ROEDERER, M.; ANDERSON, M. T.; ELA, S. W.; DERESINSKI, S. C.; HERZENBERG, L. A. Glutathione deficiency associated with impaired survival in HIV disease. **Proceeding of the National Academy of Science**, Washington, v. 94, n. 5, p. 1967-1972, 1997.

HIRAIISHI, H.; TERANO, A.; OTA, S.; MUTOH, H.; SUGIMOTO, T.; HARADA, T.; RAZANDI, M.; IVEY, K. J. Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathione. **Gastroenterology**, Amsterdam, v. 106, n. 5, p. 1199-1207, 1994.

HOLLINGSWORTH, P. Food priorities for an aging America. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 5, p.38-90, 1998.

HOLT, C. The milk salts and their interaction with casein. In: FOX, P. F. (Ed.) **Advanced Dairy Chemistry 3**, London: Chapman e Hall, 1997. p. 233-256.

HORTON, B. S. Whey processing and utilization. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Philadelphia, n. 308, p.1-6, 1996.

HUFFMAN, L. M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 49-52, 1996.

\_\_\_\_\_; HARPER, J. Symposium: marketing dairy value through technology. Maximizing the value of milk through separation technologies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, n. 82, p. 2238-2244, 1999.

HULTBERG, B.; ANDERSON, A.; ISAKSSON, A. Thiol and redox reactive agents exert different effects on glutathione metabolism in HeLa cell cultures. **Clinica Chymica Acta**, Amsterdam, v. 283, n. 1-2, p. 21-32, 1999.

HURRELL, R. F. Bioavailability of iron. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 51 (suppl.), p. S4-S8, 1997.

IWABUCHI, S.; WATANABE, H.; YAMAUCHI, F. Termal denaturation of b-conglycinin: kinetc resolution of reaction. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington DC, v. 39, p. 27-33, 1991.

JACOBUCCI, H. B. **Características nutricionais e efeito sobre lipídios sangüíneos e hepáticos das proteínas de lactosoro e caseinato de sódio, comparados à caseína e proteínas de soja, comerciais**. Campinas, SP: UNICAMP, 1999. p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, 1999.

\_\_\_\_\_; SGARBIERI, V. C.; DIAS, N. F. G. P.; BORGES, P. Z.; TANIKAWA, C. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and protein and liver cholesterol. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 21, p. 905-915, 2001.

JELEN, P; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G. (Ed.). **Functional Foods**. Lancaster:Technomic, 1998. p. 357-380.

JENNESS, R. Composition of milk. In: WONG, N. P. (Ed.) **Fundamental of Dairy Chemistry**. New York : Van Nostrand, 1988. 768p.

JOST, R. Functional characteristics of dairy proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 4, n. 9, p. 283-288, 1993.

KAPLOWITZ, N.; AW, T. Y.; OOKHEENS, M. The regulation of hepatic glutathione. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 25, p. 715-744, 1984.

KATO, A.; KOBAYASHI, K. Excellent emulsifying properties of protein-dextran conjugates. In: **Microemulsions and emulsions in food**. ACS Symposium Series 448, p. 213-229, 1991.

KENNEDY, A. R. Evidencia de que los productos de soya son agentes preventivos contra el cáncer. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 733S-743S, 1995.

\_\_\_\_\_ ; BEAZER-BARCLAY, Y.; KINZLER, K. W.; NEWBERNE, P. M. Suppression of carcinogenesis in the intestines of mice by the soybean-derived Bowman-Birk inhibitor. **Cancer Research**, Moscow, v. 56, p. 679-682, 1996.

KIM, S. H.; MORR, C. V.; SEO, A.; SURAK, J. G. Effect of whey pretreatment on composition and functional properties of whey protein concentrate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, n. 1, p. 25-29, 1989.

KINSELLA, J. E. Milk proteins: physico-chemical and functional properties. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, Florida, v. 21, n. 3, p. 197-262, 1984.

KINSELLA, J. E.; RECTOR, D. J.; PHILLIPS, L. G. Physicochemical properties of proteins: texturization via gelation, glass and film formation. In: YADA, R.Y.; JACKMAN, R.L.; SMITH, J.L. (Eds.). **Protein structure: function relationships in foods**. New York: Blackie Academic, 1994. p. 1-20.

KLEIN, P. B.; PERRY, A. K.; ADAIR, N. Incorporating soy protein into backed products for use in clinical studies. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 666S-674S, 1995.

KOLDOVSKY, O. The potential physiological significance of milk-borne hormonally active substances for the neonate. **Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia**, Netherlands, v. 1, n. 3, p. 17-323, 1996.

KRITCHEVSKY, D. Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 593S-599S, 1995.

LAMARTINIERE, C. A.; MOORE, J.; HOLLAND, M.; BARNES, S. Neonatal genistein chemopreventives mammary cancer. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 208, n. 1, p. 120-123, 1995a.

\_\_\_\_\_; MOORE, J. B.; BROWN, N. A.; THOMPSON, R.; HARDIN, M. J.; BARNES, S. Genistein suppresses mammary in rats. **Carcinogenesis**, New York, v. 16, n. 11, p. 2833-2840, 1995b.

LAPRÉ, J. A.; WEST, C. E.; LOVATI, M. R.; SIRTORI, C. R.; BEYNEN, A. C. Dietary animal proteins and cholesterol metabolism in rat. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, Hamburg, v. 59, n. 1, p. 93-100, 1989.

LAURSEN, I.; BRIAND, P.; LYEKESFELDT, A. E. Serum albumin as a modulator on growth of the human breast cancer cell line, MCF-7. **Anticancer Research**, Ulrich, v.10, n. 2A, p. 343-352, 1990.

LAWSON, M. A. Milk protein as food ingredients. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 101, 1994.

LEE, S.; MORR, C.; HÁ, E. Y. Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 5, p. 1210-1213, 1992.

LEGAWO, A. M.; IMADE, T.; YASUDA, Y.; OKAZAKI, K.; HAYAKAWA, S. Specific disulfide bond in  $\alpha$ -lactalbumin influences heat-induced gelation of  $\alpha$ -lactalbumin-ovalbumin-mixed gels. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, p. 281-285, 1996.

LICHTENSTEIN, A. H. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, n. 10, p. 1589-1592, 1998.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, Flórida, v. 34, p. 31-67, 1994.

LOVATI, M. R.; WEST, C. E.; SIRTORI, C. R.; BEYNEN, A. C. Dietary animal proteins and cholesterol metabolism in rabbits. **British Journal of Nutrition**, London, v. 64, n. 2, p. 473-485, 1990.

LUSAS, E. W.; RIAZ, M. N. Soy proteins products: processing and use. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 573S-580S, 1995.

MANN, E. J. Casein and caseinates. **Dairy Industries International**, Kent, v. 56, n. 2, p. 13-14, 1991.

MARSHALL, K. R. Industrial isolation of milk proteins: whey proteins. In: FOX, P.F. (Ed.). **Developments in dairy chemistry 1**. Proteins. New York: Applied Science, 1982. p. 339-373.

\_\_\_\_\_; HARPER, W. J. Whey Protein Concentrates. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Philadelphia, v. 233, p. 21-32, 1988.

MARTIN, M. J.; LA CASA, C.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; CABEZA, J.; VILLARGAS, J.; MOTILVA, V. Antioxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. **Zeitschrift für Naturforschung**, Mainz, v. 53, n. 1-2, p. 82-88, 1998.

MATSUMOTO, H.; SHIMOKAWA, Y.; USHIDA, Y.; TOIDA, T.; HAYASAWA, H. New biological function of bovine  $\alpha$ -lactoalbumin: protective effect against ethanol and stress-induced gastric mucosal injury in rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 5, p. 1104-1111, 2001.

MATTHEWS, M. E.; DOUGHTY, R. K.; SHORT, J. L. Pretreatment of acid casein wheys to improve processing rates in UF. **New Zealand Journal Dairy Science Technology**, Wellington, v. 13, p. 216-220, 1978.

McINTOSH, G. H.; REGESTER, G. Q.; LE LEU, R. K.; ROYLE, P. J.; SMITHERS, G. W. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 4, p. 809-816, 1995.

\_\_\_\_\_; ROYLE, P. J.; LE LEU, R. K.; REGESTER, G. O.; JOHNSON, M. A.; GRINSTED, R. L.; KENWARD, R. S.; SMITHERS, G. W. Whey protein as functional food ingredients? **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 8, p. 425-434, 1998.

MEHRA, R. K.; DONNELLY, W. J. Fractionation of whey protein components through a large pore size, hydrophilic, cellulosic membrane. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 60, p. 89-97, 1993.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Reviews of Biochemistry**, Palo Alto, v. 52, p. 711-760, 1983.

MELLO, E. M. **Obtenção e caracterização de concentrado protéico de soro de queijo, por ultrafiltração**. Campinas, SP: UNICAMP, 1989. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 1989.

MESSINA, M. J.; BARNES, M. J. The role of soy products in reducing the risk of cancer. **Journal of National Cancer Institute**, Bethesda, v. 83, n. 8, p. 541-546, 1991.

\_\_\_\_\_; PERSKY, V.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Soy intake and cancer risk: A review of the *in vitro* and *in vivo* data. **Nutrition and Cancer**, New Orleans, v. 21, n. 2, p. 113-131, 1994.

\_\_\_\_\_. Aplicaciones modernas de um frijol ancestral: la soya y la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 567S-469S, 1995.

\_\_\_\_\_. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 70 (suppl.), p. 439S-450S, 1999.

MICKE, P.; BEEH, K. M.; SCHLAAK, J. F.; BUHL, R. Oral supplementation with whey proteins increase plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 171-178, 2001.

MING, P. Descrição da indústria de produtos lácteos dos Estados Unidos. **Leite e Derivados**, São Paulo, v. 12, p. 64-68, 2000.

MITCHELL, J. R.; HILL, S. E. The use and control of chemical reactions to enhance the functionality of macromolecules in heat-processed foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 6, p. 219-224, 1995.

MODLER, H. W. Functional properties of nonfat dairy ingredients – a review. Modification of lactose and products containing casein. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, p. 2206-2214, 1985.

MODLER, W. Milk processing. In: NAKAI, S.; MODLER, W. (Ed.). **Food proteins: processing applications**. Willey: VCH, 2000. p. 81-88.

MOLTENI, A.; BRIZIO-MOLTENI, L.; PERSKY, V. *In vitro* hormonal effects of soybean isoflavones. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 751-756, 1995.

MONTAGNIER, L.; OLIVIER, R.; PASQUIER, C. **Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 447-461.

MORENO, Y.M.F. **Influencia das proteínas de soro de leite bovino no estado nutricional, composição corporal e sistema imune em coorte de crianças com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)**. Campinas, SP: UNICAMP, 2002. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) Universidade Estadual de Campinas, 2002.

MORI, T.; NAKAMURA, T.; UTSUMI, S. Gelation mechanism of soybean 11S globulin. Formation of soluble aggregates as transient intermediates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 47, p. 26-30, 1982.

MORR, C. V.; FOEGEDING E. A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. **Food and Technology**, Chicago, v. 44, p. 100-112, 1990.

\_\_\_\_\_; HA, E. W. Whey proteins concentrate and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Florida, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

MURRIL, W. B.; BROWN, N. M.; ZHANG, J. X.; MANZOLILLO, P. A.; BARNES, S.; LAMARTINIERE, C. A. Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. **Carcinogenesis**, New York, v. 17, p. 1451-1457, 1996.

NAGAOKA, S.; KANAMARU, Y.; KUZUYA, Y. Effects of whey protein and casein on the plasma and liver lipids in rats. **Agriculture and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 55, n. 3, p. 813-818, 1991.

NOELLE, R. J.; LAWRENCE, D. A. Determination of glutathione in lymphocytes and possible association of redox state and proliferative capacity of lymphocytes. **Journal of Biochemistry**, Ottawa, v. 198, n. 3, p. 571-579, 1981.

NUIJENS, J. H. B.; VAN BERKEL, P. H. C.; SCHANBACHER, F. L. Structure and biological actions of lactoferrin. **Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia**, Netherlands, v. 1, n. 3, p. 285-294, 1996.

OTTE, J.; JU, Z. Y.; FAERGEMAND, M.; LOMHOLT, S. B.; QVIST, K. B. Protease-induced aggregation and gelation of whey proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, p. 911-915, 1996.

PATRICK, L. Nutrients and HIV: Three-N-acetylcysteine, alpha-lipoic acid, l-glutamine, and l-carnitine. **Alternative Medicine Review**, Idaho, v. 5, n. 4, p. 290-305, 2000.

PEREIRA, M. A.; BARNES, L. H.; RASSMAN, V. L.; KELLOFF, G. V.; STEELE, V. E. Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. **Carcinogenesis**, New York, v. 15, n. 5, p. 1049-1054, 1994.

PÉRÈS, J. M.; BOUHALLAB, S.; BUREAU, F.; NEUVILLE, D.; MAUBOIS, J. L.; DEVROEDE, G.; ARHAN, P.; BOUGLÉ, D. L. Mechanisms of absorption of caseinophosphopeptide bound iron. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 10, p. 215-222, 1999.

PETERSON, G.; BARNES, S. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 179, n. 1, p. 861-867, 1991.

\_\_\_\_\_; BARNES, S. Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. **Prostate**, Boston, v. 22, n. 4, p. 335-345, 1993.

PETRUCELLI, S.; AÑÓN, M. C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 10, p. 2161-2169, 1994.

\_\_\_\_\_; AÑÓN, M. C. Thermal aggregation of soy protein isolates. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 8, p. 2001-2006, 1995.

PINE, M. J. Effect of low phenylalanine diet on murine leukemia L 1210. **Journal of National Cancer Institute**, Bethesda, v. 60, n. 3, p. 633-641, 1978.

POLLARD, M.; LUCKERT, P. H. Influence of isoflavones in soy protein isolates on development of induce prostate-related cancers in L-W rats. **Nutrition and Cancer**, New Orleans, v. 28, n. 1, p. 41-45, 1997.

PONTES, J. F.; MARCHESI, M. A.; MAGALHAES, M. B. Farmacologia e tratamentos das doenças do estômago e duodeno. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 830-853.

PORTER, T. E.; WILES, C. D.; FRAWLEY, L. S. Lactotrope differentiation in rats is modulated by a milk-borne signal transferred to the neonatal circulation. **Endocrinology**, Buenos Aires, v. 133, n. 3, p. 1284-1291, 1993.

POTTER, S. M. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 3, p. 606S-611S, 1995.

\_\_\_\_\_; BAUM, J. A.; TENG, H.; STILLMAN, R. J.; SHAY, N. F.; ERDMAN Jr., J. W. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in

postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 78 (suppl.), p. 1375S-1518S, 1998.

PSZEZOLA, D. E. Putting soy and other nutraceuticals under the microscope. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 9, p. 112-117, 1999.

QUEGUINER, C.; DUMAY, E.; SABOUCAVALIER, C.; CHEFTEL, J. C. Microcoagulation of a whey protein isolate by extrusion cooking at acid pH. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, p. 610-616, 1992.

RAEMY, A.; LAMBELET, P. Thermal Behavior of Foods. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 193, p. 417-439, 1991.

RAINES, E. W.; ROSS, R. Biología de la formación de placas ateroscleróticas, el posible papel de los factores de crecimiento en el desarrollo de lesiones y el impacto potencial de las proteínas de soya. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 624S-630S, 1995.

RANG, H. P.; GARDNER, P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. 816 p.

RAO, A. V.; SUNG, M. K. Saponins as anticarcinogens. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 717S-724S, 1995.

RAO, C. V.; WANG, C. X.; SIMI, B.; LUBET, R.; KELLOFF, G.; STEELE, V.; REDDY, B. S. Enhancement of experimental colon cancer by genistein. **Cancer Research**, Moscow, v. 57, n. 17, p. 3717-3722, 1997.

REGESTER, G. O.; McINTOSH, G. H.; LEE, V. W. K.; SMITHERS, G. W. Whey protein as nutritional and functional food ingredients. **Food Australia**, Waterloo, v. 48, p. 123-127, 1996.

REITER, B. The biological significance and exploitation of the non-immunoglobulin protective proteins in milk: lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase, xanthine oxidase. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Philadelphia, n. 191, p. 2-4, 1985.

RICHIE, J. P. The role of glutathione in aging and cancer. **Indian Journal of Pediatrics**, Ottawa, v. 70, p. 615-626, 1992.

RIPPLE, M. O.; HENRY, H.; RAGO, R.; WILDING, G. Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 89, n. 1, p. 40-48, 1997.

ROBERFROID, M. B. What is beneficial for health? The concept of functional food. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 37, n. 9/10, p. 1039-1041, 1999.

\_\_\_\_\_. A European consensus of scientific concepts of functional foods. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 16, n. 7/8, p. 689-691, 2000.

ROSANELI, C. F. **Atividade antiulcerogênica de um concentrado de soro de leite bovino em modelos experimentais com ratos**. Campinas, SP: UNICAMP, 2002. 81 p. Dissertação (Mestrado em Planejamento Alimentar e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, 2002.

ROSANELI, C. F.; SGARBIERI, V. C.; BIGHETTI, A. E.; ANTONIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Efeito de um concentrado de soro de leite bovino (CSL) em úlcera gástrica induzida por etanol em modelos experimentais. In: 4 Simpósio Latino Americano de Ciências dos Alimentos. 2001, Campinas. **Anais**. Campinas: UNICAMP. 350p.

ROSENBERG, M. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. **Trends in Food Science and Technology**, Kidlington, v. 6, p. 12-19, 1995.

SAKAMOTO, N. Antitumor effect of human lactoferrin against newly established human pancreatic cancer cell line SPA. **Cancer and Chemotherapy**, Tokyo, v. 10, p. 1557-1563, 1998.

SATTERLEE, L. D. Proteins for use in foods. **Food Technology**, Waterloo, v. 35, p. 53-60, 1981.

SAUTIER, C.; DIENG, K.; FLAMENT, C.; DOUCET, C.; SUQUET, J. P.; LEMONNIER, D. Effects of whey protein, casein, soya-bean and sunflower

proteins on the serum, tissue and faecal steroids in rats. **British Journal of Nutrition**, London, v. 49, n. 3, p. 313-319, 1983.

SARWAR, G.; McDONOUGH, F. E. Evaluation of protein digestibility-corrected amino acid score method for assessing protein quality of foods. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 73, n. 3, p. 347-356, 1990.

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

SCHLIMME, E.; MEISEL, H. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. **Nahrung**, Weinheim, v. 39, n. 1, p. 1-20, 1995.

SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 134 (suppl.), n. 6, p. 1333S-1343S, 1998.

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

\_\_\_\_\_; PACHECO, M. T. B. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 2, n. 1/2, p.7-19, 1999.

SINGH, H.; YE, A.; HAVEA, P. Milk proteins: interaction and functionality of dairy ingredients. **Australian Journal of Dairy Technology**, North Melbourne, v. 55, p. 71-77, 2000.

SMITH, G. S. S.; TORNWALL, M. S.; BARRETO, J. C.; MILLE, T. A. Gastric injury and protection against alcohol and acid: influence of perturbations in glutathione metabolism. **Journal of Surgical Research**, San Diego, v. 61, n. 2, p. 395-403, 1996.

SMITHERS, G. W.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D.; KIRTHE, J. A.; DIONYSIUS, D. A.; FRANCIS, G. L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P. A.; McINTOSH, G. H.; MITCHELL, I. R.; PEARCE, R. J.; REGESTER, G. O. Symposium:

advances in dairy foods processing and engineering. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 8, p. 1454-1459, 1996.

SOUTHWARD, C. R. Use of casein and caseinates. In: **Developments in Dairy Chemistry**. FOX, P.F. (Ed.). Elsevier Applied Science Publishers, 1989. p. 173-224.

SOY INGREDIENTS – Soy Protein Concentrates retain high levels of isoflavones. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 6, p. 144-145, 1999.

STAAL, J. T.; ROEDERER, M.; ISRAELSKI, D. M.; BUBP, J.; MOLE, L. A.; McSHANE, D.; DERESINSKI, S. C.; ROSS, W.; SUSSMAN, H.; RAJU, P. A. Intracellular glutathione levels in T cell subsets decrease in HIV-infected individuals. **AIDS Research and Human Retroviruses**, Larchmont, v. 8, n. 2, p. 305-311, 1992.

STAAL, F. J. Glutathione and HIV infection: reduced, or increase oxidized? **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 194-196, 1997.

STAHENLIN, H. B.; RITZER, G. Effect of whey on plasma lipids. **International Journal Vitaminology Nutrition Research**, Beerne, v. 50, n. 2, p. 229-230, 1979.

STEELE, R. D.; HARPER, A. E. Protein. In: BROWN, M. L. (Ed.), **Present knowledge in nutrition**, 6<sup>th</sup> edition, Washington D.C.: Nutrition Foundation, 1990. p. 67-79.

STEELE, V. E.; PEREIRA, M. A.; SIGNAN, C. C.; KELLOFF, G. H. Desarrollo de estrategias para el genistein como agente quimiopreventivo del cancer. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 2713S-2716, 1995.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of milk proteins. In: **Developments in Dairy Chemistry 1. Protein**. FOX, P. F. (Ed.). New York: Applied Science Publishers, 1982. p. 1-60.

SYNDER, H. E.; KWON, T. W. **Soybean utilization**, New York: Van Nostrand Reinhold, Co, 1987.

TESCHEMACHER, H.; KOCH, G. Opioids in the milk. **Endocrine Regulation**, Basel, v. 25, p. 147-150, 1991.

THEUER, R. Effect of essential amino acid restriction on the growth of female C57BL mice and their implanted BW 1032 adenocarcinomas. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 101, n. 2, p. 232-233, 1971.

TORRES, J. A. Addible films and coating from proteins. In: **Protein functionality in food systems**, HETTIARACHECHY, N.S.; ZIEGLER, G.R. (Ed.). New York: Marcel Dekker, 1994. p. 467-507.

TRABER, M. G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants. **Mineral and Electrolytic Metabolism**, Basel, v. 23, n. 3, p. 135-139, 1997.

TROLL, W.; WIESNER, R.; SHELLABARGER, C. J.; HOLTZMAN, S.; STONE, J. P. Soybean diet lowers breast tumor incidence in irradiated rats. **Carcinogenesis**, New York, v. 1, n. 6, p. 469-472, 1980.

TSAI, W. Y.; CHANG, W. H.; CHEN, C. H.; LU, F. J. Enhancing effect of patented whey protein isolate (immunocal) on the cytotoxicity of anti-cancer drug. **Nutrition and Cancer**, New Orleans, v. 38, n. 2, p. 200-208, 2000.

USDEC - United States Dairy Export Council. **Manual de referência para produtos de soro dos Estados Unidos da América**. Arlington, 1997, 70 p.

VAGHELA, M. N.; KILARA, A. Foam and emulsifying properties of whey protein concentrate as affected by lipid composition. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, p. 275-280, 1996.

WAGNER, J. R.; GUÉGUEM, J. Effects of dissociation, deamidation, and reducing treatment on structural and surface active properties of soy glycinin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 6, p. 1993-2000, 1995.

WAKULICH, C. A.; TEPPERMAN, B. L. Role of glutathione in nitric oxide-mediated injury to rat gastric mucosal cells. **European Journal of Pharmacology**, Tokyo, v. 319, n. 2/3, p. 333-341, 1997.

WALZEM, R. L. Health enhancing properties of whey proteins and fractions. **USDEC/Applications Monograph**, 1999. p. 108.

WATANABE, A.; HIGUCHI, K.; YASUMURA, S.; SHIMIZU, Y. Nutritional modulation of glutathione level and cellular immunity in chronic hepatitis B and C. **Hepatology**, London, v. 24, p. 1883, 1996.

\_\_\_\_\_; OKADA, K.; SHIMIZU, Y.; WAKABAYASHI, H.; HIGUCHI, K.; NIIYA, K.; KUMABARA, Y.; YASUYAMA, T.; ITO, H.; TSUKISIRO, T.; KONDOH, Y.; EMI, N.; KOHRI, H. Nutritional therapy of chronic hepatitis by whey protein (non-heated). **Journal of Medicine**, Belconnen, v. 31, n. 5-6, p. 283-302, 2000.

WEI, H.; WEI, L. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. **Nutrition and Cancer**, New Orleans, v. 20, p. 1-12, 1993.

WILCOX, J. N.; BLUMENTHAL, B. F. Mecanismos trombóticos en aterosclerosis: impacto potencial de las proteínas de soya. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 631S-638S, 1995.

WILLIAMS, J. P.; JORDAN, S. E.; BARNES, S. Tyrosine kinase inhibitor effects on osteoclastic acid transport. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, suppl. 6, p. 1369S-1374S, 1998.

WITSCHI, H.; KENNEDY, A. R. Modulation of lung tumor development in mice with the soybean-derived Bowman-Birk protease inhibitor. **Carcinogenesis**, New York, v. 10, n. 12, p. 2275-2277, 1989.

WITZUM, J. L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, London, v. 344, n. 8926, p. 773-795, 1994.

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

XU, S. Y.; STANLEY, D. W.; GOFF, H. D.; DAVISON, V. J.; LE MAGNER, M. Hydrocolloid/milk gel formation and properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, p. 96-102, 1992.

XU, R. J. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. In: WHITAKER, J. R.; HAARD, N. F.; CHALMAKER, C. F.; SINGER, R. P. (Ed.). **Food for Health in the Pacific Rim**. Trumbull: Food and Nutrition, 1999. p. 291-301.

YAMAGUCHI, N.; YAJIMA, N.; ISHIDA, M.; SHIMADA, T.; HIRAISHI, H. Protection of cultured gastric cells against tert-butyl-hidroperoxide by glutathione isopropyl ester. **European Journal of Pharmacology**, Tokyo, v. 351, n. 3, p. 363-369, 1998.

YOSHIDA, K.; YAHIRO, M.; AHIKO, K. Effects of addition of arginine, cystine, and glycine to the bovine milk-stimulated amino acid mixture on the level of plasma and liver cholesterol in rats. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 34, n. 6, p. 567-576, 1988.

YOUNG, V. R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. **Journal of American Dietetic Association**, Chicago, v. 91, p. 828-835, 1991.

ZAVA, D. T.; DUWE, G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells *in vitro*. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 27, n. 1, p. 31-40, 1997.

ZHANG, X.; BEYNEN, A. C. Influence of dietary fish proteins on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. **British Journal of Nutrition**, London, v. 69, p. 767-777, 1993.

ZINSLY, P. F. **Avaliação nutricional de concentrados protéicos obtidos do leite bovino**. Campinas, SP: UNICAMP, 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, 2000.

ZINSLY, P. F.; SGARBIERI, V. C.; PEREIRA DIAS, N. F. G.; JACOBUCCI, H. B.; PACHECO, M. T. B.; BALDINI, V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 4, n. 52, p. 1-8, 2001.

## **CAPÍTULO 2**

### **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CONCENTRADOS PROTÉICOS DE LEITE BOVINO**

#### **RESUMO**

Foram produzidos e caracterizados quanto à composição centesimal e o perfil de aminoácidos, concentrados protéicos de caseína e de soro de leite bovino. Para a obtenção do caseinato de sódio (CNa) e do concentrado protéico de soro ácido (CSA), empregou-se a precipitação da caseína no pH isoelétrico (pH 4,6, 20°C). O soro ácido obtido foi concentrado por alcalinização, diafiltração e liofilização para obtenção do CSA. O caseinato foi obtido por neutralização da caseína isoelétrica (NaOH, pH 7,0-7,5) e desidratado em “spray dryer”. A obtenção do coágulo de caseína (CoC) e do concentrado protéico de soro doce foi por coagulação do leite desnatado e pasteurizado (quimosina, 34°C, 45 min.). O coágulo de caseína foi lavado, neutralizado e seco em “spray dryer”. O soro doce foi concentrado e desidratado pelo mesmo processo do soro ácido. O emprego de tecnologias de membranas (ultrafiltração/diafiltração) permitiu a obtenção de concentrados protéicos de soro de leite com mais de 80% de proteínas, sem que ocorresse desnaturação das proteínas mais termolábeis, monitorada por medidas de solubilidade e atividade imunológica.

#### **2.1 INTRODUÇÃO**

O leite pode ser considerado o alimento mais completo da natureza e o único que satisfaz às necessidades dos recém-nascidos de sua espécie, nos primeiros anos de vida. O leite da maioria das espécies de mamíferos difere do leite humano sob vários aspectos, inclusive por apresentarem maiores

concentrações de proteínas totais e de caseína e menor concentração de proteínas de soro. O leite humano apresenta baixa concentração de proteína total e elevada proporção de proteínas do soro, características que estão associadas ao crescimento lento e à dilatada longevidade da espécie humana (HAMBRAEUS, 1982).

Além de seu valor nutricional como fonte de proteínas, o leite bovino representa hoje uma grande oportunidade de lucro para a indústria, como ingrediente ou como substrato para novos produtos com maior valor de mercado (HUFFMAN; HARPER, 1999).

As caseínas podem ser obtidas industrialmente a partir do leite desnatado por três processos principais: a) precipitação ácida no pH isoeletrico (pH 4,6, 20°C); b) por coagulação enzimática (34°C, 40-60 minutos) por ação da enzima quimosina (renina), como é usado no processo industrial de fabricação de queijos; c) por microfiltração, processo físico que permite obter a caseína em sua forma micelar (MAUBOIS; OLIVIER, 1992; SMITHERS et al., 1996; WONG; CAMIRANT; PAVLATH, 1996).

O processamento do leite desnatado por microfiltração (diâmetro de membrana 0,2µm) permite fracioná-lo em um permeado que contém a maioria das proteínas do soro, e baixa concentração de lipídios e um retentado, consistindo em caseína nativa na forma micelar. O tratamento posterior do retentado por diafiltração resultará em um preparado de caseína com mais de 90% de pureza, podendo substituir com vantagens, o caseinato de sódio em suas aplicações (MAUBOIS; OLIVIER, 1992).

O soro obtido pela precipitação ácida das caseínas denomina-se “soro ácido” enquanto o obtido pela coagulação enzimática das caseínas, é conhecido tradicionalmente como soro “doce” (HUFFMAN; HARPER, 1999).

Do soro produzido na Europa em 1991/92, 45% foi utilizado na alimentação animal, 40% na fabricação de soro em pó, 12% na fabricação de

concentrado protéico de soro (CPS) e 3% na produção de lactose. Para cada kg de queijo produzido geram-se cerca de 9kg de soro (MORR; HÁ, 1993; BIRD, 1996). O descarte do soro não utilizado constitui sério problema, apresentando alto poder poluente, devido à alta demanda biológica de oxigênio (MODLER, 2000).

O soro contém 93,6% de água e 6,4% de sólidos. Desidratado, o soro contém 12% de proteínas, 3% de gordura, 10% de minerais e 75% de lactose. Devido ao elevado teor de água e reduzido teor de proteína, de 0,6 a 0,9%, o uso de soro lácteo em produtos alimentícios convencionais ainda é limitado, principalmente pelo custo de secagem (WONG; CAMIRANT; PAVLATH, 1996).

O concentrado protéico de soro representa uma variada mistura de proteínas com propriedades físicas, químicas e funcionais, desempenhando papel importante na nutrição, como uma fonte excepcionalmente rica e balanceada de aminoácidos essenciais (REGESTER et al., 1996; SMITHERS et al., 1996). As proteínas de soro de leite apresentam ações fisiológicas específicas, estando associadas a vários efeitos biológicos observados em estudos com animais e humanos, que variam desde atividade anticâncer até uma possível influência na função digestiva (McINTOSH et al., 1998).

Com o desenvolvimento das tecnologias de fracionamento com membranas e com as novas descobertas da importância das proteínas do leite em ciência e tecnologia de alimentos e na nutrição, há um forte incremento das pesquisas, procurando intensificar o uso dessas proteínas (BRINK, 1996; WONG; CAMIRANT; PAVLATH, 1996; BOUNOUS, 1997; HUFFMAN; HARPER, 1999).

Uma das primeiras aplicações de sistemas de membrana na indústria de produtos foi na produção de concentrados protéicos de soro. A ultrafiltração e a osmose reversa são muito utilizadas para as concentrações de proteínas de soro, permitindo o desenvolvimento de um grande leque de concentrados protéicos (PEARCE, 1992). Entre as aplicações mais promissoras da tecnologia de membranas no processamento de soro de leite estão a obtenção de concentrados

com alto teor protéico, o fracionamento de proteínas do soro e a preparação de frações protéicas ou proteínas isoladas do soro, com propriedades funcionais específicas (JOST, 1993; ROSEMBERG, 1995).

Esse trabalho teve como objetivo aplicar metodologias adequadas para a produção piloto de concentrados de caseínas e de proteínas de soro de leite bovino, que possibilitassem preservar ao máximo as propriedades estruturais e funcionais dos materiais obtidos.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Matéria-prima

Utilizou-se leite tipo B desnatado e pasteurizado (73°C, 15 seg), obtido da Cooperativa de Produtores de Leite da Região de Campinas, instalada no município de Jaguariúna, São Paulo.

2.2.2 Produção de concentrado protéico de soro doce (CSD), coágulo de caseína (CoC), concentrado protéico de soro ácido (CSA) e caseinato de sódio (CNa).

Todo o processamento foi efetuado em Planta Piloto do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios (TECNOLAT), do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, SP, conforme fluxograma apresentado na figura 1.

Partiu-se de um volume inicial de 800 litros de leite desnatado e pasteurizado. No processo de obtenção do CSD e CoC, o leite recebido resfriado (~10°C) foi homogeneizado e aquecido com vapor em tanque de inox encamisado, até 32°C. Adicionou-se solução de CaCl<sub>2</sub> 50% (25mL CaCl<sub>2</sub>/100L de leite) e, em seguida, o coalho bovino comercial constituído por uma mistura de cerca de 80% de pepsina e 20% de renina (Há-La, Christian Hansen Brasil), na proporção de

30mL/100L de leite, deixando em repouso, por aproximadamente 40-60 minutos, com o tanque coberto. O leite coagulado foi cortado com uma lira horizontal e vertical (inox) com 1cm de espessura entre os fios. Agitou-se levemente o material para facilitar a separação da caseína e o maior dessoramento. O soro doce foi separado por decantação, seguida de sifonação e filtração. Recuperou-se cerca de 670 litros de soro.

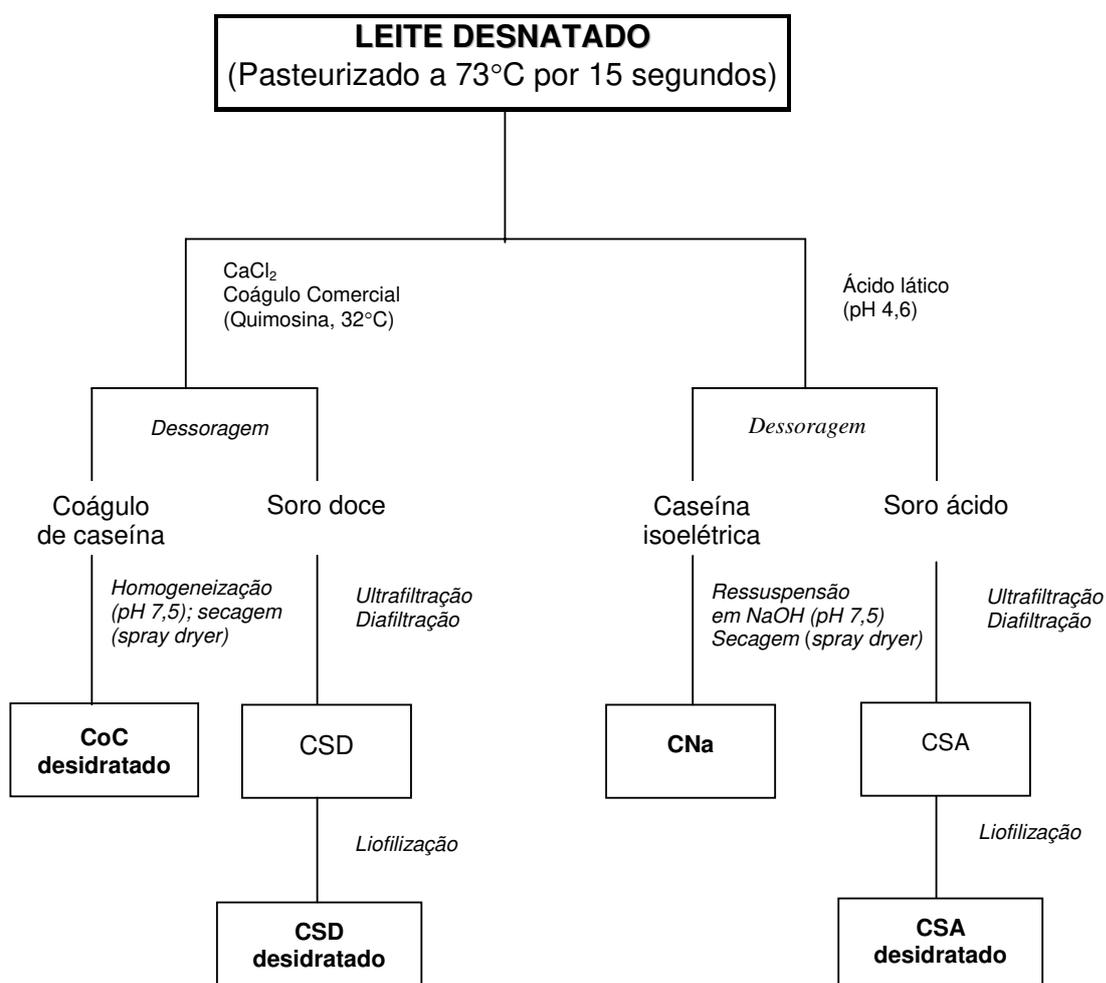


Figura 1 - Processo de obtenção do coágulo de caseína desidratado (CoC), caseinato de sódio (CNa); concentrado protéico de soro doce (CSD) e concentrado protéico de soro ácido (CSA) (ZINSLY et al., 2001).

O soro obtido foi transferido para um tanque de alimentação e concentrado por ultrafiltração em membranas de polisulfona (WGM – “Kock membrane systems”, SP) com porosidade de corte para PM de 10kDa. Utilizou-se um sistema tubular de filtração tangencial sob pressão com superfície de filtração de 12m<sup>2</sup>, pressão de entrada de 6kgf/cm<sup>2</sup> e de saída de 3,2kgf/cm<sup>2</sup>. As figuras 2 e 3 representam fases do processamento utilizado para obtenção dos concentrados e as figuras 4 e 5, equipamentos utilizados no processamento.

No processo de obtenção do CSA e CNa o leite foi homogeneizado, aquecido com vapor em tanque de inox encamisado (marca Biasinox), até 20°C e, em seguida tratado, sob agitação branda, com ácido láctico comercial (grau alimentício, 85% v/v) até atingir pH 4,6 (pI das caseínas), onde ocorre a precipitação das mesmas. A mistura foi mantida em repouso a 20°C, por aproximadamente 40 minutos, para que se completasse a precipitação e a separação de fases. A caseína separada do soro depositava-se no fundo do tanque.

A recuperação do soro na camada superior foi feita por sifonação e o soro misturado com a caseína foi obtido por centrifugação. Utilizou-se para tal uma centrífuga de cesto da marca Gedr Heing modelo 2250, a 3500 rpm.

A caseína isoeletrica, após lavagem com água em pH 4,6, foi ressuspensa em solução de NaOH e ajustada a pH 7,0-7,5. Essa solução foi pré-aquecida, ~40°C e desidratada em “spray dryer” (Niro Atomizer – CB3 104D, Dinamarca) com temperatura de entrada de 180 ± 5°C e de saída de 90 ± 5°C, obtendo-se o CNa desidratado.

Nestas condições produziu-se um concentrado (retentado) contendo todas as proteínas do soro, e um ultrafiltrado (permeado) formado da maior parte da água originalmente contida no soro, contendo ainda grande parte da lactose, minerais, vitaminas e outros constituintes do leite, de baixo peso molecular. Para promover uma maior concentração de proteínas, combinou-se a ultrafiltração com a diafiltração, que consiste em fazer passar, após ter atingido a concentração

desejada, um elevado volume de água desionizada através do concentrado, para se retirar o máximo de lactose e outros compostos de baixo peso molecular, ao mesmo tempo concentrando e purificando ainda mais as proteínas (ZINSLY et al., 2001).

Em nosso processo utilizamos um fator de concentração de 12 (FC = 12) seguindo-se 15 ciclos de diafiltração (CD = 15). Cada ciclo de diafiltração equivale a passar pelo concentrado igual volume de água desionizada, mantendo-se constante o volume de retentado.

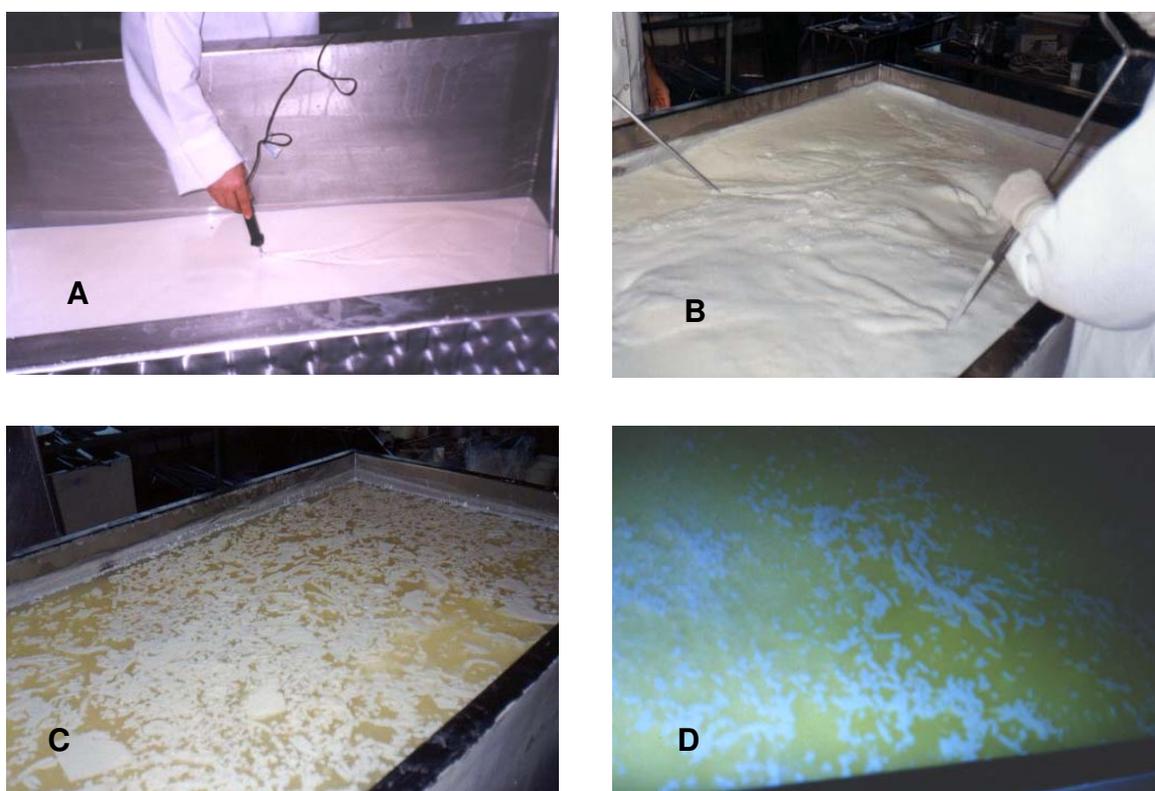


Figura 2 – Etapas do processamento para obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e de caseínas: A, verificação da temperatura antes do aquecimento; B, aquecimento do leite até 32°C para coagulação; C, coagulação enzimática (soro doce); D, coagulação ácida (soro ácido).

Terminada a ultrafiltração e a diafiltração o retentado foi coletado, colocado em bandejas de inox e congelado (-25°C) em câmara fria (Kit Frigor), para posterior liofilização em equipamento liofilizador (marca Stokes), instalado em planta piloto no FRUTOTHEC/ITAL. O soro doce foi submetido aos mesmos processos do soro ácido: ultrafiltração, diafiltração, congelamento e liofilização, para obtenção do CSD desidratado.

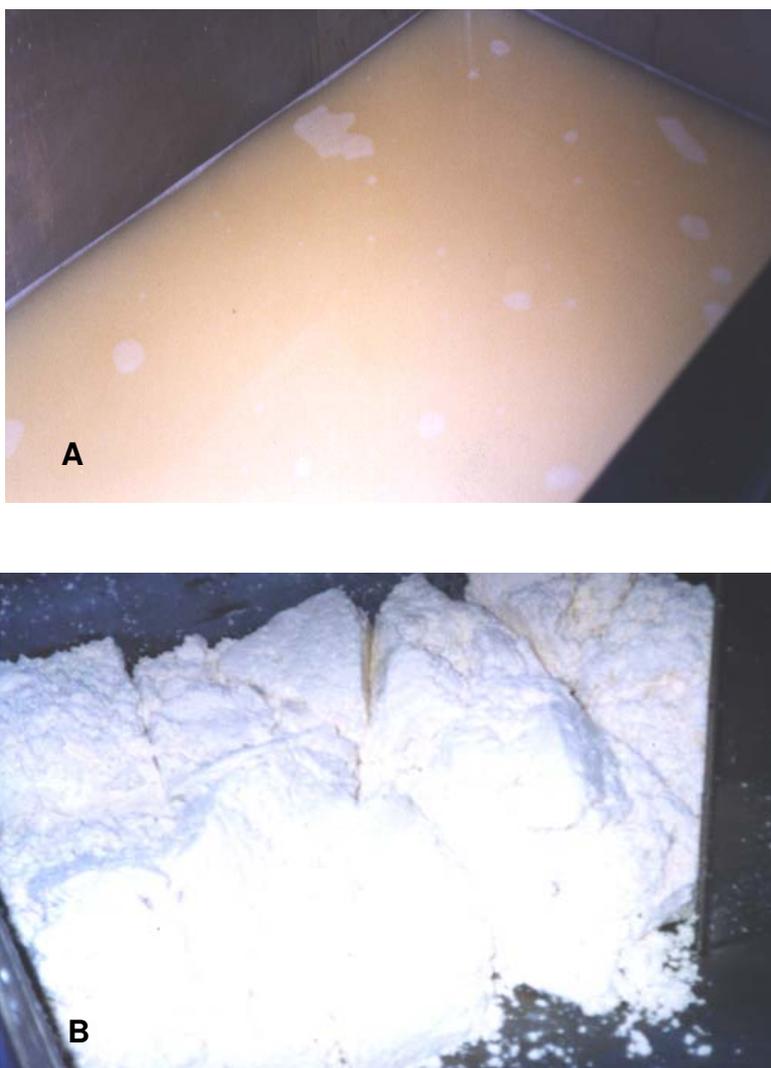


Figura 3 – Materiais resultantes de processamento para obtenção de concentrados protéicos de soro doce e caseína: A, retentado de soro doce; B, coágulo de caseína.



Figura 4 – Equipamentos e membranas utilizados no processamento de concentrados protéicos de soro e de caseína: A, equipamento de concentração WGM; B, conjunto de membranas; C, "spray dryer" marca Niro Atomizer; D, Liofilizador marca Stokes.



Figura 5 – Câmara fria (marca Kit Frigor) utilizada para congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  dos concentrados protéicos de soro para liofilização.

As temperaturas durante todo o processamento foram mantidas abaixo de  $40^{\circ}\text{C}$ , para preservar a integridade estrutural e funcional das proteínas, evitando-se a desnaturação.

## **2.2.3 Caracterização dos concentrados protéicos desidratados**

### **Composição centesimal**

Proteína total, umidade e cinzas foram determinadas de acordo com os procedimentos da AOAC (1990). Os lipídios totais foram extraídos pelo procedimento de Bligh e Dyer (1959) e determinado gravimetricamente. A determinação de lactose foi feita de acordo com metodologia de Acton (1977).

### **Determinação de aminoácidos**

A composição em aminoácidos, com exceção do triptofano, foi realizada por hidrólise ácida, seguindo basicamente o método de Spackman, Stein e Moore (1958), com algumas modificações. Pesou-se 25mg de proteína da amostra e hidrolisou-se com 10mL de HCl 6N, a vácuo, em temperatura de 110°C por 22 horas. A amostra foi recuperada em tampão citrato de sódio pH 2,2 (Diluyente marca Pickering, USA). Uma alíquota de 25µL foi injetada em analisador Dionex DX-300 para separação de aminoácidos em coluna de troca catiônica e reação pós-coluna com ninidrina, usando-se como referência, para identificação e cálculo, uma solução padrão de aminoácidos (marca Pierce, USA). O triptofano foi determinado após hidrólise enzimática com pronase (100mg/10mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,5) a 40°C por 24 horas, seguido de reação colorimétrica com solução de 4-dimetilamino benzaldeído (DAB) em ácido sulfúrico 21,2N e leitura de absorvância a 590nm. O teor de triptofano foi calculado a partir de uma curva padrão (SPIES, 1967).

### **Score de Aminoácidos Essenciais (EAE)**

Calculado relacionando-se a concentração de cada um dos aminoácidos essenciais dos concentrados protéicos em estudo com os aminoácidos correspondentes ao padrão de referência da FAO/WHO (1990), definindo-se como

EAE o menor quociente individual encontrado para os aminoácidos essenciais (HENLEY; KUSTER, 1994).

## **Solubilidade**

Feita com a finalidade de avaliar o grau de desnaturação da proteína. Utilizou-se o método de Morr e outros (1985), modificação do procedimento do índice de solubilidade do nitrogênio. A proteína solúvel foi determinada pelo método micro Kjeldahl (AOAC, 1990).

A solubilidade do CNa e do CoC foi determinada em suspensões a 1% (p/v) de proteína em água destilada, seguido de ajuste de pH com soluções de NaOH 0,1N ou HCl 0,1N, até estabilização em pH 7,0, agitação à temperatura ambiente por 1 hora e centrifugação em centrífuga refrigerada marca Sorvall, modelo RC-26 Plus (Newtown, Connecticut, USA) (18920 x g, 30 min). Aferido o volume do sobrenadante, tomaram-se as alíquotas para determinação da proteína solúvel.

Para a determinação da solubilidade das proteínas de soro (CSD e CSA), seguiram-se as recomendações de Bounous e Gold (1991) em que a proteína (suspensão a 1% p/v) foi dissolvida em solução tampão fosfato-citrato 0,01M, pH 4,6. Após agitação e centrifugação, como no procedimento anterior, alíquotas do sobrenadante foram tomadas para determinação do nitrogênio solúvel pelo método micro-Kjeldahl. Os resultados foram expressos como porcentagem de proteína solúvel em relação à proteína total da amostra.

## **Análises microbiológicas**

As análises foram efetuadas nos vários concentrados produzidos, com atenção especial aos concentrados protéicos de soro de leite, porque esses são mais susceptíveis à contaminação e também porque nos processos adotados (baixas temperaturas e intenso manuseio do material), esse problema se agrava. Para cada lote de leite processado foram coletadas amostras de leite

pasteurizado, de soro e do produto desidratado, para controle de eventuais pontos de contaminação.

Para as análises microbiológicas, utilizaram-se as metodologias descritas em Vandervant e Splippspoesser (1992). Como padrão de referência, baseou-se no decreto N° 1255 de 25/6/62 – RIISPOA (BRASIL, 1963) e na portaria N° 451 de 19/9/97 do DINAL (BRASIL, 1998).

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal aproximada e a solubilidade dos concentrados protéicos obtidos em planta piloto, estão apresentadas na tabela 1.

Todos os produtos apresentaram concentração de proteína acima de 80%. Quanto à lactose, o mais alto teor (15%) foi determinado no concentrado protéico de soro ácido (CSA) seguido do coágulo de caseína (12,5%) e do caseinato de sódio (9,4%), sendo que o mais baixo teor (6,15%) foi encontrado no concentrado protéico de soro doce (CSD). Os mais baixos teores de cinzas foram encontrados nos concentrados protéicos de soro (CSA e CSD), seguido do CoC (5,0%) e o mais elevado no CNa (9,0%),. Quanto aos lipídios totais, as mais baixas concentrações aparecem no CoC e no CNa, seguido do CSA (2,45%) e o mais alto foi o do CSD (5,0 %).

Os teores de lactose no CNa e no CoC podem ser reduzidos por meio de processos mais exaustivos de lavagem dos precipitados, enquanto nos concentrados protéicos de soro por aumento dos ciclos de diafiltração.

O elevado teor de minerais no CNa se deve, em boa parte, ao sódio adicionado, na forma de NaOH, para a alcalinização da caseína isoelétrica. O teor relativamente elevado de minerais no CoC pode ter como causa a co-precipitação de sais de cálcio, juntamente com o coágulo.

Os lipídios totais aparecem mais elevados no CSD, que nos demais concentrados. O teor final de lipídios nos concentrados irá depender, em parte da eficiência do desnate da matéria prima.

Exceto pelas concentrações de lactose, que ainda se encontram um pouco elevadas nos produtos analisados, a composição apresentada na tabela 1 assemelha-se bastante à da literatura, para os mesmos tipos de produtos (JOST, 1993). Nos Estados Unidos da América, a indústria produz derivados protéicos de soro abrangendo uma faixa de concentração de proteína de 35 a 90% (USDEC, 1997).

Tabela 1 – Composição centesimal aproximada e valores de solubilidade (média  $\pm$  desvio padrão) em base seca, apresentados por proteínas de leite bovino.

Componente (% b.s.)*	CSD	CoC	CSA	CNa
Proteína (N x 6,38)	85,60 $\pm$ 4,55	80,78 $\pm$ 6,55	81,02 $\pm$ 4,98	80,88 $\pm$ 5,84
Lactose	6,15 $\pm$ 0,17 <sup>d</sup>	12,51 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>	15,08 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	9,40 $\pm$ 0,25 <sup>c</sup>
Cinza	2,25 $\pm$ 0,49 <sup>c</sup>	5,08 $\pm$ 0,75 <sup>b</sup>	1,05 $\pm$ 0,25 <sup>d</sup>	9,01 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>
Lipídios totais	5,01 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>	1,61 $\pm$ 0,20 <sup>c</sup>	2,45 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	1,66 $\pm$ 0,36 <sup>c</sup>
Solubilidade	93,09 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	35,12 $\pm$ 0,85 <sup>b</sup>	94,87 $\pm$ 4,25 <sup>ab</sup>	98,20 $\pm$ 4,26 <sup>a</sup>

\*Determinações feitas em triplicata; CSD, concentrado protéico de soro doce; CoC, coágulo de caseína; CSA, concentrado protéico de soro ácido; CNa, caseinato de sódio. Não houve diferença estatística entre os teores de proteínas dos diferentes concentrados. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os perfis de aminoácidos essenciais para os quatro concentrados protéicos produzidos em planta piloto, comparados com uma caseína comercial e com o padrão teórico (FAO/WHO, 1990) estão na tabela 2.

Tabela 2 – Perfil de aminoácidos essenciais (g/100g de proteína) e escore químico (EAE) de concentrados protéicos obtidos de leite bovino.

Aminoácidos	CSD	CoC	CSA	CNa	CC	FAO/WHO
Treonina	7,6	3,7	5,8	4,7	4,1	3,4
Cistína +Metionina	5,4	3,7	5,3	3,9	2,2*	2,5
Valina	5,0	6,6	5,2	6,9	6,2	3,5
Leucina	11,7	9,8	12,5	10,4	8,8	6,6
Isoleucina	6,3	4,6	5,4	5,2	4,6	2,8
Fenilalanina + Tirosina	7,2	11,4	7,6	11,5	9,9	6,3
Lisina	11,0	6,9	9,7	6,6	7,6	5,8
Histidina	6,1	6,4	7,0	7,7	2,8	1,9
Triptofano	1,1	0,87*	1,9	0,92*	1,4	1,1
EAE **	1,00	0,79 (Trp)	>1,00	0,84 (Trp)	0,88 (Cys) <sub>2</sub> + Met	-

Resultados médios de determinações feitas em duplicata. \*Aminoácido mais limitante em relação ao padrão FAO/WHO (1990). CSD, concentrado de soro doce; CoC, coágulo de caseína; CSA, concentrado de soro ácido; CNa, caseinato de sódio; CC caseína comercial e referência, padrão FAO/WHO. \*\* EAE (escore de aminoácidos essenciais).

As proteínas do soro de leite diferem das caseínas por apresentarem teores mais elevados dos aminoácidos treonina, aminoácidos sulfurados (metionina +

cistina), leucina, isoleucina, lisina e triptofano e teores mais baixos dos aminoácidos de cadeias aromáticas (fenilalanina + tirosina). Em relação ao padrão teórico utilizado, as caseínas podem apresentar deficiências em aminoácidos sulfurados (metionina + cistina) e/ou triptofano. Essa situação é refletida nos escores químicos, também apresentados na tabela 2, e que se apresentam iguais ou superiores a 1,0 para os concentrados de proteínas de soro e inferiores a 1,0 para as caseínas.

O perfil de aminoácidos apresentado pelas proteínas de soro de leite permite que sejam recomendadas para a formulação de vários produtos especiais, tais como fórmulas infantis (HAMBRAEUS, 1982); desempenho do metabolismo muscular, pelo alto teor de aminoácidos essenciais de cadeias ramificadas como leucina e isoleucina, considerados importantes para o desempenho de esportistas (STEELE; HARPER, 1990); na recuperação de traumas múltiplos (BRENAN et al., 1986) e de queimaduras (ALEXANDER; GOTTSCHLISH, 1990).

Em virtude do empenho em limitar os tratamentos térmicos em nossos processamentos e das condições em que os processamentos foram praticados, em tanques abertos e operações manuais, os concentrados de proteínas de soro após desidratação, apresentaram perfis microbiológicos pouco satisfatórios, conforme apresentados na tabela 3, existindo três alternativas para melhorar esses resultados. Visando melhorar o produto, uma segunda pasteurização poderia ser acrescentada antes das operações de concentração e liofilização. Essa alternativa não foi utilizada por não dispormos de equipamento necessário para tal procedimento. A segunda alternativa, testada com sucesso nessa pesquisa, foi a irradiação do produto já desidratado e embalado. Uma terceira alternativa seria a microfiltração do leite e/ou do soro em membranas de material cerâmico com porosidade da ordem de 1 a 1,4 $\mu$ m.

A irradiação consiste na exposição do alimento a radiações ionizantes, sem promover nenhuma injúria térmica ou mecânica ao produto, sendo permitida em muitos países, inclusive no Brasil. As organizações reguladoras de alimentos

internacionais permitem a utilização de alimentos irradiados na alimentação humana com doses de até 10kGy (THAKUR; SINGH, 1995).

Os resultados de análises microbiológicas, em alguns lotes de CSD produzidos, sem irradiação e com irradiação, são apresentados nas tabelas 3 e 4. As contagens que aparecem na tabela 3 em alguns casos estão acima do que é permitido pela legislação brasileira.

Tabela 3 – Perfil microbiológico de alguns lotes de concentrado protéico de soro doce, desidratados por liofilização produzidos na planta piloto do ITAL, Campinas.

Microrganismos	Lotes analisados			
	029/00	142/00	196/00	255/00
<i>Salmonella</i> (em 25 g)	AUS	AUS	AUS	AUS
Coliformes totais (NMP/g)*	9,3	>240	>240	12
Coliformes fecais (NMP/g)*	2,3	>240	>240	<10 <sup>2</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)**	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	2 x 10 <sup>2</sup>
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)**	<10 <sup>2</sup>	3 x 10 <sup>2</sup>	4,5 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>
<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/g)**	1,5 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>3</sup>	4,5 x 10 <sup>3</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>
Contagem total de aeróbios	4,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>	1,8 x 10 <sup>7</sup>	5,3 x 10 <sup>7</sup>
Mesófilos (UFC/g)**	-	-	-	-

\*Número mais provável/grama; \*\* Unidades formadoras de colônias/grama; AUS (ausente).

Os lotes 142/00 e 196/00 apresentaram contagens altas de coliformes fecais e totais. Já o lote 255/00 apresentou maiores contagens de *Bacillus cereus*,

*Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e contagem total de aeróbios. O lote 029/00 apresentou menor contagem de coliformes totais e fecais, e a segunda maior contagem de aeróbios. Na tentativa de solucionar o problema de contaminação, já que toda assepsia possível fora anteriormente aplicada ao processamento sem sucesso, um dos lotes mais contaminados (lote 142/00) foi submetido a vários níveis de irradiação na EMBRARAD, em São Paulo. Os resultados desses tratamentos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Efeitos de irradiação (raios  $\gamma$ ), nas doses de 3,0, 5,0, 7,5 e 10kGy, no perfil microbiológico do lote 142/00 do concentrado protéico de soro doce liofilizado.

Microrganismos	Doses (kGy)			
	3,0	5,0	7,5	10
<i>Salmonella</i> (em 25 g)	AUS	AUS	AUS	AUS
Coliformes totais (NMP/g)*	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
Coliformes fecais (NMP/g)*	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)**	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)**	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>
<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/g)**	<10	<10	<10	<10
Contagem de bolores e leveduras (UFC/g)**	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>
Contagem total de aeróbios	1,7 x 10 <sup>2</sup>	<10	<10	<10
Mesófilos (UFC/g)**	-	-	-	-

\*Número mais provável/grama; \*\*Unidades formadoras de colônias/grama; AUS (ausente).

A irradiação é utilizada em alguns países para aumentar a durabilidade de alimentos “in natura” ou processados e, como todos os métodos utilizados para

preservar alimentos, também apresenta limitações. Seu uso isolado pode causar o aparecimento em alguns alimentos de alterações químicas e sensoriais indesejáveis, dependendo das condições de irradiação e da quantidade aplicada. Para prevenir essas mudanças a irradiação deve ser associada a outros métodos de conservação de alimentos, como aquecimento, congelamento e embalagem à vácuo ou em atmosfera modificada (THAKUR; SINGH, 1995).

Os dados da tabela 4 mostram que níveis de irradiação muito mais baixos que o permitido são suficientes para eliminar os microrganismos indesejáveis como coliformes, *Bacillus cereus*, bolores e leveduras ou reduzi-los em todos os níveis de irradiação testados, a valores abaixo do limite de detecção dos métodos de controle. Tratamento com dosagem de 3kGy já foi eficiente para eliminação de microrganismos, sem afetar a composição e as propriedades funcionais fisiológicas (imunológicas) das proteínas, permitindo assim o uso dos concentrados irradiados em dietas para consumo humano, com a máxima segurança.

A preparação de concentrados protéicos de proteínas de leite, por processos que usam membranas despertou grande interesse nos últimos anos. A possibilidade de utilizar diferentes membranas de ultrafiltração, a associação de ultrafiltração, diafiltração e microfiltração, assim como a combinação correta das condições de pH e temperatura, permitem a obtenção de concentrados protéicos com propriedades físico-químicas e funcionais adequadas às diferentes aplicações a que se destinam. Exemplos disto foram os concentrados protéicos obtidos nesta pesquisa, com altos teores em proteína e pouquíssima desnaturação protéica.

## 2.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e apresentados nesse trabalho permitem concluir que é possível obter concentrados protéicos derivados do leite, com o mínimo de tratamento térmico e preservando-se as propriedades nutritivas em termos da

composição aminoacídica e as características microbiológicas. A utilização de tecnologias de membranas (ultrafiltração/diafiltração) permitiu produzir concentrados protéicos de soro de leite com mais de 80% de proteína, com o mínimo de desnaturação protéica possível.

O perfil aminoacídico apresentado por proteínas de soro dos concentrados produzidos foi superior ao das caseínas, o que resultou em maior escore de aminoácidos essenciais.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, G. H. The determination of lactose in cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, North Melbourne, v. 9, p. 111-114, 1977.

ALEXANDER, J. W.; GOTTSCHLISH, M. M. Nutritional immunomodulation in burned patients. **Critical Care in Medicine**, New York, v. 18, n. 2, p. S149-153, 1990.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - **Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemistry**, 15<sup>th</sup> ed., Washington. D.C., 1990, 1141 p.

BIRD, J. The application of membrane systems in the dairy industry. **Journal of the Society of Dairy Technology**, London, v. 49, n. 1, p. 16-23, 1996.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P.; GOLD, P. The immunoenhancing property of dietary whey protein concentrate. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 11, n. 4, p. 271-278, 1988.

\_\_\_\_\_; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.

\_\_\_\_\_. **The fascinating story behind a health-promoting product-patented milk serum (whey) protein concentrate**. Scottsdale: Immunotec Clinical Foundation, 1997, 15 p.

BRASIL. Decreto-Lei nº 1.255, de 25 de junho de 1962. Altera o Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 1963.166p.

BRASIL. Portaria nº 451. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, de 19 de setembro de 1997. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, de 02 de setembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus anexos I, II e III.

BRENAN, M. F.; CERRA, F.; DALI, J. M.; FISCHER, J. E., MOLDAWER, L. L.; SMITH, R. J.; WINNARS, E. WANNEMA CHERR, R.; YUNG, V. R. Report on a research workshop: branched-chain amino acids in stress and injury. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Tokyo, v. 10, n. 5, p. 446-452, 1986.

BRINK, W. The life extension protein - that fights disease and extends lifespan. Scottsdale, **Life Extension Report**, Scottsdale, v. 1, p. 21-28, 1996.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation**, Bethesda, Maryland, USA, 1990.

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

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

HUFFMAN, L. M.; HARPER, J. Symposium: marketing dairy value through technology. Maximizing the value of milk through separation technologies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, n. 82, n. 10, p. 2238-2244, 1999.

JOST, R. Functional characteristics of dairy proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Singapore, v. 4, n. 9, p. 283-288, 1993.

MAUBOIS, J. L.; OLIVIER, G. New applications of membrane processes. In: **IDF Special Issue n. 9201**, Brussels: International Dairy Federation, Belgium, 1992. p. 15-22.

McINTOSH, G. H.; ROYLE, P. J.; LE LEU, R. K.; REGESTER, G. O.; JOHNSON, M. A.; GRINSTED, R. L.; KENWARD, R. S.; SMITHERS, G. W. Whey protein as functional food ingredients? **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 8, p. 425-434, 1998.

MODLER, W. Milk processing. In: NAKAI, S.; MODLER, W. (Ed.). **Food proteins: processing applications**. Willey: VCH, 2000. p. 81-88.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. P.; BUREN, V.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. Collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985.

\_\_\_\_\_; HÁ, Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Florida, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

PEARCE, R. J. In: ZADOW, J. G. (Ed.). **Whey and lactose processing**, New York: Elsevier Applied Science, 1992. p. 272-311.

REGESTER, G. O.; McINTOSH, G. H.; LEE, V. W. K.; SMITHERS, G. W. Whey protein as nutritional and functional food ingredients. **Food Australia**, Waterloo, v. 48, p. 123-127, 1996.

ROSEMBERG, M. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. **Trends in Food Science and Technology**, Singapore, v. 1, n. 6, p. 12-19, 1995.

SMITHERS, G. W.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D.; KIRTHE, J. A.; DIONYSIUS, D. A.; FRANCIS, G. L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P. A.; McINTOSH, G. H.; MITCHELL, I. R.; PEARCE, R. J.; REGESTER, G. O. Symposium: advances in dairy foods processing and engineering. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 8, p. 1454-1459, 1996.

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

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, Washington D.C., v. 39, n. 10, p. 1412-1415, 1967.

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

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K. Combination processes in food irradiation. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 6, n. 1, p. 7-11, 1995.

USDEC - UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. **Manual de referência para produtos de soro dos Estados Unidos da América**. Arlington, 1997, 70 p.

VANDERVANT, C.; SPLIPPSPOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed., Washington, D.C: American Public Health Association, 1992. 1219 p.

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

ZINSLY, P. F.; SGARBIERI, V. C.; PEREIRA DIAS, N. F. G.; JACOBUCCI, H. B.; PACHECO, M. T. B.; BALDINI, V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 4, n. 52, p. 1-8, 2001.

## CAPÍTULO 3

### ESTUDO DO ESTÍMULO IMUNOLÓGICO DE PROTEÍNAS DE DIFERENTES FONTES: ADAPTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

#### RESUMO

Camundongos das linhagens A/J, Balbi C, Swiss e C<sub>57</sub>Bl/6 foram alimentados durante 21 dias com dieta contendo 20% de caseína e testados quanto à resposta antigênica ao desafio com hemácias de carneiro. Os animais A/J e Balbi C apresentaram os melhores resultados. O possível efeito imunomodulador atribuído a proteínas da dieta foi verificado com camundongos machos da linhagem A/J, que receberam durante 21 dias dietas contendo 20g de proteína/100g de dieta das fontes protéicas: IM, imunocal<sup>TM</sup>; CSD-L (concentrado protéico de soro de leite liofilizado); CSD-S (CSD seco em “spray dryer”); CC (caseína comercial) e IPS (isolado protéico de soja). Os melhores resultados (média ± desvio padrão) expressos em n° de células formadoras de placas (CFP)/baço foram obtidos com animais que se alimentaram com proteínas de soro: IM (80760 ± 17470), CSD-L (75840 ± 15200) e CSD-S (69490 ± 13570). A CC e o IPS apresentaram os piores resultados, 36570 ± 6850 e 26760 ± 4870. O efeito imunomodulador verificado pode estar relacionado com o perfil de aminoácidos de cada proteína, visto que todas tinham valor nutricional similar. A irradiação do CSD-L com doses de 3 e 5kGy promoveu efeitos distintos na resposta imune, observando-se valores mais elevados de CFP/baço em dose menor de irradiação.

#### 3.1 INTRODUÇÃO

As células e moléculas responsáveis pela imunidade constituem o sistema imune que protege o organismo de substâncias estranhas, incluindo tanto

microrganismos quanto macromoléculas como proteínas e polissacarídeos, sem que tais reações impliquem conseqüências fisiológicas ou patológicas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1997).

A resposta imune específica pode ser classificada em humoral e celular, dependendo dos componentes do sistema mediador da resposta. No primeiro caso a resposta imune é mediada por linfócitos B que ativados, diferenciam-se em plasmócitos capazes de produzir anticorpos. A imunidade humoral constitui o principal mecanismo de defesa contra micróbios extracelulares e suas toxinas, aos quais os anticorpos se ligam, promovendo sua destruição. No segundo caso, a resposta imune é mediada por linfócitos T, sendo conhecida por imunidade celular. Há duas classes principais de linfócitos T: as citotóxicas, que matam as células infectadas por vírus e as células T auxiliares e inflamatórias, com função ativadora sobre outras células, como os linfócitos B e os macrófagos (ROITT, 1999; STITES; TERR; PARSLOW, 2000).

A avaliação da resposta de anticorpos na imunidade humoral é relativamente simples, enquanto que a imunidade mediada por células T, imunidade celular é tecnicamente bem mais difícil de ser medida (JANEWAY et al., 1999).

Os efeitos dos nutrientes da dieta no sistema imune e na resposta imune são complexos (CUNNINGHAM-RUNDLES, 1994; 1998). Os nutrientes derivados de proteínas da dieta, carboidratos e lipídios, bem como micronutrientes, vitaminas e minerais interagem sistematicamente com as células do sistema imunológico na circulação sangüínea, nos linfonodos e no sistema imune especializado do trato gastrintestinal (PRINDULL; AHMAD, 1993). Os efeitos de um nutriente isolado dependem de sua concentração e da interação com outros nutrientes. A idade do animal também é fator importante (CHANDRA, 1993a; 1993b).

Há evidências de que proteínas de boa qualidade, identificadas de acordo com sua capacidade de promover crescimento, possam diferir em sua capacidade imunomoduladora. Estudos efetuados com camundongos adultos (BOUNOUS,

BATIST; GOLD, 1989; BOUNOUS; KONGSHAVN, 1989; BOUNOUS; GOLD, 1991; WONG; WATSON, 1995) e jovens (PARKER; GOODRUM, 1992) encontraram maior efeito imunomodulador para as proteínas de soro de leite, comparadas à caseína e várias outras proteínas de origem animal, vegetal e de algas. A maior parte dessas informações relaciona-se à resposta primária dependente do timo em resposta ao desafio com hemácias de carneiro, medidos em termos de contagem de células formadoras de placas (WOODWARD, 1998).

As proteínas de soro contém altas concentrações de cisteína e a atividade imunomoduladora apresentada pelas proteínas de soro foi atribuída à sua habilidade em aumentar os níveis de glutathione nos órgãos linfóides em resposta a um desafio antigênico (BOUNOUS; KONGSHAVN, 1989; BOUNOUS; GOLD, 1991). Esses achados foram à base de um ensaio preliminar, no qual dois indivíduos HIV positivos exibiram elevação modesta nos níveis séricos de glutathione celular após três meses de suplementação com concentrado protéico de soro (BOUNOUS et al., 1993).

Os objetivos do presente trabalho foram: verificar entre algumas linhagens de camundongos, qual apresentaria melhor resposta frente a um desafio antigênico e qual proteína da dieta estaria associada a esse perfil de resposta; analisar a influência do ambiente na resposta imunológica e avaliar o efeito da irradiação de componentes da dieta na imunomodulação.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Materiais

Para testar o efeito imunomodulador de proteínas da dieta utilizaram-se as seguintes fontes: concentrados protéicos de soro doce, secos por liofilização (CSD-L) ou atomização em “spray dryer” (CSD-S); produzidos em planta piloto do

TECNOLAT, ITAL, Campinas, SP (processo descrito anteriormente no capítulo 2); o Immunocal<sup>TM</sup> - IM (Immunotec Clinical Foundation, Canada), caseína comercial – CC (M Cassab, SP) e isolado protéico de soja – IPS (Samprosoy 90, Ceval, Esteio, RS.). A metodologia utilizada para produção do concentrado protéico de soro doce encontra-se descrita em Zinsly e outros (2001). A caracterização desses materiais foi efetuada de acordo com as seguintes metodologias: proteínas por micro-Kjeldahl (%N x fator de conversão), cinzas, sólidos totais e umidade (AOAC, 1990); lipídios totais (BLIGH; DYER, 1959); carboidratos (ACTON, 1977).

### 3.2.2 Ensaio biológicos

Foram efetuados 4 ensaios biológicos com camundongos. O primeiro teve como objetivo determinar qual linhagem apresentaria melhor resposta ao teste imunológico. No segundo ensaio foram utilizados camundongos da linhagem A/J visando comparar o efeito imunomodulador de fontes protéicas utilizadas nas dietas. O terceiro ensaio foi desenvolvido visando verificar a interferência do ambiente na resposta imune, o que foi avaliado mantendo-se animais dentro e fora de isolador, em condições sanitárias controladas. No último ensaio buscou-se verificar os efeitos de 2 doses de irradiação do concentrado protéico de soro doce, testadas e apresentadas no capítulo 2 como eficientes no controle microbiológico, na imunomodulação.

### **Animais de experimentação**

Foram utilizados camundongos machos SPF (“specific pathogen free”) e imunocompetentes, de 6-8 semanas, obtidos do CEMIB/Unicamp, Campinas, SP. As linhagens testadas foram as seguintes: Swiss (heterogênicos), C<sub>57</sub>Bl/6, Balb C e A/J (isogênicos). Em todos os ensaios os animais foram separados em grupos, de modo que não houvesse diferença de médias de peso entre os grupos. Eles foram mantidos em caixas plásticas próprias para camundongos (4 animais/caixa), forradas com maravalha (camas) e colocadas em ambiente com

temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo de luz claro, escuro de 12 horas. Os grupos foram aleatoriamente distribuídos entre os tratamentos. Os potes contendo as dietas foram trocados diariamente, a água e as camas, 2 vezes por semana. Água e dieta foram fornecidas “ad libitum”. Os protocolos experimentais utilizados nos ensaios biológicos encontram-se esquematizados nas figuras 1 a 4.

### **Dietas utilizadas**

As dietas foram formuladas de acordo com a AIN-93G (REEVES et al., 1993) modificada quanto à concentração de proteína (20%), sendo isoprotéicas e isocalóricas.

No primeiro ensaio a fonte de proteína utilizada na dieta foi a caseína comercial (CC). No segundo foram avaliadas diferentes fontes protéicas: concentrados protéicos de soro doce (CSD-S e CSD-L), imunocal<sup>TM</sup> (IM), caseína comercial (CC) e isolado protéico de soja (IPS). No ensaio 3, as protéicas das dietas vieram da CC e do CSD-L. No último ensaio, o CSD-L utilizado nas formulações das dietas foi irradiado na EMBRARAD, em São Paulo, com dosagens de 3 e 5kGy. Cada dieta correspondeu a um tratamento.

As determinações de proteínas das dietas foram feitas pelo método micro Kjeldahl (AOAC, 1990). Em todos os ensaios os animais receberam as formulações durante 21 dias. As dietas foram porcionadas em capela de fluxo laminar. A tabela 1 apresenta a composição das dietas experimentais.

Tabela 1 – Formulações de dietas semi-purificadas e a referência AIN-93G, utilizadas por camundongos das linhagens Swiss, C<sub>57</sub>Bl/6, Balbi C e A/J para verificação da resposta imune humoral.

Ingredientes	Quantidade (g/kg de dieta)					
	AIN-93G <sup>1</sup>	CSD-S <sup>2</sup>	CSD-L <sup>3</sup>	IM <sup>4</sup>	CC <sup>5</sup>	IPS <sup>6</sup>
Amido	397,49	390,36	397,51	395,28	397,38	397,47
Fonte protéica	200,00*	243,63	238,66	218,70	241,54	217,39
Amido dextrinizado	132,00	132,00	132,00	132,00	132,00	132,00
Óleo de soja	70,00	57,09	59,24	69,74	65,44	68,92
Sacarose	100,00	84,24	78,76	86,99	71,62	92,40
Celulose	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Minerais	35,00	27,47	28,32	31,77	26,53	26,31
Vitaminas	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
L-cistina	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Bitartarato de colina	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Tertbutilhidroquinona	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014

<sup>1</sup>Caseína comercial com teor de proteínas maior ou igual a 85%; <sup>2</sup>concentrado protéico de soro seco em “spray dryer”; <sup>3</sup>concentrado protéico de soro seco em liofilizador; <sup>4</sup>immunocal<sup>TM</sup>; <sup>5</sup>caseína comercial; <sup>6</sup>isolado protéico de soja.

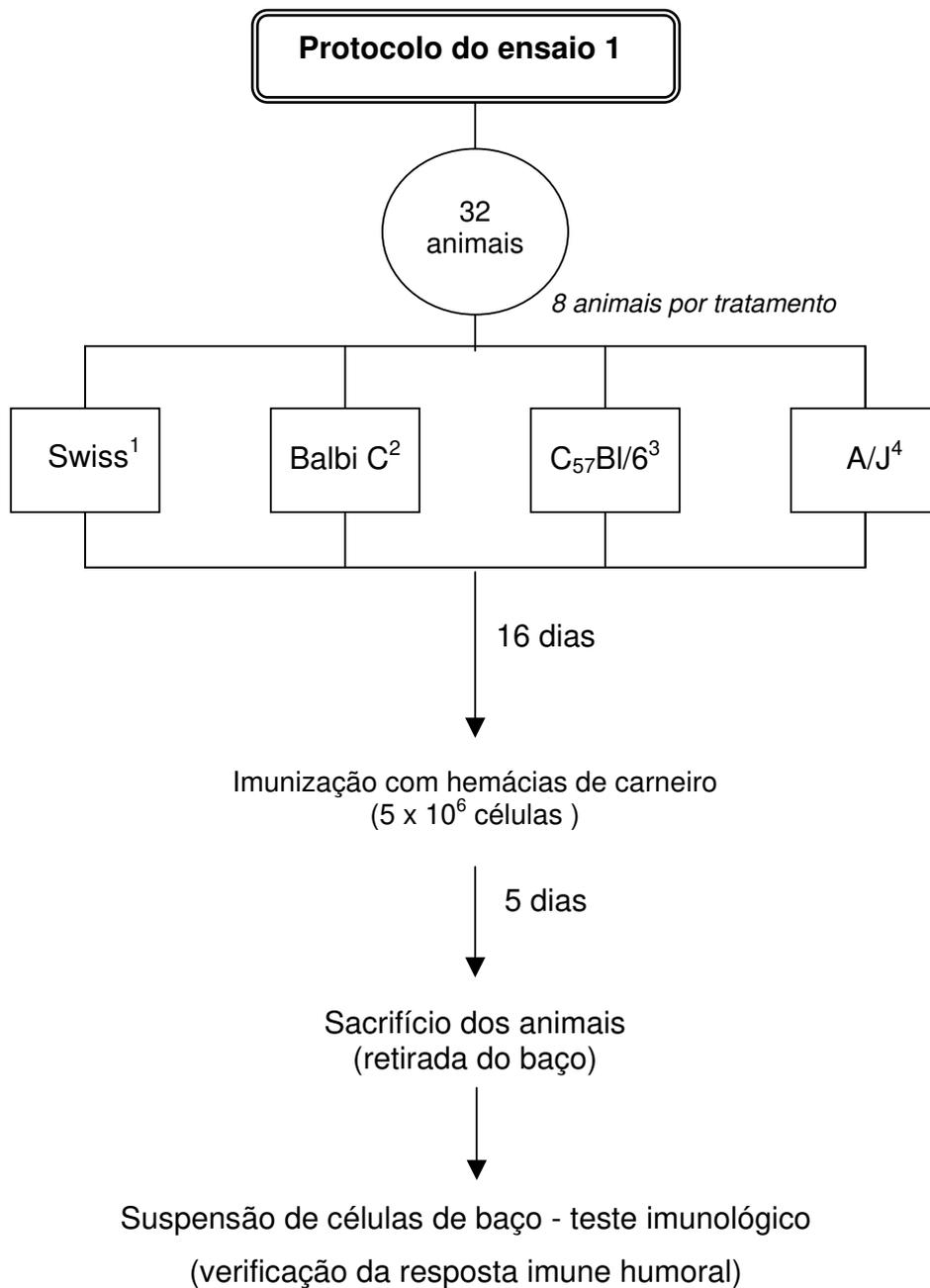


Figura 1 - Protocolo experimental para ensaio imunológico efetuado com camundongos machos, submetidos a dietas com 20% de caseína.  
<sup>1,2,3,4</sup> Linhagens de camundongos.

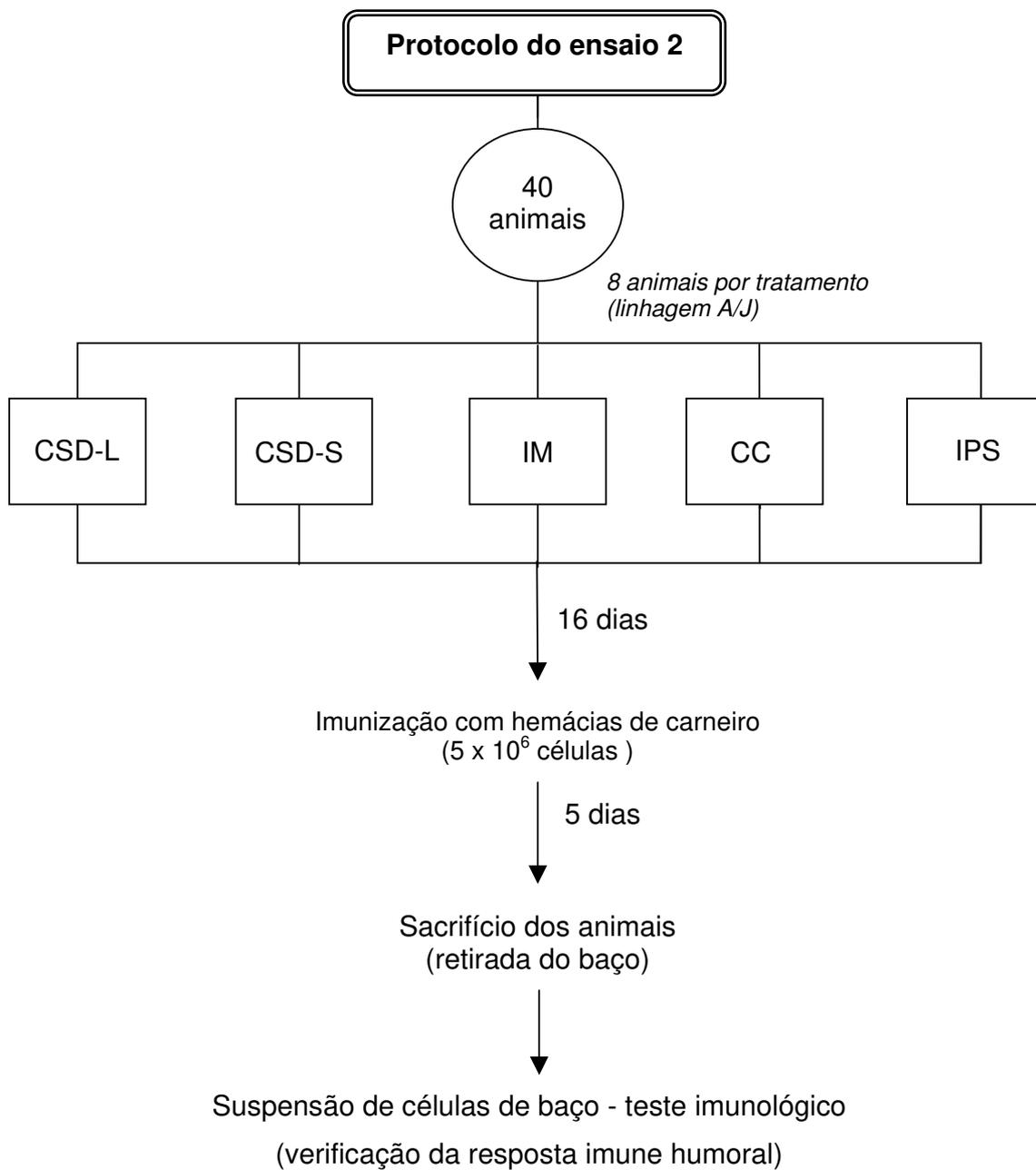


Figura 2 - Protocolo experimental para ensaios imunológicos efetuados com camundongos machos isogênicos submetidos a dietas contendo 20% de diferentes fontes de proteínas, a saber: os concentrados protéicos de soro doce (CSD-L, CSD-S e IM<sup>TM</sup>), caseína comercial (CC) e isolado protéico de soja (IPS).

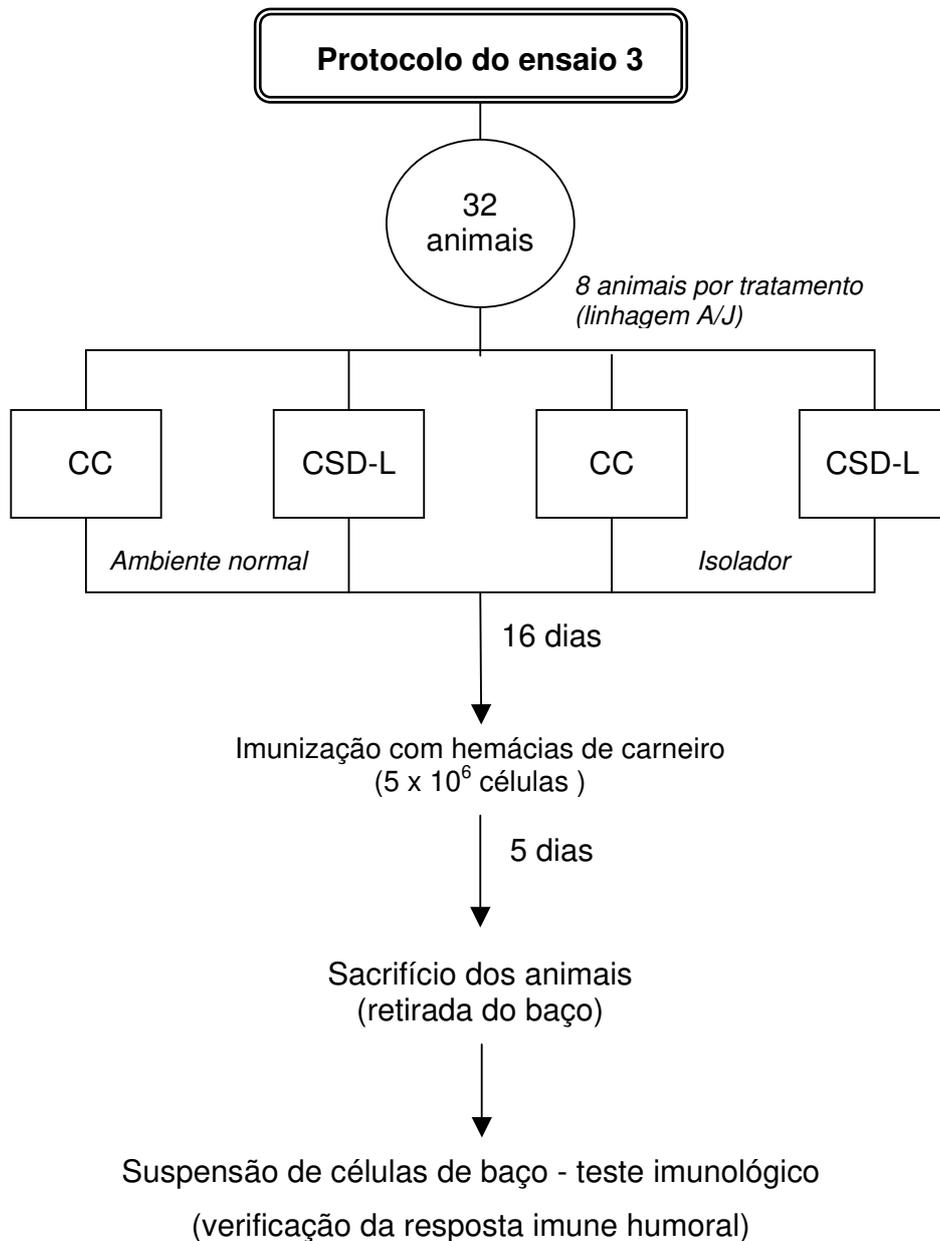


Figura 3 – Ensaio imunológico efetuado com camundongos machos isogênicos da linhagem A/J, submetidos a dietas com 20% de proteínas e mantidos em ambiente normal e em isolador. Tratamentos: CC, caseína comercial; CSD-L, concentrado protéico de soro doce liofilizado.

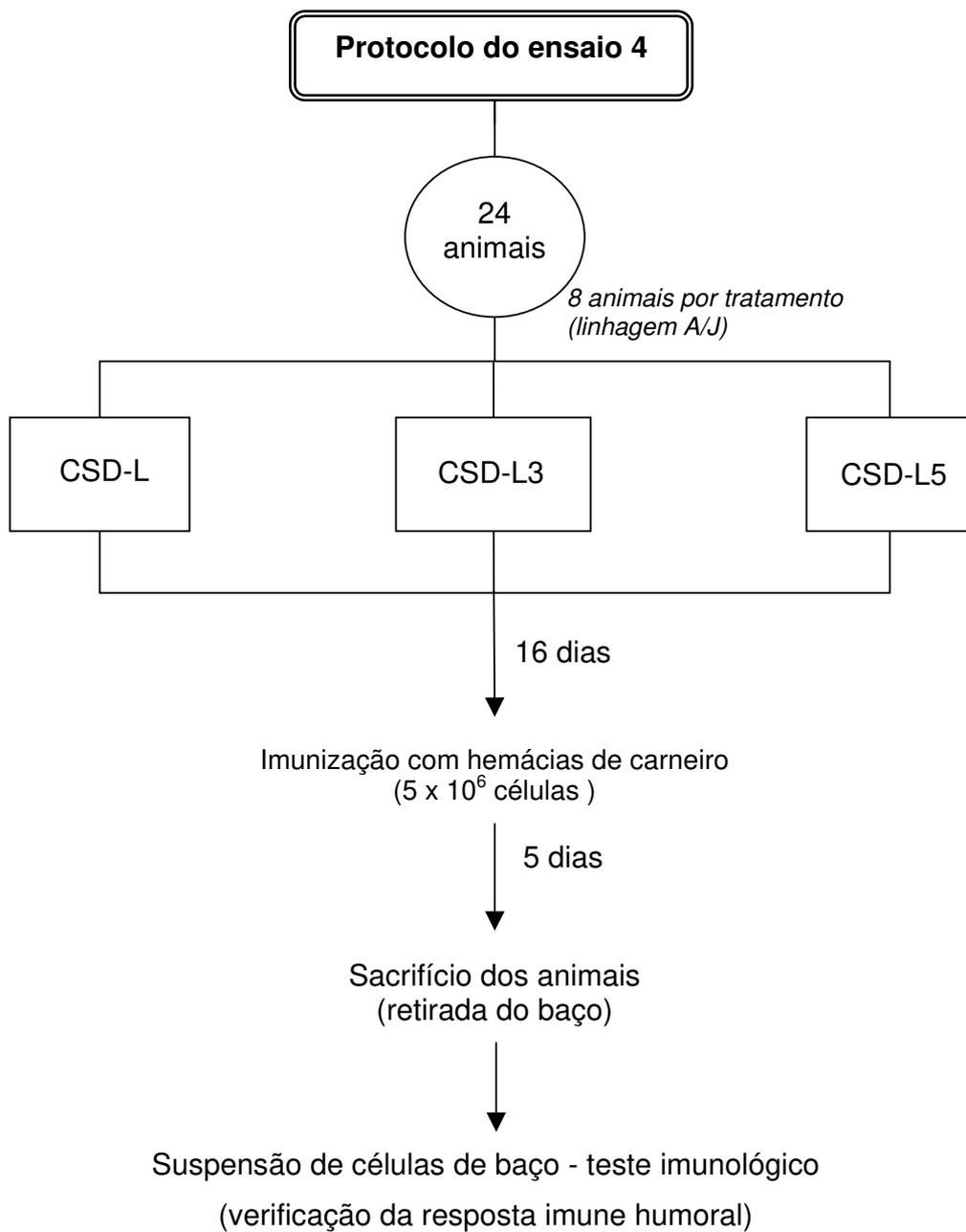


Figura 4 - Ensaio imunológico efetuado com camundongos machos isogênicos da linhagem A/J, recebendo dietas com 20% de proteínas. Tratamentos: CSD-L (concentrado protéico de soro doce liofilizado), CSD-L3 e CSD-L5 (concentrados protéicos liofilizados e irradiados com doses com 3 e 5kGy, respectivamente).

## **Ganho de peso**

Parâmetro utilizado para verificar a eficiência das dietas. Não foi possível utilizar outros índices porque os animais foram mantidos em grupos nas caixas plásticas, sendo impossível verificar o consumo individual de dieta. Além disso, as dietas eram em forma de pó, possibilitando maior desperdício.

## **Teste imunológico para verificação de células formadoras de placas IgM (CFP)**

Para a imunização dos animais foram utilizadas suspensões de hemácias de carneiro padronizadas, obtidas semanalmente em solução de Alséver, do Biotério Boa Vista, Campinas, SP. Após 16 dias recebendo a dieta, os animais foram imunizados com  $5 \times 10^6$  hemácias de carneiro lavadas em tampão borato. A contagem de CFP foi efetuada de acordo com o método modificado de Cunningham e Szenberg (1968). Os animais foram sacrificados 5 dias após a imunização quando, de acordo com a literatura e confirmado em testes laboratoriais, acontece o pico de resposta. Os baços foram retirados e alíquotas de suspensão de suas células foram colocadas a reagir com hemácias e complemento de cobaia, em lâminas tratadas com agarose. Após tempo previamente determinado a reação foi interrompida e a contagem de placas foi efetuada com auxílio de lupa.

### **3.2.3 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa "Statistica 6.0" (Stat Soft Inc, Tulsa, USA). Os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (GOMES, 1982).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal aproximada dos concentrados protéicos utilizados na produção das dietas para os ensaios biológicos com camundongos está apresentada na tabela 2.

Tabela 2 – Composição centesimal aproximada (média  $\pm$  desvio padrão), em base seca, dos concentrados protéicos de soro de leite bovino, caseína comercial e isolado protéico de soja.

Componente	Fontes protéicas (%)				
	CSD-L <sup>1</sup>	CSD-S <sup>2</sup>	IM <sup>3</sup>	IPS <sup>4</sup>	CC <sup>5</sup>
Proteína (N x fator)	83,8 $\pm$ 2,60 <sup>b</sup>	82,1 $\pm$ 2,90 <sup>b</sup>	91,4 $\pm$ 3,14 <sup>a</sup>	92,0 $\pm$ 2,80 <sup>a</sup>	82,8 $\pm$ 2,70 <sup>b</sup>
Lipídios totais	4,5 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	5,4 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,5 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	1,9 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>
Cinzas	2,8 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	3,1 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>	1,48 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>	4,0 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>
Carboidratos*	8,9 $\pm$ 1,60 <sup>a</sup>	6,5 $\pm$ 0,81 <sup>b</sup>	5,95 $\pm$ 1,03 <sup>b</sup>	3,5 $\pm$ 0,58 <sup>c</sup>	11,7 $\pm$ 1,96 <sup>a</sup>

Determinações feitas em triplicata. <sup>1</sup>Concentrado protéico de soro liofilizado; <sup>2</sup>Concentrado protéico de soro seco em “spray dryer”, <sup>3</sup>Immunocal<sup>TM</sup>; <sup>4</sup>Isolado protéico de soja e <sup>5</sup>Caseína comercial. CSD-L, CSD-S, IM e CC (F = 6,38). IPS (F = 6,25). \*Determinado como lactose, exceto para o IPS, obtida por diferença. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Todos os produtos apresentaram concentração de proteína acima de 80%, sendo que os dois concentrados protéicos de soro, seco por liofilização (CSD-L) e por “spray dryer” (CSD-S), apresentaram concentrações de proteína bem próximas. Os lipídios totais apareceram mais elevados nos concentrados protéicos (CSD-L e CSD-S) do que no Immunocal (IM<sup>TM</sup>), um isolado protéico de soro de leite bovino, produzido no Canadá. Isso talvez se deva a diferenças na eficiência do

desnate da matéria prima. Quanto à lactose, o mais alto teor (11,75%) foi determinado na caseína comercial (CC) seguido do CSD-L (8,9%), CSD-S (6,47%) e IM<sup>TM</sup> (5,95%). O IPS apresentou o menor teor de carboidratos (3,5%). A composição dos concentrados protéicos de soro produzidos no ITAL, CSD-L e CSD-S, apresentada na tabela 2 assemelha-se bastante à da literatura, para os mesmos tipos de produtos (JOST, 1993).

Na figura 5 estão representados os resultados do teste de CFP efetuado para verificar a resposta imunológica dos camundongos. Os animais receberam o mesmo tipo de dieta, não havendo diferenças significativas no ganho de peso ( $p > 0,05$ ) entre as linhagens C<sub>57</sub>B/6, A/J, Balbi C e Swiss, respectivamente:  $11,36 \pm 1,48g$ ,  $11,61 \pm 1,87g$ ,  $10,83 \pm 1,94g$  e  $10,59 \pm 2,23g$ .

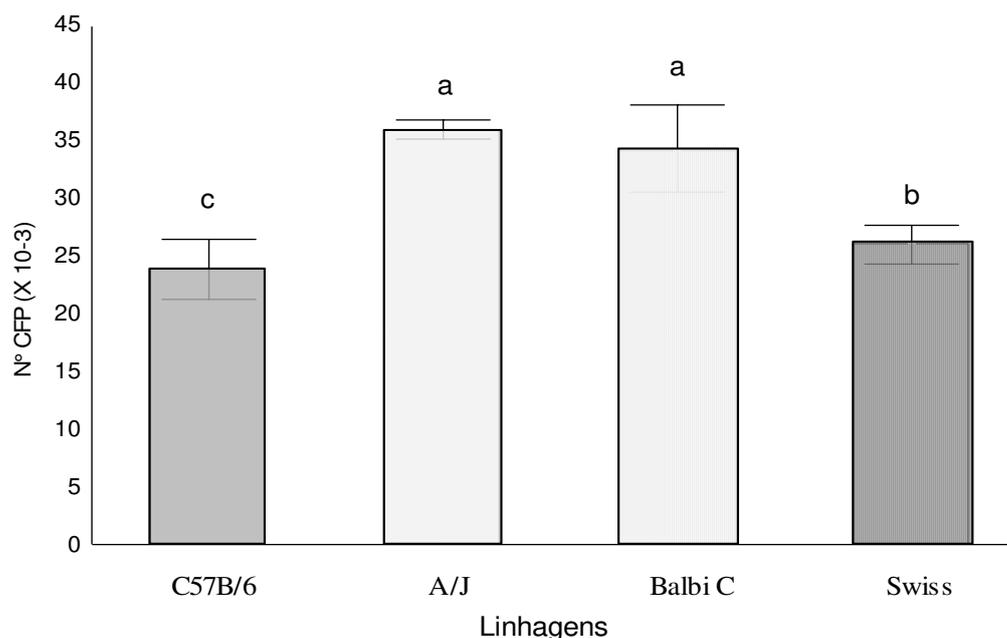


Figura 5 – Resposta imune humoral observada em camundongos de quatro linhagens, alimentados durante 21 dias com dieta contendo 20% de proteína. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). CFP (células formadoras de placas/baço).

A resposta imune humoral verificada após imunização com  $5 \times 10^6$  hemácias de carneiro, diferiu entre os grupos. Os melhores resultados de células formadoras de placas/baço foram obtidos com animais A/J ( $35690 \pm 2600$ ) e Balbi C ( $34480 \pm 2800$ ), que diferiram estatisticamente dos Swiss ( $26300 \pm 2240$ ) e dos C<sub>57</sub>Bl/6 ( $22800 \pm 1859$ ). Foi possível observar que os camundongos C<sub>57</sub>Bl/6, permaneceram muito agitados durante todo o experimento, enquanto os Balbi C brigaram bastante, ferindo-se no decorrer do ensaio.

Embora não houvesse diferença estatística entre os resultados para número de CFP observados para os camundongos A/J e Balbi C, preferiu-se trabalhar nos ensaios seguintes com os camundongos A/J por demonstrarem menores níveis de agitação e estresse, o que provavelmente, os favoreceria em ensaios de longa duração.

Na figura 6 estão representados os resultados do teste de CFP desenvolvido para verificar a existência de efeito imunomodulador associado às proteínas da dieta. Todas as dietas utilizadas continham 20g de proteína/100g de dieta e apresentaram valor nutricional similar. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) de ganho de peso entre os tratamentos IM, CSD-S, CSD-L, CC e IPS, sendo:  $12,53 \pm 2,51g$ ,  $11,63 \pm 2,09g$ ,  $10,94 \pm 2,30g$  e  $13,33 \pm 1,98g$ , respectivamente.

Os melhores resultados (média  $\pm$  desvio padrão) foram obtidos para as dietas contendo proteínas de soro de leite: IM ( $80760 \pm 17470$ ), CSD-L ( $75840 \pm 15200$ ) e CSD-S ( $69490 \pm 13570$ ). A CC e o IPS apresentaram os piores resultados,  $36570 \pm 6850$  e  $26760 \pm 4870$ , respectivamente. Não foram observadas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) entre o IM e o CSD-L, e entre os concentrados protéicos secos por liofilizado e por atomização. Isto provavelmente aconteceu porque a desidratação em “spray” não promoveu desnaturação considerável que pudesse interferir na imunomodulação. Os resultados obtidos estão de acordo com outros da literatura, efetuados com as mesmas fontes

protéicas (BOUNOUS ; KONGSHAVN; GOLD, 1988; BOUNOUS; BATIST; GOLD, 1989).

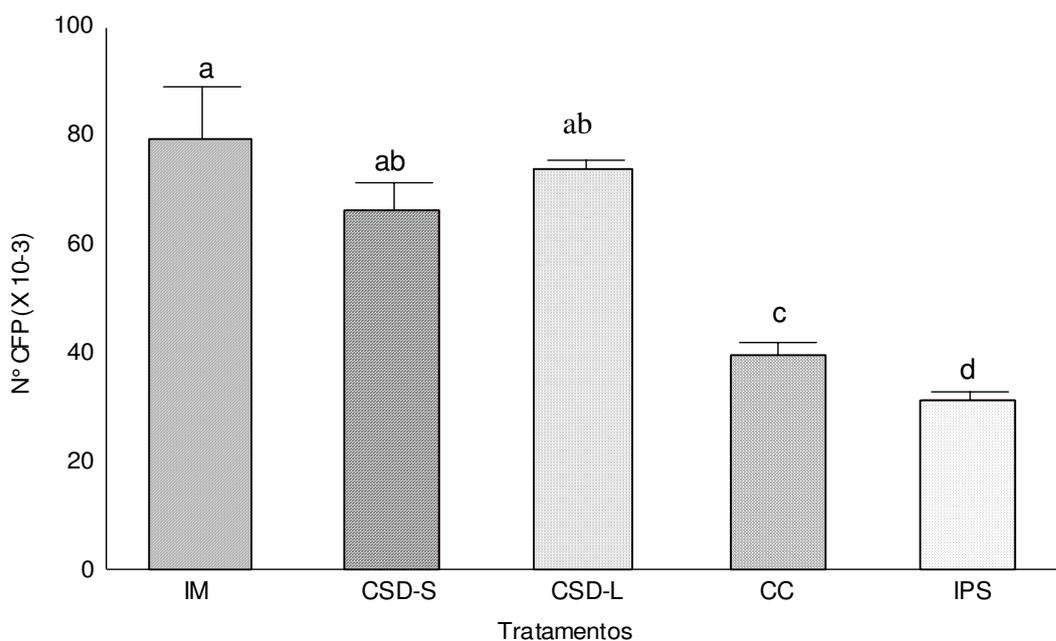


Figura 6 – Resposta imune humoral observada em camundongos da linhagem A/J alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteína, a saber: IM, imunocal™; CSD-L (concentrado protéico de soro de leite liofilizado); CSD-S (CSD seco em “spray dryer”); CC (caseína comercial) e IPS (isolado protéico de soja). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). CFP (células formadoras de placas/baço).

Foi possível verificar o efeito imunomodulador exercido por proteínas de soro de leite, o que pode ser resultado de sua composição em cisteína, componente considerado limitante à síntese de glutathione. O mesmo não aconteceu com os animais alimentados com IPS ou CC. Kidd (1997) e Bounous (2000) consideram que a resposta imune humoral, envolvida na produção de anticorpos, requer rápida síntese protéica que, por sua vez, requer ingestão

dietética adequada de aminoácidos essenciais encontrados nas proteínas do soro de leite.

Os resultados do terceiro ensaio estão representados na figura 7. O uso de isolador teve como objetivo controlar a qualidade sanitária de todo material que entrou em contato com os animais. Assim, as caixas, maravalha e água foram autoclavadas antes de serem colocadas no isolador. As dietas foram irradiadas e porcionadas em capela de fluxo laminar.

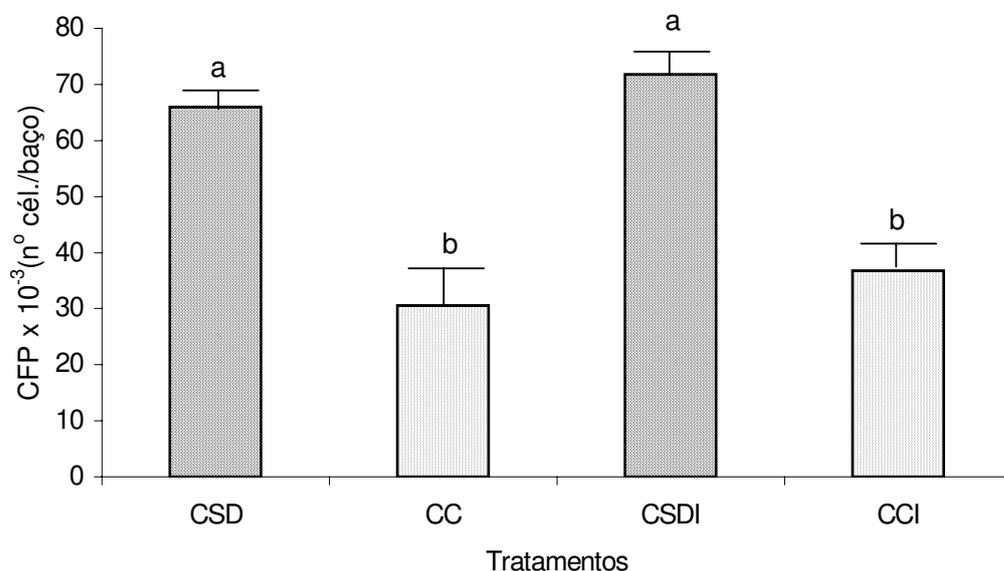


Figura 7 – Resposta imune humoral observada em camundongos da linhagem A/J alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteína, a saber: CC (caseína comercial) e CSD (concentrado protéico de soro de leite liofilizado). CSDI e CCI foram mantidos em isolador. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). CFP (células formadoras de placas/baço).

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) no perfil de resposta dos animais mantidos dentro e fora do isolador para um mesmo tipo de

dieta, não se observando, nesse caso, interferências do ambiente. Os melhores resultados de células formadoras de placas/baço foram obtidos dos animais alimentados com proteínas de soro de leite (CSD e CSDI) sendo, respectivamente,  $65568 \pm 8256$  e  $71733 \pm 6270$ . Os resultados obtidos para caseína foram  $30579 \pm 5540$  e  $36758 \pm 4269$  células/baço para CC e CCI, respectivamente, estatisticamente diferentes ( $p > 0,05$ ) daqueles verificados com o outro tipo de dieta.

É provável que as condições do ambiente possam exercer efeito na resposta imunológica de animais mantidos em ensaios de maior duração, 6 a 12 meses ou mais, quando estariam mais sujeitos a contaminações que pudessem interferir nos resultados.

Os efeitos de duas doses de irradiação (3 e 5kGy) sobre o perfil de resposta imune anteriormente observado para o concentrado protéico de soro de leite seco por liofilização estão representados na figura 8. Nesse ensaio também não foram observadas diferenças de ganho de peso dos animais entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), correspondendo a  $12,28 \pm 2,46g$ ,  $13,36 \pm 2,26g$  e  $11,45 \pm 2,73g$  para CSD-L, CSD-L3 e CSD-L5, respectivamente.

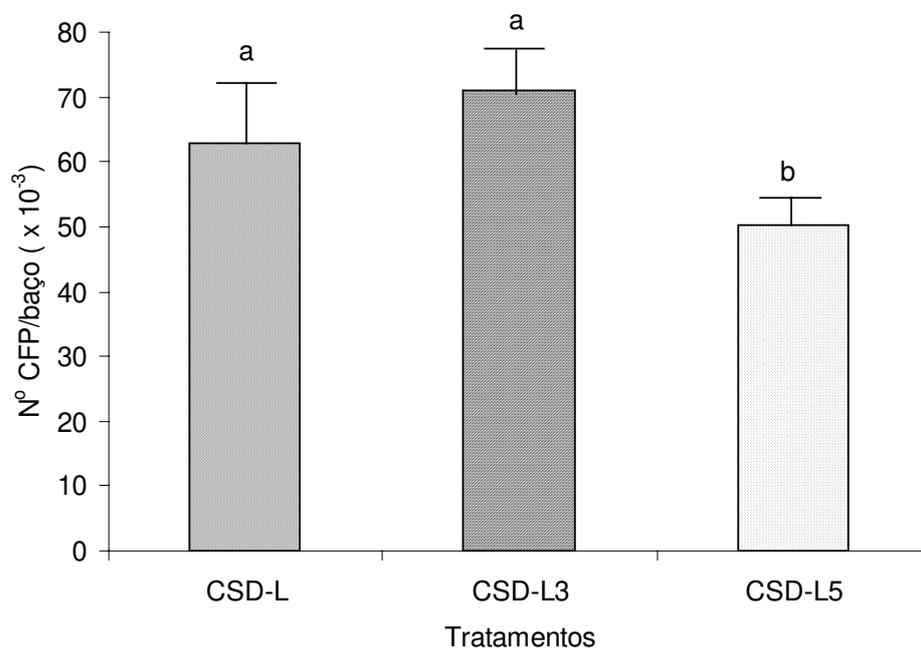


Figura 8 – Resposta imune humoral observada em camundongos da linhagem A/J alimentados durante 21 dias com dietas contendo 20% de proteína, a saber: CSD-L (concentrado protéico de soro doce liofilizado); CSD-L3 (irradiado com 3kGy) e CSD-L5 (irradiado com 5kGy). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Os melhores valores de resposta imune humoral, medidos por contagem de células formadoras de placas (média  $\pm$  desvio padrão), foram obtidos dos animais alimentados com CSD-L e CSD-L3 correspondendo, respectivamente, a  $68800 \pm 15400$  e  $71270 \pm 12860$  células/baço. O aumento da dose de irradiação para 5kGy promoveu redução do efeito imunomodulador ( $50265 \pm 8160$  células/baço), estatisticamente diferente daqueles anteriormente citados ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 CONCLUSÃO

Os camundongos da linhagem A/J responderam melhor ao estímulo antigênico promovido por imunização com hemácias de carneiro. Esses dados serviram de base para decidir quais animais seriam mais adequados para utilização em modelo de indução de câncer de cólon.

Os resultados obtidos sugerem a existência de um efeito imunomodulador das dietas contendo imunocal<sup>TM</sup> e concentrado protéico de soro doce liofilizado, ambas proteínas de soro de leite. Essas proteínas foram mais eficientes em modular a resposta imune, se comparadas à caseína e ao isolado protéico de soja.

Doses de irradiação das dietas acima de 3kGy não favoreceram o efeito imunomodulador observado para as proteínas de soro. Experiências realizadas em nossos laboratórios (não relatadas neste trabalho) confirmaram dados da literatura afirmando que, em condições que causem desnaturação da proteína, há redução significativa do efeito imunoestimulador.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Cellular and molecular immunology. 3rd. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997. 494 p.

ACTON, G. H. The determination of lactose in cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, North Melbourne, v. 9, p. 111-114, 1977.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - **Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemistry**, 15th. ed., Washington DC, 1990. 1141 p.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P.; GOLD, P. The immunoenhancing property of dietary whey protein concentrate. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 11, p. 271-278, 1988.

\_\_\_\_\_; BATIST, G.; GOLD, P. Immunoenhancing property of dietary protein in mice: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**. Ottawa, v. 12, n. 3, p.154-161, 1989.

\_\_\_\_\_; KONGSHAVN, P. A. L. Influence of protein type in nutritionally adequate diets on the development of immunity. In: FRIEDMAN, M. (Ed.). **Absorption and utilization of amino acids**. v. 2. Boca Raton: CRC, 1989. p. 219-233.

\_\_\_\_\_; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.

\_\_\_\_\_; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.; GOLD, P. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 16, n. 3, p. 204-209, 1993.

\_\_\_\_\_. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, Ulrich, v. 20, n. 6C, p. 4785-4792, 2000.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 52, n. 1, p. 77-84, 1993a.

\_\_\_\_\_. Influence of nutritional in the elderly. In: Cunningham-Rudles, S. (Ed.) **Nutrient modulation of immune response**. New York: Marcel Dekker, 1993b. p. 455-468.

CUNNINGHAM, A.; SZENBERG, A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. **Immunology**, Buenos Aires, v. 14, p. 599-600, 1968.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S. Malnutrition and gut immune function. **Current Opinion in Gastroenterology**, Philadelphia, v. 10, p. 664-670, 1994.

\_\_\_\_\_. Analytical methods for evaluation of the immune response in nutrient intervention. **Nutrition Review**, Baltimore, v. 56, n. 1, p. S27-S37, 1998.

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

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M; CAPRA, J. D. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 634 p.

JOST, R. Functional characteristics of dairy proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 4, n. 9, p. 283-288, 1993.

KIDD, P. M. Glutathione systemic against oxidative and free radical damage. **Alternative Medicine Review**, Idaho, v. 2, n. 3, p. 155-176, 1997.

PARKER, N. T.; GOODRUM, K. J. A comparison of casein, lactalbumin, and soy protein effect on the immune response to T-dependent antigen. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 10, p. 781-792, 1992.

PRINDULL, G.; AHMAD, M. The ontogeny of the gut mucosal immune system and the susceptibility to infection in infants of developing countries. **European Journal Pediatric**, San Diego, v. 152, n. 10, p. 786-792, 1993.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

ROITT, I. M. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 294p.

STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Imunologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 689 p.

WONG, C. W.; WATSON, D. L. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 62, n. 2, p. 359-368, 1995.

WOODWARD, B. Morphometric and functional studies of the thymus and production of cytokines in protein-energy malnutrition. In: YOUNG, K. W.; CHA, L. Y.; YULL, L. K.; SOON, J. J.; HE, K. S. (Ed.) **Proceedings of the XIV International Congress of Nutrition**. Seoul: International Union of Nutrition Science, 1998. p. 281-284.

ZINSLY, P. F.; SGARBIERI, V. C.; DIAS, N. F. G. P.; JACOBUCCI, H. B.; PACHECO, M. T. B.; BALDINI, V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 4, n. 52, p. 1-8, 2001.

## CAPÍTULO 4

### PROPRIEDADE ANTITUMORAL: METODOLOGIA DE ESTUDO E MONITORAMENTO

#### RESUMO

As possíveis propriedades imunoestimulatórias e antitumorais apresentadas por proteínas de soro de leite, nas formas de concentrado protéico de soro doce (CSD) e immunocal™ (IM), foram avaliadas comparativamente à caseína (CC) e ao isolado protéico de soja (IPS), ambos adquiridos no comércio. Para tal foram utilizadas 132 fêmeas de camundongos isogênicos da linhagem A/J, divididas em 4 grupos e mantidas em isolador, onde receberam durante 32 semanas, dietas formuladas segundo a AIN-76A (AIN, 1977) modificada, usando-se 20% de proteína e 15% de lipídios (44,2% de gordura de porco, 46,2% de óleo de milho e 9,6% de gordura de coco hidrogenada). As dietas só diferiram entre si quanto à fonte de proteína, a saber: CSD, IM, CC ou IPS. Após 4 semanas em dieta foram injetados, nos animais, azoximetano (5mg/kg de peso corporal) por via subcutânea durante 6 semanas consecutivas, para indução de câncer de cólon intestinal. Os animais foram monitorados quanto à evolução de peso; resposta imunológica (teste de CFP – células formadoras de placas), efetuada em baços de animais imunizados com  $5 \times 10^6$  hemácias de carneiro; concentrações de glutathiona hepática e desenvolvimento do câncer (presença de focos de criptas aberrantes – FCA e tumores), no cólon. Não houve diferença estatística de ganho de peso entre os tratamentos durante todo o experimento ( $p > 0,05$ ). Os animais em dietas contendo proteínas de soro (CSD e IM) apresentaram os melhores resultados para número de células formadoras de placa em todos os tempos analisados. Obteve-se uma forte correlação positiva entre as concentrações de glutathiona no fígado e o número CFP, no baço dos camundongos ( $r = 0,998$  e  $r = 0,995$ ), com 4 semanas e 30-32 semanas de tratamento, respectivamente. Um número maior de FCA foi

encontrado em mucosas de cólon de animais em dietas com IPS ( $7,70 \pm 1,44$ ), seguido dos animais em CC ( $5,33 \pm 0,83$ ). Os menores valores foram encontrados para o CSD ( $3,60 \pm 0,53$ ) e IM ( $3,36 \pm 0,39$ ), estatisticamente iguais, diferindo do IPS e também da CC ( $p < 0,05$ ). Os animais com menor quantidade de FCA, em dietas com CSD e IM, apresentaram também menor número de tumores. Esses resultados permitiram inferir que, independente de quais sejam os mecanismos, as proteínas do leite e, em especial, as proteínas do soro, ofereceram considerável proteção aos animais, contra a indução de tumores de cólon por azoximetano, em relação às outras fontes protéicas analisadas.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

A depender da dieta, ela pode ser considerada fator de risco no desenvolvimento de várias doenças, incluindo câncer (ROWLANDS et al., 2001). Estima-se que 10 a 30 anos sejam necessários para que células normais se alterem em tumores clinicamente detectáveis. Durante esse período relativamente longo, a dieta pode exercer efeito promotor ou inibidor no desenvolvimento da doença (BENNINK, 2001).

Vários estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de dietas ricas em produtos de soja reduz a incidência de câncer de cólon, mama e próstata (ADLERCREUTZ et al., 1995; PERSKY; VAN HORN, 1995). Outros estudos demonstram que as proteínas de soro de leite bovino também podem prevenir o câncer (BOUNOUS; GOLD, 1991). As proteínas de soja e de soro de leite reduzem a incidência de tumores de mama induzidos em ratas por dimetilbenzantraceno, embora não estejam ainda claros os mecanismos de ação (HAKKAK et al., 2000).

Ensaio efetuados com animais demonstraram que o efeito anticâncer apresentado por proteínas de soro de leite ocorre, concomitantemente ao aumento nas concentrações de glutathione (GSH) nos tecidos, podendo esta exercer efeito antitumoral por estimulação da imunidade humoral e celular. Sendo a produção de

radicais livres um passo crítico na carcinogênese, a eliminação desses radicais é importante para inibir o desenvolvimento da doença. As propriedades anticâncer são atribuídas às habilidades apresentadas por essas proteínas em aumentar os níveis de glutathione celular, agente quelante e antioxidante natural, como foi sugerido por Bounous e Gold (1998) e Bounous (2000) que exerce função importante na neutralização de radicais livres e na desintoxicação dos tecidos, além de estimular a produção de anticorpos e os mecanismos de defesa do organismo. O efeito anticâncer pode se dar por aumento na detecção e no combate de células alteradas por células de defesa do organismo (ROWLANDS et al., 2001).

Várias pesquisas feitas para desvendar como isso acontece revelaram um efeito biológico de natureza protetora, com relação à suscetibilidade ao câncer e às doenças associadas ao envelhecimento, as quais parecem estar relacionadas com redução nos níveis de glutathione e de seus efeitos na proteção contra radicais livres e outros agentes tóxicos (BOUNOUS; KONGSHAVN; GOLD, 1988; BOUNOUS; GOLD, 1991; BOURTOURAUULT et al., 1991; HAKANSON et al., 1995; BOUNOUS, 1997).

As duas hipóteses mais aceitas a respeito da origem do câncer citam que a função protetora exercida pela glutathione se deve à promoção de ação antioxidante e desintoxicante. Existe forte correlação entre os mecanismos associados ao envelhecimento e ao aparecimento do câncer uma vez que sua incidência em seres humanos e em animais aumenta, consideravelmente, com a idade. Além disso, as teorias do envelhecimento se baseiam na existência de um acúmulo de lesões que não são corrigidas em tempo hábil, tal é a teoria de radicais livres e outras que explicam a origem de alguns tumores. Richie (1992) associou o aumento na incidência de câncer associado à idade, ao acúmulo e à maior exposição a agentes carcinógenos, ao longo da vida. De fato, encontrou-se um efeito desintoxicante pela conjugação de glutathione de pelo menos 11 carcinógenos, a saber: aflatoxina B1, N-acetil-2-aminofluoreno, benzantraceno, benzapireno, benzydina, dimetilhidrazina, etilmetilsulfonato, N-metil-4-

aminoazobenzeno, 7-metilbenzantraceno, 3-metil-colantraceno e 1-nitropireno (BOUNOUS, 1997).

Os perfis de aminoácidos característicos de diferentes proteínas podem influenciar a intensidade da resposta imune. Camundongos alimentados com dietas contendo 20% de proteínas de soro de leite apresentaram resposta imune humoral a hemácias de carneiro, significativamente maior do que a observada em animais com outras dietas de eficiência nutricional similar (BOUNOUS; KONGSHAVN; GOLD, 1988).

Estudos efetuados na Universidade de Wisconsin (USA) mostraram que níveis consideráveis de andrógenos são capazes de promover redução nos níveis de glutathione em células da próstata, podendo promover o câncer. Por outro lado, o aumento nos níveis de glutathione no cólon intestinal, verificado após ingestão de proteínas de soro de leite, foi associado à diminuição nos tumores em experimentos feitos com carcinoma humano de cólon, sugerindo que os níveis teciduais de glutathione modulam a tumorigênese (RIPPLE et al., 1997).

Algumas das propriedades anticâncer apresentadas por produtos de soja são atribuídas a fitoestrógenos como a genisteína, ligados às proteínas. Vários estudos "in vitro" revelaram que a genisteína pode inibir o crescimento de várias células tumorais, bem como a atividade de várias enzimas necessárias ao crescimento e diferenciação celular (BARNES; PETERSON; COWARD, 1995).

Estudos controlados que examinaram a relação entre o consumo de soja e câncer de cólon intestinal foram revistos por Messina e Benning (1998), que não encontraram dados que suportassem uma relação inversa entre a ingestão de soja e o risco de desenvolvimento da doença.

O uso de animais como modelos experimentais para indução química de câncer, permite obter informações sobre as características do desenvolvimento e a modulação da doença. A dimetilhidrazina e seu metabólito azoximetano são

muito utilizados em estudos de indução de câncer de cólon em animais susceptíveis (MA et al., 1996).

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar os efeitos de diferentes fontes protéicas, na prevenção de câncer de cólon intestinal, induzido quimicamente por azoximetano.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Composição química da fonte protéica

Para verificação de possíveis propriedades imunoestimulatórias e antitumorais, utilizaram-se como fontes de proteínas, o concentrado protéico de soro doce produzido em planta piloto do TecnoLat, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, SP (processo descrito anteriormente no capítulo 2); o Immunocal™ (Immunotec Clinical Foundation, Canada), a caseína comercial (M. Cassab, São Paulo, SP) e o isolado protéico de soja (Samprosoy 90, Ceval, Esteio, RS). A caracterização desses materiais foi efetuada de acordo com as seguintes metodologias: proteínas por Kjeldahl (%N x fator de conversão), cinzas, sólidos totais e umidade (AOAC, 1990); lipídios totais extraídos pelo procedimento de Bligh e Dyer (1959) e quantificados gravimetricamente; carboidratos (ACTON, 1977).

A composição em aminoácidos, exceto triptofano, foi determinada por hidrólise ácida e cromatografia de troca catiônica em analisador automático, seguindo basicamente o método modificado de Spackman e outros (1958). O triptofano foi determinado pelo método de Spies (1967). Detalhes do método foram descritos no capítulo 2.

#### 4.2.2 Ensaio biológico com camundongos

Utilizaram-se 132 fêmeas de camundongos isogênicos da linhagem A/J, de 6-8 semanas de idade, obtidos do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Unicamp em Campinas, SP. O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA), do Instituto de Biologia da Unicamp. O protocolo experimental encontra-se descrito na figura 1.

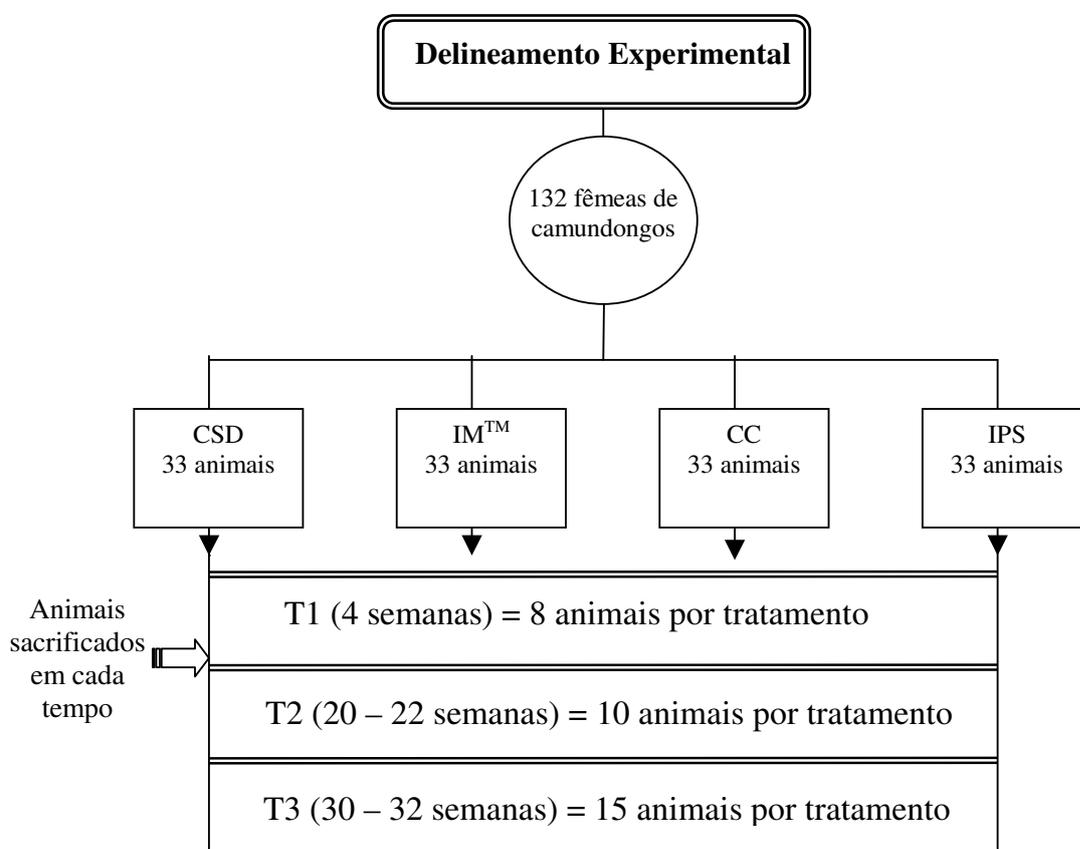


Figura 1 – Protocolo experimental para ensaio de indução de câncer em fêmeas de camundongos da linhagem A/J. Tratamentos: CSD (concentrado protéico de soro doce); IM (Immunocal™); CC (caseína comercial); IPS (isolado protéico de soja comercial).

Os animais foram separados em 4 grupos com 33 animais cada, com médias de peso inicial semelhantes, e mantidos durante todo o experimento em caixas plásticas próprias contendo, cada uma, 5 ou 6 camundongos (3 caixas com 5 e 3 com 6 animais). As caixas foram mantidas em isoladores, instalados no biotério do ITAL, Campinas, SP. O uso de isoladores possibilitou o controle higiênico-sanitário dos animais. As caixas, os bebedouros, os comedouros, a água e a maravalha utilizada para fazer as “camas” dos animais foram autoclavados, para reduzir os riscos de qualquer contaminação que pudesse interferir nos resultados. Os animais foram numerados, com marcações individuais e por tipo de tratamento. Com isso, se algum animal saísse de sua caixa, ele poderia ser facilmente identificado.

### **Dietas experimentais**

A composição das misturas mineral e vitamínica e das dietas experimentais encontram-se descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente. As dietas foram preparadas de acordo com a AIN-76A (1977) modificada para proteína (20%). A composição em lipídios totalizou 15% (44,2% de banha de porco, 46,2% de óleo de milho e 9,6% de gordura de coco hidrogenada), formulada segundo Alabaster e outros (1995). Como fonte de proteína para as dietas, foram utilizados os seguintes materiais: concentrado protéico de soro doce – CSD; Immunocal<sup>TM</sup> - IM; caseína comercial – CC e isolado protéico de soja – IPS. As dietas foram irradiadas na EMBRARAD, em São Paulo, com dosagem de 3kGy, eficiente para eliminação de microrganismos, sem afetar a composição e as propriedades funcionais fisiológicas das proteínas, conforme apresentado no capítulo 2. O porcionamento das dietas foi feito em capela de fluxo laminar e os comedouros foram trocados diariamente. Cada dieta correspondeu a um tratamento de acordo com cada uma das fontes protéicas acima citadas. A determinação de proteínas das dietas foi feita pelo método micro Kjeldahl (AOAC, 1990).

Tabela 1 – Composição das misturas mineral e vitamínica, recomendadas para roedores segundo a AIN-76A, utilizadas nas proporções de 35 e 10g por kg de dieta, respectivamente.

Ingredientes	g/kg de mistura
<b>Minerais</b>	
Fosfato de cálcio bibásico	500,00
Cloreto de sódio	74,00
Citrato de potássio monohidrato	220,00
Sulfato de potássio	52,00
Óxido de magnésio	24,00
Carbonato manganoso	3,50
Citrato férrico	6,00
Carbonato de zinco	1,60
Carbonato cúprico	0,30
Iodato de potássio	0,01
Selenito de sódio	0,01
Sulfato de cromo e potássio 12 H <sub>2</sub> O	0,55
Sacarose (pó fino)	118,03
<b>Vitaminas</b>	
Tiamina-HCl	0,60
Riboflavina	0,60
Piridoxina-HCl	0,70
Ácido nicotínico	3,00
Pantotenato de cálcio	1,60
Ácido fólico	0,20
D-Biotina	0,02
Vitamina B <sub>12</sub>	1,00
Palmitato - Vitamina A(500.000 UI/g)	0,80
Vitamina D <sub>3</sub> (400.000 UI/g)	0,25
Acetato – Vitamina E (500 UI/g)	10,00
Menadiona	0,08
Sacarose (pó fino)	981,15

Fonte: AIN-76A (1977).

Tabela 2 – Composição de dietas semi-purificadas e a referência AIN-76A (1977), utilizadas no ensaio de indução de câncer de cólon intestinal, em fêmeas de camundongos da linhagem A/J. Tratamentos: CSD (concentrado protéico de soro doce); IM (Immunocal™); CC (caseína comercial); IPS (isolado protéico de soja).

Ingredientes	Quantidade (g/kg de dieta)				
	AIN-76A	CSD	IM	CC	IPS
Fonte protéica	200,00	235,50	226,93	241,54	217,39
Amido	150,00	199,16	192,17	172,88	192,93
Sacarose	500,00	334,00	334,23	350,00	350,00
Celulose	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Gordura de porco	-	61,24	66,30	63,27	65,58
Óleo de milho	50,00	64,00	69,30	66,15	68,56
Gordura de coco	-	13,32	14,40	14,64	14,23
Minerais	35,00	27,78	31,67	26,52	26,31
Vitaminas	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
L-Metionina	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Bitartarato de colina	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

Os animais foram iniciados nas dietas, 4 semanas antes de serem injetados com o carcinógeno, permanecendo em dieta durante 32 semanas. Os comedouros contendo as dietas foram trocados e lavados diariamente.

O ganho de peso dos animais foi verificado semanalmente, não sendo possível utilizar outros índices nutricionais porque os animais foram mantidos

agrupados em caixas plásticas, sendo impossível verificar o consumo individual de dieta.

### **Indução de câncer**

Para a indução de tumores utilizou-se o azoximetano – AOM (Sigma/Aldrich Co.), agente específico para câncer de cólon. A droga foi diluída em solução salina estéril (0,9% de NaCl), em concentração final de 1,1µg/µL, preparada imediatamente antes do uso. Os animais foram injetados por via subcutânea, semanalmente na proporção de 5mg/Kg de peso corporal, durante 6 semanas consecutivas, correspondendo um total injetado de 30 mg/kg de peso corporal.

### **Monitoramento**

O desenvolvimento do câncer foi monitorado por verificação da existência de alterações celulares, lesões morfológicas distintas, conhecidas como criptas aberrantes (CA) que podem ser detectadas em segmentos do cólon fixadas com azul de metileno. As CA foram observadas em cólons de roedores tratados com a droga carcinogênica, não aparecendo nos animais do grupo controle, não injetados. Isso sugere tratar-se de lesões pré-neoplásicas, reconhecidas em vários trabalhos como biomarcadores de câncer de cólon (BIRD, 1987; McLELLAN; BIRD, 1988; PRETLOW et al., 1991; PRETLOW et al., 1992; SHIVAPURKAR; TANG; ALABASTER, 1992). Algumas técnicas e critérios utilizados no ensaio são relacionados a seguir:

- **Focos de criptas aberrantes (FCA)** – A quantidade de focos e o número de criptas aberrantes por foco foram determinados em 8cm na porção distal do cólon, de acordo com metodologia descrita por Bird (1987).
- **Presença de tumores** – Os animais foram sacrificados 22 semanas após a última injeção com AOM. Os cólons foram removidos e abertos

longitudinalmente. O conteúdo fecal foi removido, o número de tumores foi contado e o material foi preparado para exame histológico.

- **Imunização** – Cada animal recebeu uma injeção subcutânea de  $5 \times 10^6$  hemácias de carneiro lavadas em tampão borato 0,05M (adicionado de sais de cálcio e magnésio). As hemácias foram obtidas em solução de Alséver do Biotério Boa Vista, Campinas, SP.
- **Ensaio imunológico para verificação de células formadoras de placas** – A contagem de CFP foi efetuada de acordo com o método modificado de Cunningham e Szenberg (1968), em suspensão de células de baço, 5 dias após a imunização, quando acontece o pico de resposta (BOUNNOUS; GOLD, 1991).
- **Dosagem de glutatona** – Efetuada nos fígados dos animais segundo metodologia de Saville (1958).
- **Exame anátomo-patológico** – Os tumores e seções de cólon fixados em formalina foram encaminhados ao Centro Integrado de Anatomia Patológica e Citopatologia S/C Ltda, São José do Rio Preto, SP, para análise histopatológica.

As figuras 2 e 3 apresentam, respectivamente, o delineamento experimental do ensaio biológico e os procedimentos das análises efetuadas.

#### 4.2.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa “Statistica 6.0” (Stat Soft Inc, Tulsa, USA). Os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (GOMES, 1982).

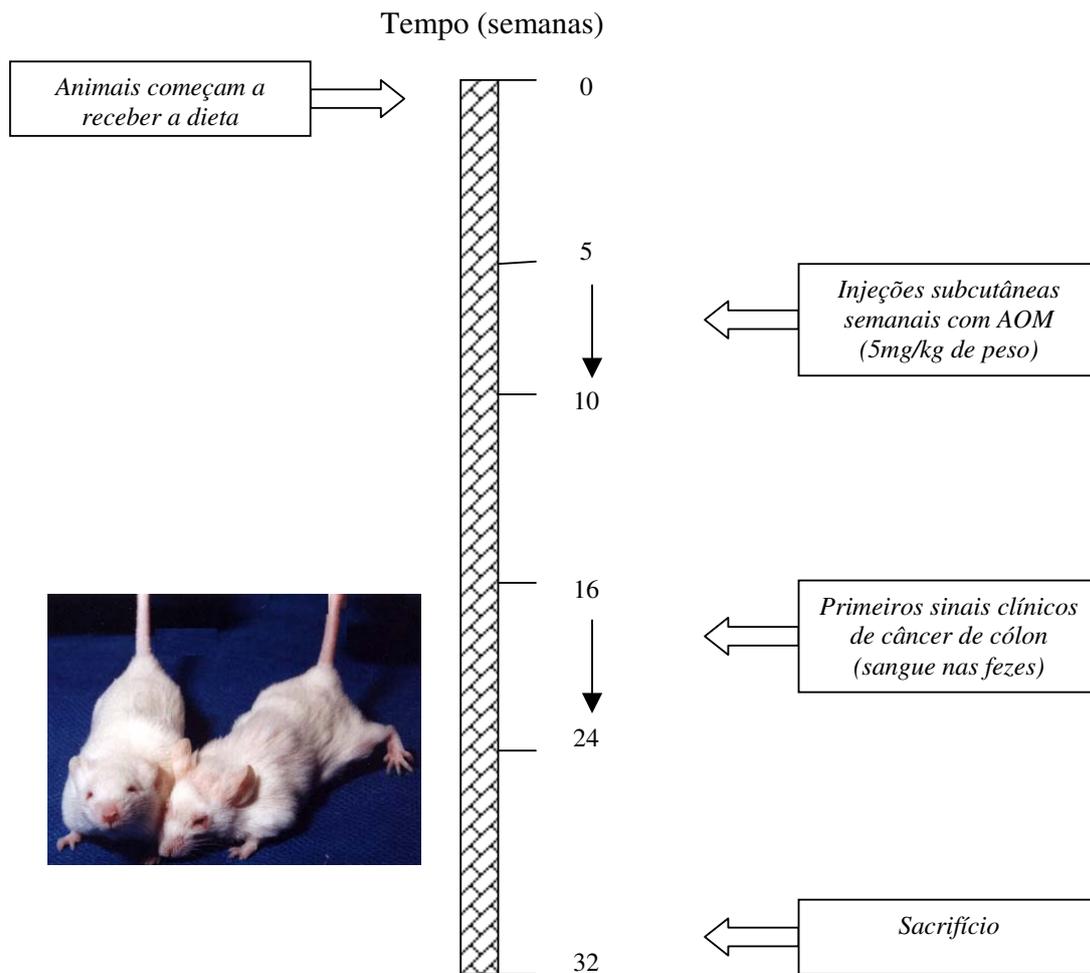


Figura 2 - Representação esquemática da cronologia adotada para o ensaio biológico na indução de câncer de cólon intestinal.

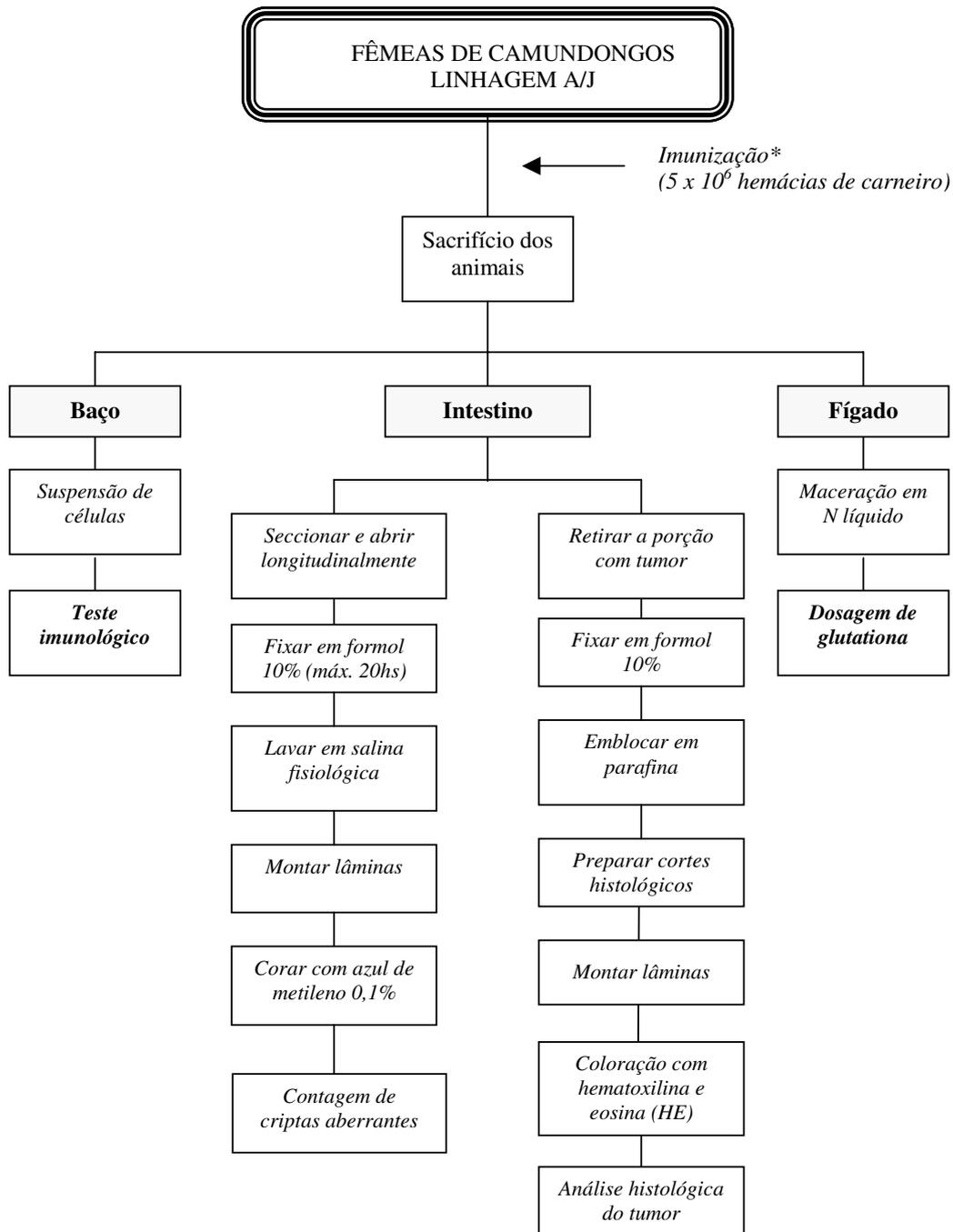


Figura 3 - Representação esquemática das análises efetuadas no ensaio biológico de indução de câncer de cólon. \*Tempos nos quais foram efetuadas as imunizações: 4, 20-22 e 30-32 semanas em ensaio.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 Caracterização do material utilizado em ensaio biológico

Todos os materiais utilizados como fonte de proteínas apresentavam concentração em proteínas acima de 80%, conforme dados apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Composição centesimal aproximada (g/100g) em base seca (média ± desvio padrão) de fontes protéicas utilizadas no preparo de dietas em ensaios com camundongos para indução de câncer.

Componente	Fontes protéicas (%)			
	CSD <sup>1</sup>	IM <sup>2</sup>	IPS <sup>3</sup>	CC <sup>4</sup>
Proteína (N x fator)	83,80 ± 2,60 <sup>b</sup>	91,4 ± 3,14 <sup>a</sup>	92,00 ± 2,80 <sup>a</sup>	82,80 ± 2,70 <sup>b</sup>
Lipídios totais	4,50 ± 0,75 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,50 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,90 ± 0,25 <sup>b</sup>
Cinzas	2,80 ± 0,50 <sup>a</sup>	1,48 ± 0,27 <sup>b</sup>	4,00 ± 0,71 <sup>a</sup>	3,51 ± 0,69 <sup>a</sup>
Carboidratos*	8,90 ± 1,60 <sup>a</sup>	5,95 ± 1,03 <sup>b</sup>	3,50 ± 0,58 <sup>c</sup>	10,71 ± 1,96 <sup>a</sup>

Determinações feitas em triplicata. <sup>1</sup>Concentrado protéico de soro; <sup>2</sup>Immunocal<sup>TM</sup>; <sup>3</sup>Isolado protéico de soja e <sup>4</sup>Caseína comercial. CSD, IM e CC (F = 6,38). IPS (F = 6,25). \*Determinado como lactose, exceto para o IPS (diferença para 100%). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto à lactose, para os produtos derivados de leite bovino, o mais alto teor (10,8%) foi obtido para a caseína comercial - CC, seguida do concentrado protéico de soro - CSD (8,9%) e do immunocal<sup>TM</sup> - IM (5,95%). Os mais baixos teores de cinzas foram encontrados para o CSD (2,8%) e o IM, concentrado e isolado protéico de soro de leite. Quanto aos lipídios totais, verificaram-se as mais

baixas concentrações para o IM (0,12%) e isolado protéico de soja – IPS (0,5%). Os valores mais altos foram obtidos para o CSD (4,5%).

Os lipídios totais aparecem mais elevados no CSD, que nos demais materiais e esse fato está diretamente ligado à eficiência do desnatamento da matéria prima.

Com exceção das concentrações de lactose, ainda um pouco elevadas no CSD, a composição apresentada na tabela 3 assemelha-se bastante à da literatura, para os mesmos tipos de produtos (JOST, 1993). É possível reduzir ainda mais os teores de lactose encontrados no CSD, aumentando-se o número de ciclos de diafiltração. À medida que se aumenta o número de ciclos de diafiltração, as concentrações de lactose e cinzas diminuem enquanto aumenta a proteína. Nos Estados Unidos da América, a indústria produz derivados protéicos de soro abrangendo uma faixa de concentração de proteína de 35 a 90% (USDEC, 1997).

Os perfis de aminoácidos para os quatro concentrados protéicos utilizados e o padrão teórico da FAO/WHO (1990), são mostrados na tabela 4.

As proteínas do soro de leite diferem das caseínas por apresentarem teores mais elevados dos aminoácidos treonina, e sulfurados (metionina + cistina), leucina, isoleucina, lisina e triptofano e teores mais baixos dos aminoácidos de cadeias aromáticas fenilalanina e tirosina.

Em relação ao padrão da FAO/WHO (1990), as caseínas podem apresentar deficiências em aminoácidos sulfurados (metionina + cistina) e/ou triptofano. Essa situação é refletida nos escores de aminoácidos essenciais, também apresentados na tabela 2, e que se apresentam iguais ou superiores a 1,0 para os concentrados de proteínas de soro e inferiores a 1,0 para as caseínas.

Tabela 4 – Perfil de aminoácidos e escore de aminoácidos essenciais (EAE), com base no perfil teórico da FAO/WHO (crianças de 2 a 5 anos de idade), de fontes protéicas utilizadas no preparo de dietas para ensaio de indução de câncer, em camundongos.

Aminoácidos g/100g de proteína	Fontes protéicas (g/100g de amostra)				
	CSD <sup>1</sup>	IM <sup>2</sup>	IPS <sup>3</sup>	CC <sup>4</sup>	FAO/WHO
Ácido aspártico	9,55	12,70	10,70	7,17	-
Serina	5,14	5,30	5,00	5,93	-
Ácido glutâmico	16,56	19,73	18,00	21,87	-
Prolina	5,55	6,30	4,70	9,97	-
Glicina	1,66	2,00	3,70	1,80	-
Alanina	4,42	5,60	3,70	3,03	-
Treonina	6,40	8,30	3,20	4,15	3,40
Valina	5,04	6,40	4,00	6,16	3,50
Metionina + cistina	5,44	5,34	2,40	2,17*	2,50
Isoleucina	5,29	6,80	3,80	4,62	2,80
Leucina	9,81	10,90	6,90	8,87	6,60
Fenilalanina + tirosina	7,24	6,33	8,40	6,30	6,30
Lisina	9,27	9,50	5,70	7,67	5,80
Histidina	5,15	5,98	2,40	2,84	1,90
Triptofano	1,12	2,00	0,90*	1,40	1,10
Arginina	1,45	1,70	7,10	1,96	-
EAE**	≥1,02	≥1,00	0,82 (Trp)	0,87 (Cys) <sub>2</sub> + Met	-

Valores obtidos de determinação única. Limitante em relação ao padrão FAO/WHO (1990); <sup>1</sup>concentrado protéico de soro; <sup>2</sup>immunocal<sup>TM</sup>; <sup>3</sup>isolado protéico de soja e <sup>4</sup>caseína comercial. \*Aminoácido mais limitante. \*\*Escore químico de aminoácidos essenciais. Calculado com base no aminoácido mais limitante.

#### 4.3.2 Crescimento dos animais

Vários estudos mostraram que camundongos alimentados com dietas contendo 20 g de proteína por 100g de dieta, provenientes de diferentes fontes protéicas (caseína, soja, trigo, milho, ovo, peixe, carne, alga e ração comercial) apresentaram ganhos de peso similares (BOUNOUS; KONGSHAVN, 1982; BOUNOUS; LETORNEAU; KONGSHAVN, 1983; BOUNOUS; KONGSHAVN; GOLD, 1988). No presente trabalho não foram verificadas diferenças de ganho de peso dos animais entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), de acordo com os dados apresentados na tabela 5, o que confirma o valor nutricional muito semelhante das dietas.

Tabela 5 - Evolução de peso (média  $\pm$  desvio padrão) apresentada por fêmeas de camundongos da linhagem A/J submetidos à dieta com 20% de proteína durante 32 semanas e injetados com azoximetano (5mg/kg de peso corpóreo semanalmente, por 6 semanas).

Tratamentos	Peso (g)		
	Inicial	Máximo atingido	Final
Immunocal™	16,85 $\pm$ 1,82	33,52 $\pm$ 3,14	30,23 $\pm$ 2,78
Concentrado Protéico de Soro Doce	16,69 $\pm$ 1,80	33,10 $\pm$ 4,12	29,87 $\pm$ 2,47
Caseína Comercial	17,21 $\pm$ 2,26	34,32 $\pm$ 4,76	31,27 $\pm$ 1,55
Isolado Protéico de Soja	16,97 $\pm$ 2,08	32,65 $\pm$ 3,07	30,95 $\pm$ 3,14

Não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). N = 132 animais (33 por tratamento).

### 4.3.3 Criptas aberrantes

Os modelos animais permitem estudar os processos envolvidos em doenças e testar hipóteses sobre a influência de fatores ambientais na etiologia e prevenção de câncer de cólon. O conceito de prevenção de câncer engloba regredir, inibir ou eliminar lesões pré-cancerosas, resultando na redução da incidência de câncer. Assim, é importante identificar e enumerar lesões pré-neoplásicas em diferentes etapas de desenvolvimento. O estudo dessas lesões no cólon é possível por meio da identificação dos focos de criptas aberrantes (FCA) em cólons de roedores tratados com algum agente carcinogênico (BIRD; GOOD, 2000).

O crescimento, a morfologia e as características dos FCA há algum tempo reforçam a idéia de que essas alterações sejam lesões pré-neoplásicas. O sistema FCA é muito utilizado para identificar moduladores da carcinogênese de cólon. Entre os vários indicadores utilizados em pesquisas de câncer, esses são os únicos que fornecem dados quantitativos para avaliar a progressão da doença e os eventos básicos celulares e moleculares afetados diretamente por diversos agentes preventivos ou promotores do câncer (BIRD; GOOD, 2000).

As criptas aberrantes (CA) estão ilustradas na figura 4. A quantidades de focos de criptas aberrantes encontrados nos cólons dos animais injetados com a droga estão apresentados na tabela 6.

A carcinogênese consiste em processo com passos múltiplos, envolvendo a seleção e expansão clonal de células pré-neoplásicas. A expansão clonal de uma população de células é conhecida como lesão pré-neoplásica. Existem muitas informações a respeito das características das células cancerosas e pouco se sabe da biologia dos estágios pré-neoplásicos. Essa deficiência leva a identificação e quantificação de FCA. As primeiras observações sobre os FCA foram feitas por Bird (1987) e hoje já se sabe muito a respeito dessas lesões e de seu valor na modulação de câncer de cólon (BIRD; McLELLAN; BRUCE, 1989; BIRD, 1995).

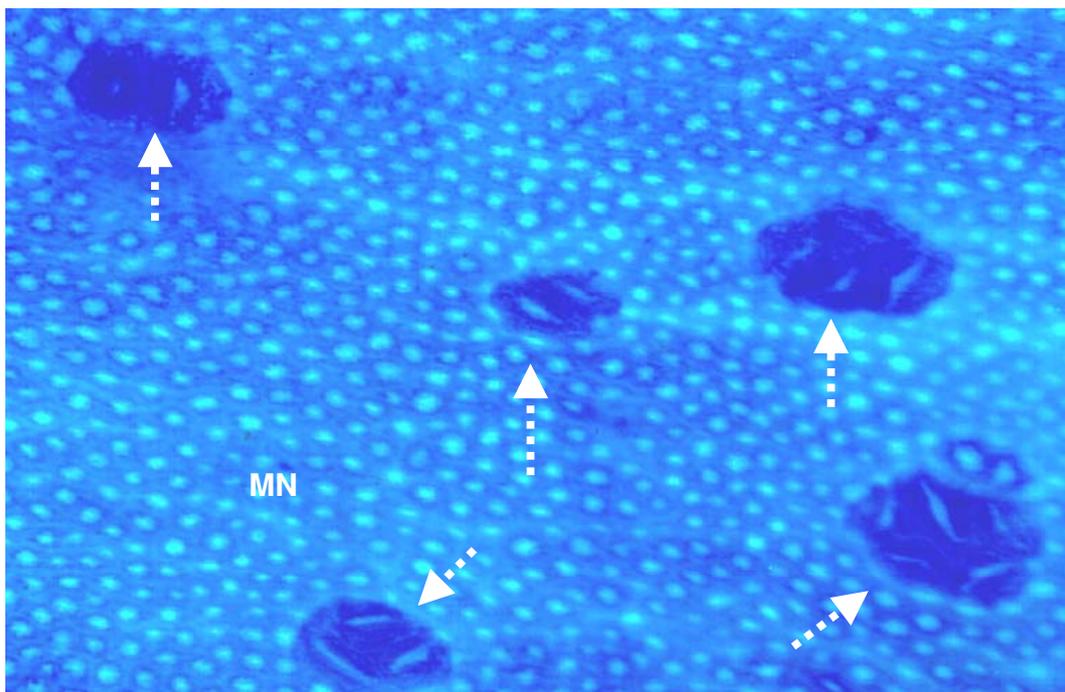


Figura 4 – Segmento de cólon de camundongo da linhagem A/J corado com azul de metileno. Setas apontam focos de criptas aberrantes (FCA) contrastando com mucosa normal (MN).

As criptas aberrantes aparecem duas semanas após a indução com o carcinógeno. Inicialmente, elas aparecem como criptas únicas, podendo ser visualizadas por exame microscópico da mucosa. Um método detalhado para visualizar os FCA foi descrito por Bird (1998). As criptas aberrantes são reconhecidas por sua abertura luminal irregular dilatada e revestimento epitelial denso. Com o passar do tempo, muitos focos de criptas aberrantes contém mais de uma cripta, e, mais tarde, o cólon pode conter um maior número de FCA, exibindo multiplicidade de criptas. Uma única cripta aberrante se expande por divisão ou multiplicação. A maioria das lesões exibe vários graus de displasia. O número de FCA no cólon varia com o tempo e flutuações nesses números indicam que eles estão em estado dinâmico, podendo refazer-se ou regredir (BIRD; GOOD, 2000).

Os focos de criptas aberrantes se desenvolvem com maior frequência na porção distal do cólon. Os focos mostrados na figura 4 contêm quantidades diferentes de criptas aberrantes, coradas com maior intensidade do que a mucosa normal.

Tabela 6 - Incidência de focos de criptas aberrantes – FCA (média  $\pm$  desvio padrão) na mucosa intestinal de fêmeas de camundongos da linhagem A/J, injetadas durante 6 semanas consecutivas com 5mg/Kg de peso corpóreo de azoximetano, e alimentados com dietas contendo 20% de proteína de diferentes fontes.

Tratamentos	Nº FCA
Concentrado protéico de soro doce	3,60 $\pm$ 0,53 <sup>c</sup>
Immunocal <sup>TM</sup>	3,36 $\pm$ 0,39 <sup>c</sup>
Caseína comercial	5,33 $\pm$ 0,83 <sup>b</sup>
Isolado protéico de soja	7,70 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup>

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Embora o sistema FCA seja bastante utilizado como biomarcador em estudos de câncer de cólon intestinal, existem propostas para uso de vários outros marcadores, não existindo ainda nenhum considerado ideal. A busca por biomarcadores é importante na medida em que se pretenda avaliar o risco de um indivíduo ou população vir a desenvolver o câncer de cólon ou também na indicação de moduladores da doença. O valor do sistema FCA se limita a investigações utilizando animais como modelo experimental. Mesmo que os FCA estejam presentes em cólons humanos, sua quantificação não é fácil. Para os estudos com animais, esse é o melhor biomarcador, sendo específico para esse

tipo de câncer. Outro fator importante observado é que o número de FCA e sua diversidade aumentam com o desenvolvimento da doença, sendo o único marcador que permite monitorar, passo a passo, esse desenvolvimento (BIRD, 2000).

Nessa pesquisa, a maior quantidade de FCA foi encontrada na mucosa do cólon de animais submetidos à dieta de IPS, seguida dos animais em CC. Os menores valores foram encontrados para o CSD e IM, estatisticamente iguais, diferindo do IPS e também da CC ( $p < 0,05$ ). Isso sugere um possível efeito protetor apresentado pelas proteínas de soro de leite.

#### 4.3.4 Testes imunológicos

A atividade fisiológica dos concentrados protéicos de soro de leite é demonstrada através do estímulo à síntese de glutathione e da reação antígeno-anticorpo (IgM), no fígado e baço, respectivamente, dos camundongos.

Após 4 semanas, os camundongos alimentados com proteínas de soro de leite apresentaram maior resposta imune humoral, em número de células formadoras de placas por baço (média  $\pm$  desvio da média),  $90075 \pm 13148$  e  $84225 \pm 11360$  para IM e CSD, respectivamente. Eles diferiram estatisticamente dos tratamentos IPS e CC, dietas contendo proteína de soja e caseína comercial, conforme apresentado na tabela 7. Isso confirma dados obtidos em outros trabalhos e com diferentes linhagens de camundongos, com idade variando de 7 semanas a 6 meses (BOUNOUS; KONGSHAVN, 1982; BOUNOUS; LETORNEAU; KONGSHAVN, 1983; BOUNOUS et al., 1985; BOUNOUS; KONGSHAVN; GOLD, 1988). A figura 5 mostra camundongo com sinais clínicos do desenvolvimento da doença contrastando com outro, sadio.

Com o passar do tempo à doença se desenvolveu e a resposta imune medida em número de células por baço decaiu substancialmente, o que evidencia o efeito imunodepressor provocado pela droga AOM. Com 16 a 24 semanas os

animais já apresentavam sinais clínicos associados à presença de tumores, como falhas na pelagem, sangue nas fezes, olhos opacos e desbotados, conforme foi apresentado na figura 6.

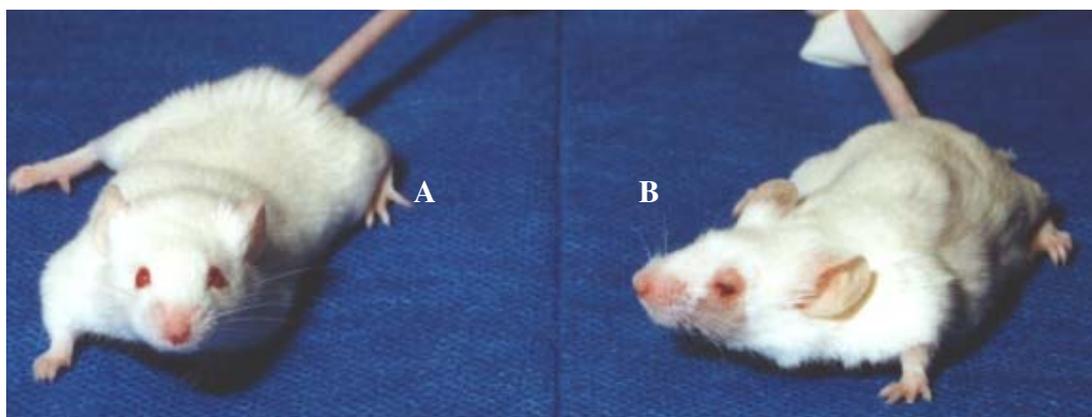


Figura 5 – Camundongos A/J utilizados em ensaio: A - animal sadio; B - animal apresentando sinais característicos do desenvolvimento da doença (perda de peso, falhas na pelagem e olhos opacos).

Tabela 7 - Resultados de testes de células formadoras de placas – CFP (média  $\pm$  desvio padrão) efetuados com fêmeas de camundongos da linhagem A/J, injetados com 5mg/Kg de peso corpóreo (6 semanas consecutivas) e submetidos a dietas com diferentes fontes de proteínas.

Tratamentos	CFP (n° células/baço)		
	1 (4 semanas)	2 (20-22 sem.)	3 (30-32 sem.)
Immunocal	90075 $\pm$ 13148 <sup>a</sup>	26618 $\pm$ 3788 <sup>a</sup>	3233 $\pm$ 523 <sup>a</sup>
Concentrado protéico de soro doce	84225 $\pm$ 11360 <sup>a</sup>	26181 $\pm$ 2265 <sup>a</sup>	3063 $\pm$ 832 <sup>a</sup>
Caseína comercial	35160 $\pm$ 5195 <sup>b</sup>	9300 $\pm$ 1397 <sup>b</sup>	712 $\pm$ 87 <sup>b</sup>
Isolado protéico de soja	28707 $\pm$ 4475 <sup>b</sup>	3923 $\pm$ 718 <sup>c</sup>	288 $\pm$ 47 <sup>b</sup>

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

As medidas de CFP efetuadas em torno da vigésima semana denotaram valores 3 vezes menores do que os resultados iniciais, efetuados com 4 semanas, decaindo ao final do ensaio, para valores quase 9 vezes menores. Mesmo assim, os animais alimentados com proteínas de soro de leite apresentavam os melhores resultados.

#### 4.4.5 Dosagem de glutathiona (GSH)

Na figura 7 são apresentadas correlações efetuadas entre glutathiona e CFP e na tabela 8 os resultados das dosagens de glutathiona efetuadas nos fígados dos animais. Foi possível demonstrar uma forte correlação positiva entre as concentrações de glutathiona no fígado e o número de células produtoras de anticorpos (contagem de CFP), no baço dos camundongos ( $r = 0,998$  e  $r = 0,995$ ), com 4 semanas e 30-32 semanas, respectivamente.

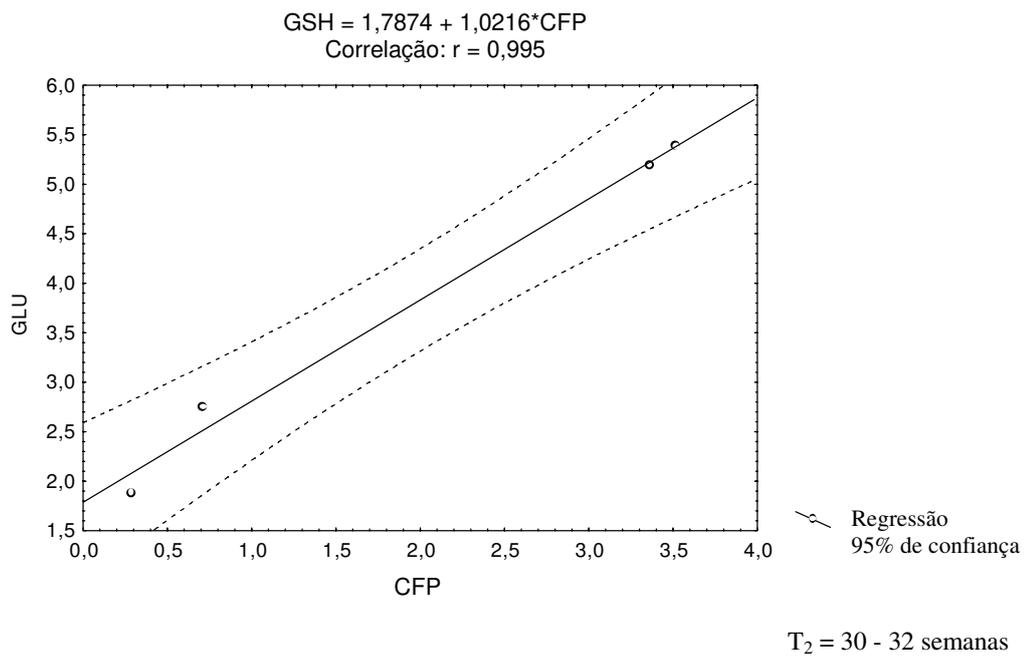
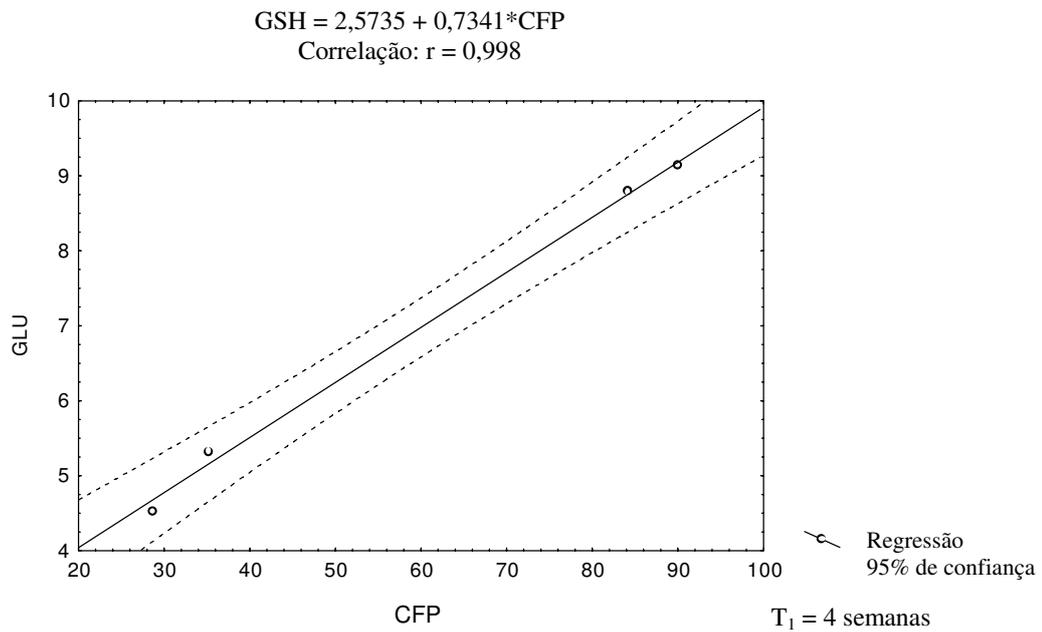


Figura 6 – Correlações lineares entre os resultados de CFP (células formadoras de placas) e glutathiona obtidos com fêmeas de camundongos da linhagem A/J, em dois tempos distintos ( $T_1 = 4$  semanas e  $T_2 = 30-32$  semanas após injeção de carcinógeno).

Tabela 8 – Concentrações de glutathiona (média ± desvio padrão) medidas em fígados de camundongos da linhagem A/J, estando por 4 semanas em dietas e após serem injetados com 5mg/kg de peso corpóreo (6 semanas consecutivas) de AOM e submetidos a dietas com diferentes fontes de proteínas.

Tratamentos	Mmol/g de tecido	
	4 semanas	30-32 semanas
Immunocal™	9,14 ± 1,26 <sup>Aa</sup>	5,19 ± 0,91 <sup>Ba</sup>
Concentrado protéico de soro doce	8,79 ± 1,38 <sup>Aa</sup>	5,39 ± 0,37 <sup>Ba</sup>
Caseína comercial	5,32 ± 0,43 <sup>Ab</sup>	2,74 ± 0,46 <sup>Bb</sup>
Isolado protéico de soja	4,53 ± 0,81 <sup>Ab</sup>	1,88 ± 0,44 <sup>Bc</sup>

Médias seguidas por letras sobrescritas diferentes maiúsculas (linha) e minúsculas (coluna) significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

As concentrações intracelulares de glutathiona medidas no fígado, foram maiores para camundongos alimentados com proteínas de soro de leite (IM e CSD) e com caseína, sendo verificados valores menores nos camundongos alimentados com soja. Resultados semelhantes foram obtidos por McIntosh e outros (1995). Nesse trabalho, os autores não encontraram diferenças significativas em tecidos de baço, no cólon e nos tumores, embora os animais alimentados com soro tenham mostrado as maiores concentrações de glutathiona. Sabe-se que o soro é fonte rica em precursores (proteínas ricas em cisteína) para a síntese de glutathiona.

#### 4.3.6 Quantificação dos tumores

A incidência de tumores no cólon, para os diferentes tratamentos dietéticos, é mostrada na tabela 9. Observou-se maior quantidade de tumores em

camundongos alimentados com IPS ( $18,20 \pm 5,46$ ), seguido daqueles em dieta contendo CC ( $14,33 \pm 3,43$ ). Os animais alimentados com proteínas de soro (CSD e IM), apresentaram quantidades menores de tumores,  $9,33 \pm 2,96$  e  $8,56 \pm 3,09$ , respectivamente, diferindo estatisticamente do IPS e CC ( $p < 0,05$ ).

Tabela 9 - Incidência de tumores de cólon (média  $\pm$  desvio padrão) em camundongos da linhagem A/J ( $n = 60$ ) injetadas durante 6 semanas consecutivas com 5mg/kg de peso corpóreo de azoximetano, e mantidas em dietas contendo 20% de proteína de diferentes fontes.

Tratamentos	Incidência de tumores
Concentrado protéico de soro doce	$9,33 \pm 2,96^b$
Immunocal <sup>TM</sup>	$8,56 \pm 3,09^b$
Caseína comercial	$14,33 \pm 3,43^a$
Isolado protéico de soja	$18,20 \pm 5,46^a$

Médias seguidas por letras sobrescritas diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

É possível estabelecer um paralelo entre a quantidade de FCA e o desenvolvimento de tumores de cólon observados nesse estudo, significativamente menores em animais alimentados com dietas preparadas com proteínas de soro de leite (CPS e IM), comparados com caseína comercial e isolado protéico de soja ( $p < 0,05$ ). Verificou-se uma correlação positiva entre FCA e a quantidade de tumores, na figura 7. A figura 8 apresenta segmentos de cólon intestinal contendo tumores em seu interior. Nas figuras 9 e 10 são apresentados alguns cortes histológicos efetuados em segmentos de cólon e em tumores.

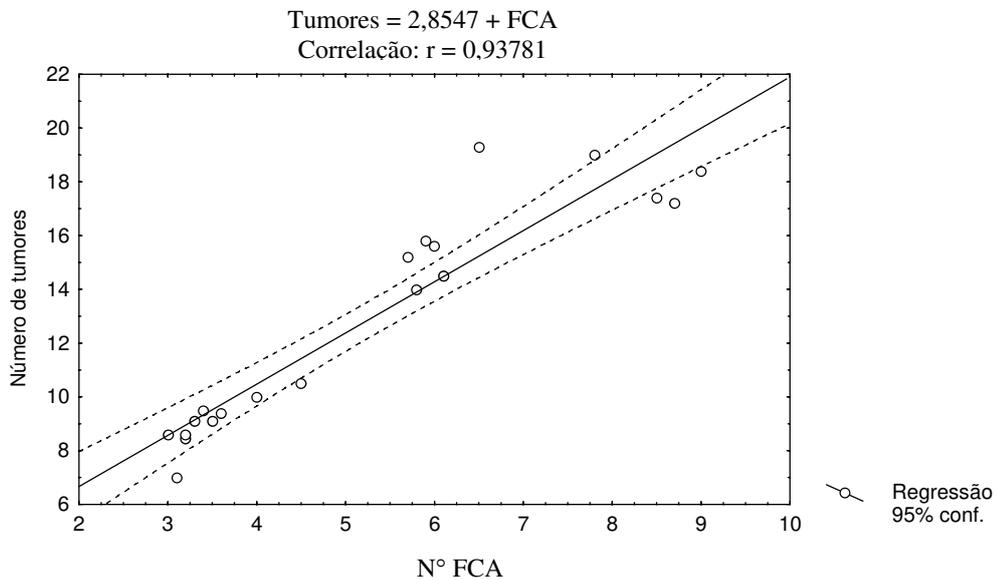


Figura 7 - Correlação linear entre a incidência de FCA (focos de criptas aberrantes) e a quantidade de tumores em segmentos de cólon intestinal de fêmeas de camundongos da linhagem A/J injetados com azoximetano.

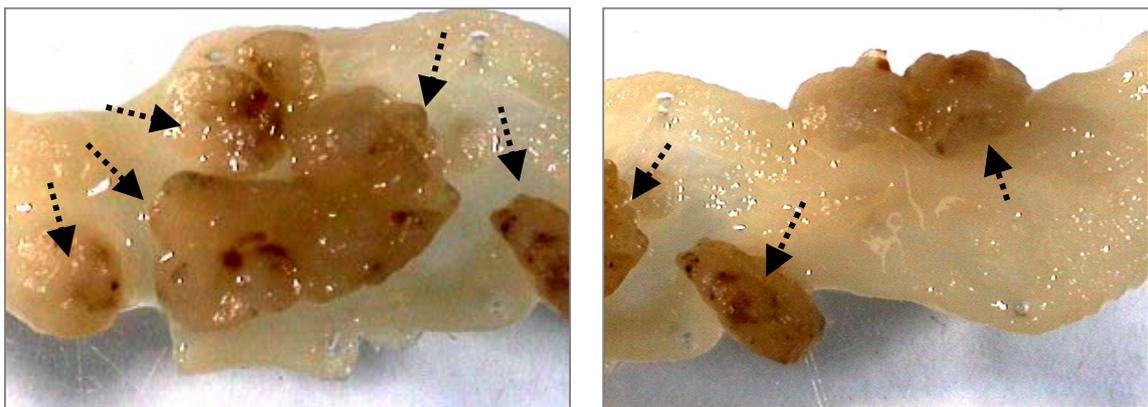


Figura 8 – Tumores encontrados em segmentos de cólon intestinal (abertos no sentido longitudinal) de camundongos injetados com azoximetano.

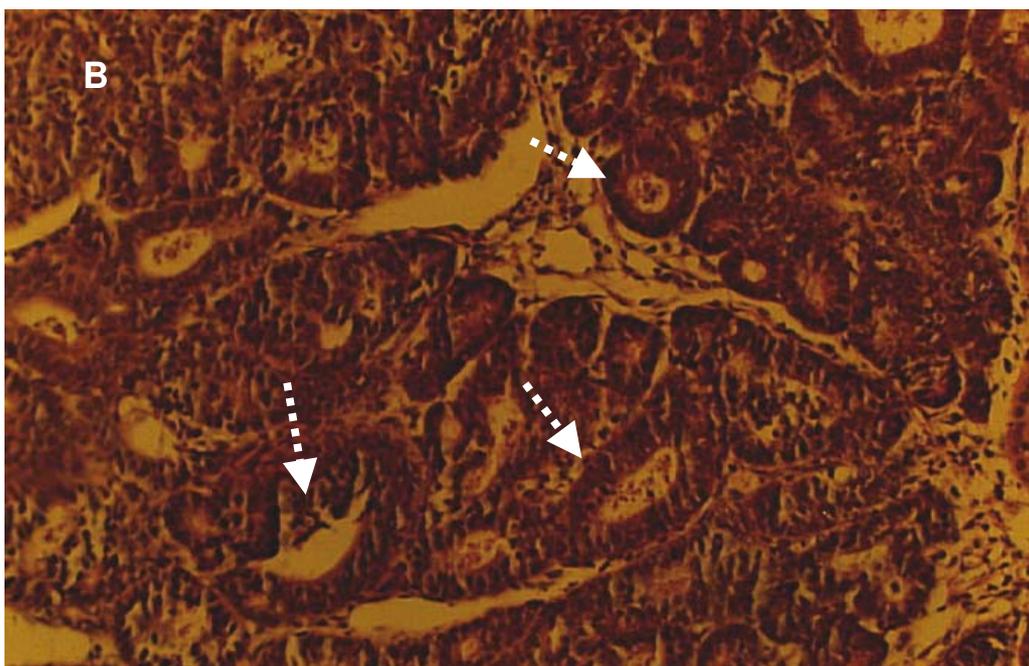
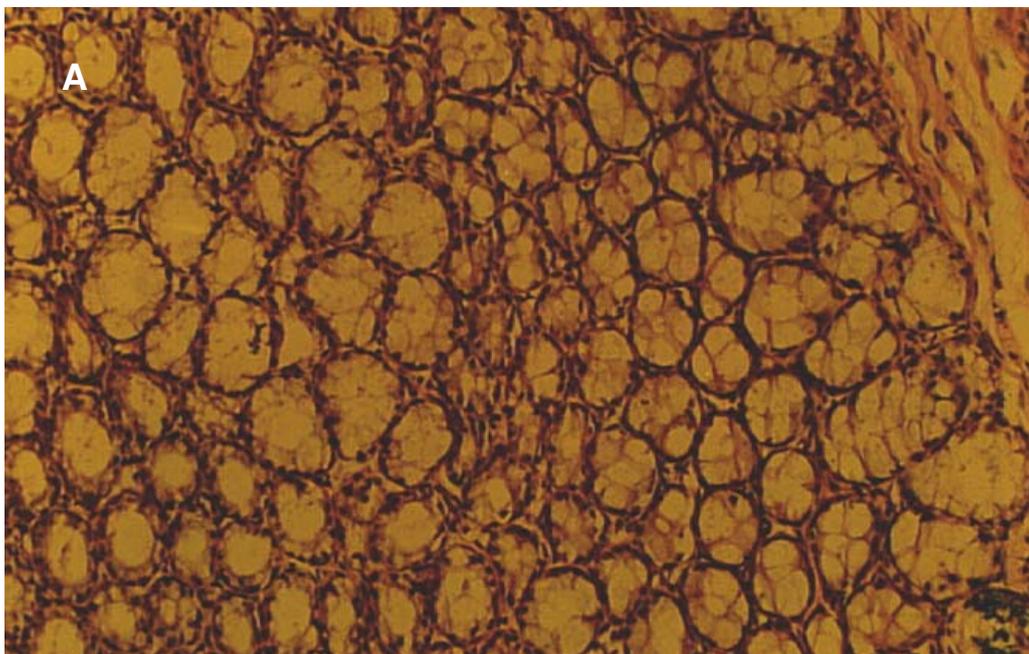


Figura 9 – Cortes histológicos efetuados em segmentos de cólon intestinal de camundongos injetados com azoximetano corados com hematoxilina e eosina, H&E (x 200). A: mucosa com aspecto normal. B: adenocarcinoma.

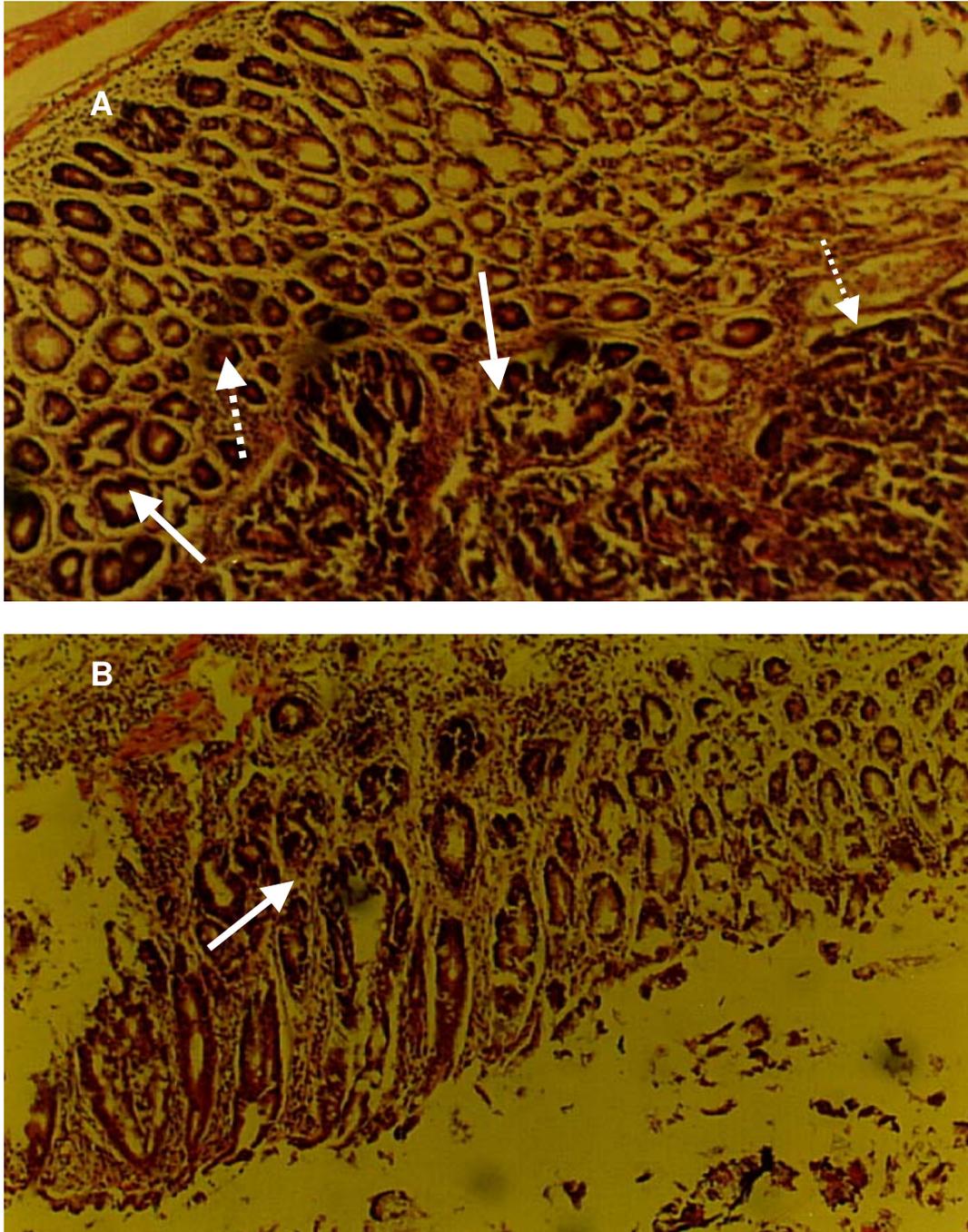


Figura 10 – Cortes histológicos efetuados em segmentos de cólon intestinal de camundongos injetados com azoximetano, corados com hematoxilina e eosina. A e B: regiões de adenocarcinoma

Os resultados obtidos nesse trabalho confirmam achados de McIntosh e outros (1995) que também observaram relação entre proteínas da dieta experimental e o desenvolvimento de câncer induzido por dimetilhidrazina.

Mesmo não havendo evidência epidemiológica de que a ingestão de soja possa reduzir o risco de câncer de cólon, sabe-se que alguns de seus componentes isolados exercem esses efeitos, sendo capazes de inibir o crescimento de células cancerosas (MESSINA; BENNING, 1998; BENNINK; OM, 1999). Embora na literatura existam dados que confirmem a ação protetora da soja contra o câncer, no nosso caso esse efeito não foi encontrado, provavelmente porque foi utilizado um isolado protéico. Trata-se de uma preparação purificada, com alto teor protéico, no qual essas propriedades não se manifestam, possivelmente por efeito do processamento utilizado para sua obtenção.

As observações anteriormente descritas ajudam a entender a inibição de tumores observada "in vitro". Além disso, Bourtourault e outros (1991) mostraram que a adição de soro de leite bovino em meios de cultura contendo células humanas de câncer de próstata e de mama resultou em redução significativa do crescimento celular. Os efeitos inibidores dessas proteínas manifestaram-se após 24 horas de incubação.

É relevante o fato de que as proteínas de soro encontradas nos concentrados protéicos, tais como a albumina sérica, a  $\alpha$ -lactalbumina e a lactoferrina, com maiores concentrações de cistina, exercem efeito individual na inibição evolução de células tumorais. Quando não estão desnaturadas, essas proteínas contêm quase as mesmas quantidades de resíduos de cistina, sendo capazes de exercer efeito fisiológico (GOODMAN; SHANBACHER, 1991). A albumina sérica bovina inibiu a produção de estrógenos em meio contendo células humanas de câncer de mama (LAURSEN; BRIAND; LYKKESFELDT, 1990). A incubação com  $\alpha$ -lactalbumina promoveu apoptose seletiva em células de câncer humano (HAKANSON et al., 1995). A lactoferrina exibiu efeito antitumoral em cultura com células pancreáticas humanas (SAKAMOTO, 1998). As três proteínas

citadas têm em comum, proporções relativamente altas de cisteína. Já que a cisteína apresenta efeitos antitumoral observados “in vitro”, é razoável assumir que as proteínas de soro, ricas em cisteína, também o exerçam (BOUNOUS, 2000).

É importante ressaltar que os diferentes efeitos na resposta imune promovidos por dietas com proteína de soro e caseína, utilizadas para camundongos que desenvolveram câncer, são comparáveis àqueles registrados com animais saudáveis, tratados com as mesmas dietas.

#### 4.4 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados confirmam a hipótese de que as proteínas da dieta diferem significativamente em sua capacidade de exercer efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de cólon em roedores, usando outros carcinógenos como a 1,2-dimetilhidrazina (DMH).

As proteínas de soro de leite foram mais eficientes em modular a síntese de glutatona e a resposta imune, exercendo certa proteção contra o desenvolvimento e o agravamento do câncer induzido pelo azoximetano, comparadas à caseína e ao isolado protéico de soja. O efeito foi notado durante todo o experimento. Esses resultados reforçam outros já obtidos em vários trabalhos que utilizaram modelo experimental para indução de câncer intestinal.

Confirmou-se ainda a validade do uso de focos de criptas aberrantes como indicadores do desenvolvimento de câncer de cólon intestinal. Esses marcadores haviam sido usados com sucesso por outros investigadores citados no presente trabalho.

Certamente são necessários mais estudos que permitam esclarecer os mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos anticâncer das proteínas do soro de leite.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, G. H. The determination of lactose in cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 9, p. 111-114, 1977.

ADLERCREUTZ, C. H.; GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L.; HOCKERSTEDT, K. A.; WATANABE, S.; HAMALAINEN, E. K.; MARKKANEN, M. H.; MAKELA, T. H.; WAHALA, K. T.; ADLERCREUTZ, T. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 3, p. 757S-770S, 1995.

AIN 76A - Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 107, p. 1340-1348, 1977.

ALABASTER, O.; TANG, Z. C.; FROST, A.; SHIVAPURKAR, N. Effect of  $\beta$ -carotene and wheat bran fiber on colonic aberrant crypt and tumor formation in rats exposed to azoxymethane and high dietary fat. **Carcinogenesis**, New York, v. 16, n. 1, p. 127-132, 1995.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – HORWITZ, W. (Ed.) **Official methods of analysis of the Association of Official Chemistry**, 15<sup>th</sup> Edition, Arlington, AOAC Inc., Washington, DC, 1990. 1141 p.

BARNES, S.; PETERSON, T. G.; COWARD, L. Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 22 (suppl.), p. 181S-185S, 1995.

BENNINK, M. R.; OM, A. S. Inhibition of colon cancer (CC) by soy phytochemicals but not by soy protein. **Federation of the American Societies of Experimental Biology Journal**, Bethesda, n. 12, p. A655, 1998.

\_\_\_\_\_; OM, A. S.; MIYAGI, Y. Inhibition of cancer colon (CC) by soy flour but not by genistein or a mixture of isoflavones. **Federation of the American Societies of Experimental Biology Journal**, Bethesda, n. 13, p. A50, 1999.

\_\_\_\_\_. Soybean in the prevention and treatment of cancer. **Anais do I Simpósio Brasileiro sobre os Benefícios da Soja para a Saúde Humana**, Londrina, 2001. p. 24-27.

BIRD, R. P. Observations and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 37, n. 2, p. 147-151, 1987.

\_\_\_\_\_; McLELLAN, E. A.; BRUCE, W. R. Aberrant crypts, putative precancerous lesions, in the study of the role of diet in the etiology of colon cancer. **Cancer Surveys**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 189-200, 1989.

\_\_\_\_\_. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 55-71, 1995.

\_\_\_\_\_. Aberrant crypt foci to study cancer preventive agents in the colon. In: HANAUCEK, M.; WALAASZEK, Z. (Ed.). **Tumor Marker Protocols**. New Jersey: Hum Press, 1998. p. 465-474.

\_\_\_\_\_.; GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicology Letters**, Singapore, v. 112-113, p. 395-402, 2000.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOUNOUS, G; KONGSHAVN, P. A. L. The effect of dietary amino acid on immune reactivity. **Immunology**, Buenos Aires, v. 35, n. 2, p. 257-266, 1978.

\_\_\_\_\_; STEVENSON, M. M. KONGSHAVN, P. A. L. Influence of dietary lactalbumin hydrolysate on the immune system of mice and resistance to salmonellosis. **Infectious Diseases**, New York, v. 144, n. 3, p. 281-282, 1981.

\_\_\_\_\_; KONGSHAVN, P. A. L. Influence of dietary proteins on the immune system in mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 112, n. 9, p. 1747-1755, 1982.

\_\_\_\_\_; LETORNEAU, L.; KONGSHAVN, P. A. L. Influence of dietary protein type on the immune system of mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 113, n. 7, p. 1415-1421, 1983.

\_\_\_\_\_; SHENOUDA, N.; KONGSHAVN, P. A. L.; OSMOND, D. G. Mechanism of altered B-cells response induced by changes in dietary protein type in mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 115, n. 11, p. 1409-1417, 1985.

\_\_\_\_\_; KONGSHAVN, P., GOLD, P. The immunoenhancing property of dietary whey protein concentrate. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 11, n. 4, p. 271-278, 1988.

\_\_\_\_\_; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.

\_\_\_\_\_. **The fascinating story behind a health-promoting product-patented milk serum (whey) protein concentrate**. Scottsdale: Immunotec Clinical Foundation, 1997, 15 p.

\_\_\_\_\_. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, Ulrich, v. 20, n. 6C, p. 4785-4792, 2000.

BOURTOURAUULT, M.; BULEON, R.; SAMPEREZ, S.; JOUAN, P. Effect des protéines du lactosérum bovin sur la multiplication de cellules cancéreuses humaines. **Comptes Rendus des Siances de la Societe de Biologie et de ses Filiales**, Paris, v. 185, n. 5, p. 319-323, 1991.

CHANDRA, R. K. Immunocompetence in undernutrition. **Journal of Pediatric**, Stuttgart, v. 81, n. 6, p. 1194- 1200, 1972.

CUNNINGHAM, A.; SZENBERG, A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. **Immunology**, Buenos Aires, v. 14, n. 4, p. 599-600, 1968.

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

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

GOODMAN, R. E.; SCHAMBACHER, F. L. Bovine lactoferrin in RNA: sequence, analysis, and expression in the mammary gland. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 180, p. 75-84, 1991.

HAKKAK, R.; KOROURIAN, S.; SHELNUTT, S. R.; LENSING, S.; RONIS, M. J.; BADGER, T. M. Diets containing whey proteins or soy protein isolate protect against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in female rats. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 113-117, 2000.

HAKANSSON, A.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; SABHARWAL, H.; SVANBORG, C. Apoptosis induced by a human milk protein. **Proceedings of the National Academy Science**. Washington, v. 92, n. 17, p. 8064-8068, 1995.

JOHN, A. M.; BELL, J. M. Amino acid requirements of the growing mouse. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 106, n. 9, p. 1361-1367, 1976.

JOST, R. Functional characteristics of dairy proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Kidlington, v. 4, n. 9, p. 283-288, 1993.

LAURSEN, I.; BRIAND, P.; LYKKESFELDT, A. E. Serum albumin as a modulator on growth of the human breast cancer cell line, MCF-7. **Anticancer Research**, Ulrich, v.10, n. 2A, p. 343-352, 1990.

MA, Q; HOPER, M.; HALLIDAY, I.; ROWLANDS, B. J. Diet and experimental colorectal cancer, **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 16, n. 3, p. 413-426, 1996.

McINTOSH, G. H.; REGESTER, G. Q.; LE LEU, R. K.; ROYLE, P. J.; SMITHERS, G. W. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 4, p. 809-816, 1995.

\_\_\_\_\_.; LE LEU, R. K. The influence of dietary proteins on cancer colon risk. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 21, n. 7, p. 1053-1066, 2001.

McLELLAN, E. A.; BIRD, R. R. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. **Cancer Research**, Moscow, v. 48, n. 21, p. 6187-6192, 1988.

MESSINA, M.; BENNINK, M. Soyfoods, isoflavonas and risk of colon cancer: a review of the in vitro and in vivo data. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, London, v. 12, n. 4, p. 707-728, 1998.

PERSKY, V.; VAN HORN, L. Epidemiology of soy and cancer: perspectives and directions. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125 (suppl. 3), p. 709S-712S, 1995.

PINE, M. F. Effect of low phenylalanine diet on murine leukemia L 1210. **Journal of National Cancer Institute**, Bethesda, v. 60, n. 3, p. 633-641, 1978.

PRETLOW, T. P.; BARROW, B. J.; ASHTON, W. S.; O'RIORDAN, M. A.; PRETLOW, T. G.; JURCISEK, J. A.; STELLATO, T. A. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. **Cancer Research**, Moscow, v. 51, n. 5, p. 1564-1567, 1991.

\_\_\_\_\_; O'RIORDAN, M. A.; SOMICH, G. A.; AMINI, S. B.; PRETLOW, T. G. Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F-344 rats treated with azoxymethane and phytate. **Carcinogenesis**, New York, v. 13, n. 9, p. 887-890, 1992.

RICHIE, J. P. The role of glutathione in aging and cancer. **Indian of Pediatrics**, New Delhi, v. 70, n. 5/6, p. 615-626, 1992.

RIPPLE, M. O.; HENRY, H.; RAGO, R.; WILDING, G. Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. **Journal of National Cancer Institute**, Bethesda, v. 89, n. 1, p. 40-48, 1997.

ROWLANDS, J. C.; HAKKAK, R.; RONIS, M. J. J.; BADGER, T. M. Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary land CYP1 expression in female rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, n. 12, p. 3281-3287, 2001.

SAKAMOTO, N. Antitumor effect of human lactoferrin against newly established human pancreatic cancer cell line SPA. **Cancer and Chemotherapy**, Tokyo, v. 10, p. 1557-1563, 1998.

SAVILLE, B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. **Food Chemistry**, Great Britain, v. 83, p. 670-673, 1958.

SHIVAPURKAR, N.; TANG, Z. C.; ALABASTER, O. The effect of high-risk and low risk diets on aberrant crypts and colonic tumor formation in Fischer-344 rats. **Carcinogenesis**, Netherlands, v. 13, n. 5, p. 887-890, 1992.

SPACKMAN, D. C.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic Recording Apparatus for use in the Chromatography of amino acids. **Biochemistry**, New York, v. 30, p. 1190-1206, 1958.

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

THEUER, R. Effect of essential amino acid restriction on the growth of female C57BL mice and their implanted BW 1032 adenocarcinomas. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 101, n. 4, p. 232-233, 1971.

USDEC - United States Dairy Export Council. **Manual de referência para produtos de soro dos Estados Unidos da América**. Arlington, 1997, 70 p.

## CONCLUSÃO GERAL

As tecnologias de produção utilizadas possibilitaram obter concentrados protéicos derivados do leite com o mínimo de tratamento térmico e de desnaturação protéica, nas condições utilizadas no trabalho. Isso foi particularmente importante tendo em vista que as condições que causam desnaturação da proteína, produzem significativa redução do efeito imunoestimulador.

Os camundongos da linhagem A/J responderam melhor ao estímulo antigênico promovido por imunização com hemácias de carneiro, mostrando-se mais adequados para utilização em modelo de indução de câncer de cólon do que os animais das linhagens Swiss, C<sub>57</sub>Bl/6 e Balb C.

Os resultados obtidos sugeriram a existência de um efeito imunomodulador das dietas contendo imunocal<sup>TM</sup> e concentrado protéico de soro doce, significativamente menor com a caseína e o isolado protéico de soja.

As proteínas utilizadas nas dietas diferiram significativamente em sua capacidade de exercer efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de cólon induzido por azoximetano. As proteínas de soro de leite foram mais eficientes em modular a síntese de glutathione e a resposta imune, exercendo maior proteção contra o desenvolvimento e o agravamento do câncer do que a caseína e o isolado protéico de soja. A quantidade de focos de criptas aberrantes presentes no cólon apresentou correlação com o desenvolvimento de tumores, podendo ser utilizado como marcador do desenvolvimento do câncer induzido. O efeito foi notado durante todo o experimento, reforçando resultados obtidos por outros pesquisadores em modelos experimentais de indução de câncer de cólon.

São necessários mais estudos para esclarecer os mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos protetores exercidos por proteínas do soro de leite, verificados nas condições de trabalho utilizadas.

## ANEXO

### Trabalhos apresentados em reuniões científicas

- **Efeito de proteínas da dieta no sistema imune e no desenvolvimento de tumores induzidos por azoximetano em camundongos**

Autores: Dias, NFGP.; Sgarbieri, VC.; Jacobucci, HB.; Tanikawa, C.; Saron, MLG.; Roman, JA.

XVI Congresso Brasileiro de Nutrição - II Congresso Latino-Americano e I Congresso Brasileiro de Nutrição Humana

Local: Porto Alegre – RS

- **Padronização da Técnica de PFC ("Plaque Forming Cells") utilizada para medir a propriedade imunomoduladora apresentada por proteínas de soro de leite.**

Autores: Dias, NFGP.; Sgarbieri, VC.; Rangel, HA.; Jacobucci, HB.; Tanikawa, C.; Santos, A.

XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Local: Fortaleza, CE:

- **Efeito das proteínas do lactosoro no sistema imunológico de camundongos.**

Autores: Dias, NFGP.; Sgarbieri, VC.; Rangel, HA.; Jacobucci, HB.; Pacheco, MTB.; Santos, A.

Simpósio Sul-Brasileiro de Alimentação e Nutrição: História, Ciência e Arte.

Local: Florianópolis, SC.

## **Efeito das proteínas do lactosoro no sistema imunológico de camundongos.**

Autores: Dias, NFGP.; Sgarbieri, VC.; Rangel, HA.; Jacobucci, HB.; Borges, PZ.; Pacheco, MTB.; Tanikawa, C.

III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, SP.

### **Publicações**

- **Novel nutritional and physiological functions of milk proteins.**

Autores: Dias, NFGP.; Jacobucci, HB.; Pacheco, MTB.; Tanikawa, C.; Rangel, HA.; Sgarbieri, VC.

Annals of Food of 21st Century - Foods and Resource, Technology, Environment (II)

Food Resource & New Products. WUXI: University of Light Industry, v. 1, p. 196-210, 2000.

- **Dietary proteins, immune functions and degenerative diseases.**

Annals of Nutrition & Metabolism, Viena, v. 45, supp. 1, p. 207, 2001.

Autores: Dias, NFGP.; Jacobucci, HB.; Pacheco, MTB.; Tanikawa, C.; Rangel, H.A.; Sgarbieri, VC.

- **Dietary protein, immune function and colon carcinogenesis in mouse.**

Nutrition Research, 2004.

Trabalho submetido à avaliação para publicação.