

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

**“CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS E EFEITO SOBRE LIPÍDIOS
SANGÜÍNEOS E HEPÁTICOS DAS PROTEÍNAS DE LACTOSORO E
CASEINATO DE SÓDIO, COMPARADOS À CASEÍNA E PROTEÍNA DE SOJA,
COMERCIAIS”**

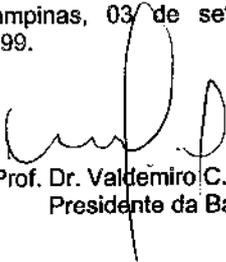
Helaine Beatriz Jacobucci

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Helaine Beatriz Jacobucci, aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de setembro de 1999.

Campinas, 03 de setembro de 1999.


Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri
Presidente da Banca

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

CAMPINAS
SÃO PAULO - BRASIL
JULHO - 1999



| | | | |
|-------------|--------------------------|---|-------------------------------------|
| UNIDADE | BC | | |
| N.º CHAMADA | | | |
| V. | Ex. | | |
| TOMEG BC/ | 39091 | | |
| PROC. | 229/99 | | |
| C | <input type="checkbox"/> | D | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO | R\$ 11,00 | | |
| DATA | 21/10/99 | | |
| CPD | | | |

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

J159c

Jacobucci, Helaine Beatriz

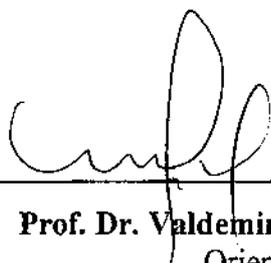
Características nutricionais e efeito sobre lipídios sangüíneos e hepáticos das proteínas de lactosoro e caseinato de sódio, comparados à caseína e proteína de soja, comerciais / Helaine Beatriz Jacobucci. - Campinas, SP: [s.n.], 1999.

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

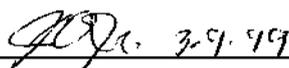
1.Soros. 2.Proteínas. 3.Colesterol. 4.Ultrafiltração.
5.Lipídios. I.Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II.Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III.Título.

CM-00136288-5

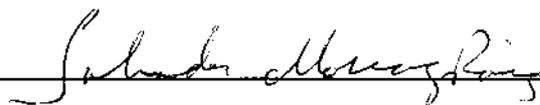
COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Orientador



Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan
Membro



Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
Membro

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu amigo e Orientador Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri pelo incentivo, apoio, confiança e amizade, proporcionando-me um maior conhecimento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Às minhas grandes colegas barangas, Nádia, Patrícia, Eloísa, Elke, Izabela e Teresa.

Às amigas Ana Rauen, Beth Lima, Beth Gomes, Kátia e Vanilda; aos colegas do laboratório de Bioquímica do ITAL, Ercília, Sandra, Renato, e em especial à minha amiga Vera Baldini, pelo incentivo e paciência.

Ao TECNOLAT pela utilização da planta para a produção do concentrado protéico de soro e aos amigos e funcionários que estiveram juntos, Zé Rubens, Sr. Cido, Izildinha, Dr. José Leonardo, Júnior (Dé), Regina, Betina e Talita.

Às funcionárias e amigas Soeli Reis, Liana Dawood, Eliete de Carvalho, Yara, pela colaboração e ajuda durante a realização do trabalho.

À amiga Cristina Tanikawa pela valiosa ajuda no trabalho experimental.

À Gabi, Bela e Rafa, pelo auxílio ocasional.

Aos professores membros da Banca Examinadora, pela revisão e aperfeiçoamento deste trabalho.

À Roche Químicas e Farmacêuticas S.A., pela elaboração e doação do complexo vitamínico AIN-93 G. À Santista Alimentos, pela doação do isolado protéico de soja. A Liotécnica pela liofilização do concentrado protéico de soro de leite.

À minha família, meus irmãos, primos, tias e tios, ao meu sobrinho Luiz Antônio e a minha avó Ana, pela paciência e compreensão.

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus pela iluminação nessa caminhada e constante presença em minha vida.

*“Quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma em algo,
nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade
que vem da certeza de que nada poderá vencer nossa fé.*

*Esta força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata e,
quando atingimos nosso objetivo, ficamos surpresos com a nossa própria
capacidade”.*

Paulo Coelho

Aos meus pais, Cidinha e Atílio,

Ao meu irmão André Luís.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE TABELAS | ix |
| RESUMO | xi |
| SUMMARY | xiii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 2.1. Proteínas de soro | 4 |
| 2.2. Produtos protéicos de soro | 6 |
| 2.3. Concentrado protéico de soro | 6 |
| 2.3.1 Ultrafiltração | 7 |
| 2.4. Composição dos derivados protéicos de soro de leite..... | 11 |
| 2.5. Propriedades funcionais fisiológicas das proteínas de soro de leite..... | 11 |
| 2.6. Lipoproteínas sanguíneas | 14 |
| 2.7. Aterosclerose | 18 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 22 |
| 3.1 Materiais | 22 |
| 3.1.1. Soro doce | 22 |
| 3.1.2. Caseinato de sódio | 22 |
| 3.2. Métodos | 22 |
| 3.2.1. Obtenção experimental dos concentrados protéicos (> 80% de proteína) de soro doce e soro ácido, do caseinato e do coágulo | 22 |
| 3.2.2. Caracterização química dos concentrados protéicos de soro de leite e do caseinato | 26 |
| Composição centesimal..... | 26 |
| • Proteína | 26 |
| • Lipídios totais | 27 |

| | |
|--|-----------|
| • Lactose..... | 27 |
| • Resíduo mineral (cinzas)..... | 28 |
| • Umidade..... | 28 |
| Determinação de aminoácidos | 28 |
| Solubilidade | 28 |
| 3.2.3. Ensaio Biológico | 29 |
| • Animais de experimentação | 29 |
| • Tratamentos | 29 |
| • Composição das dietas experimentais | 30 |
| • Delineamento Experimental | 35 |
| • Determinações no soro sanguíneo e no fígado | 38 |
| • Colesterol total | 38 |
| • Triacilgliceróis | 38 |
| • Proteína total | 38 |
| • Determinação do Quociente de Eficiência Protéica (PER) | 39 |
| 3.2.4 Análises estatísticas..... | 40 |
| 4. RESULTADOS | 41 |
| 4.1 Caracterização química dos produtos utilizados nos ensaios com ratos Wistar..... | 41 |
| 4.1.1. Composição centesimal e solubilidade | 41 |
| 4.1.2. Perfil de aminoácidos das quatro fontes protéicas usadas nos ensaios com ratos Wistar..... | 42 |
| 4.2 Primeiro Ensaio..... | 43 |
| 4.2.1 Ganho de peso e ingestão de dieta | 43 |
| 4.2.2 Quociente de Eficiência Protéica Operacional (PERop), modificado..... | 46 |
| 4.2.3 Colesterol sérico e hepático | 47 |
| 4.2.4 Triacilgliceróis séricos e hepáticos..... | 50 |
| 4.2.5 Proteína total | 53 |
| 4.3 Segundo ensaio | 54 |
| 4.3.1 Ganho de peso e ingestão de dieta | 55 |
| 4.3.2 Colesterol sérico e hepático..... | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3.3. Triacilgliceróis sérico e hepático | 59 |
| 4.3.4. Proteínas totais | 61 |
| 5. DISCUSSÃO | 63 |
| 5.1. Composição de aminoácidos | 63 |
| 5.2. Ganho de peso, ingestão de dieta e PERop modificado | 63 |
| 5.3. Colesterol sérico e hepático | 65 |
| 5.4. Triacilgliceróis séricos e hepáticos | 69 |
| 5.5. Proteína total | 71 |
| 6. CONCLUSÃO | 72 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 73 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| 1. Representação esquemática da ultrafiltração do soro..... | 8 |
| 2. Equipamento de ultrafiltração (WGM Equipamentos - KOCH Membrane Systems)..... | 23 |
| 3. Fluxograma para a obtenção dos concentrados protéicos de soro doce, ácido e de caseína..... | 25 |
| 4. Delineamento experimental do primeiro ensaio, utilizando ratos machos Wistar recém-desmamados, sacrificados aos 15, 30, 45 e 60 dias para os diferentes tratamentos. CSD: Concentrado Protéico de Soro Doce, IPS: Isolado Protéico de Soja, Cas Na: Caseinato de Sódio, CC: Caseína Comercial..... | 36 |
| 5. Delineamento experimental do segundo ensaio utilizando ratos machos Wistar, sacrificados aos 15, 30 e 45 dias para os diferentes tratamentos. CSD: Concentrado Protéico de Soro Doce, IPS: Isolado Protéico de Soja, Cas Na: Caseinato de Sódio, CC: Caseína Comercial..... | 37 |
| 6. Valores médios de ganho de peso (g) para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa) e caseína comercial (CC)..... | 45 |
| 7. Valores médios de ganho de peso por consumo de proteína (GP/CP) para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa) e caseína comercial (CC), computados aos 30 e aos 60 dias nas dietas..... | 46 |
| 8. Valores médios de PERop modificado (Quociente de Eficiência Protéica Operacional Modificado) para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa) e caseína comercial (CC)..... | 47 |
| 9. Níveis de colesterol sérico em mg/dL (média \pm desvio padrão) de ratos Wistar para os vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias. Valor de referência = T0..... | 49 |
| 10. Níveis de colesterol hepático em mg/g de tecido original (média \pm desvio padrão) de ratos Wistar para os vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja | |

| | |
|---|----|
| (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias. Valor de referência = T0..... | 50 |
| 11. Níveis de triacilgliceróis séricos em mg/dL (média ± desvio padrão) de ratos Wistar para os vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias. Valor de referência = T0..... | 51 |
| 12. Níveis de triacilgliceróis hepáticos em mg/g de tecido original (média ± desvio padrão) de ratos Wistar para os vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias. Valor de referência = T0..... | 52 |
| 13. Níveis de proteínas séricas totais em mg/100mL de ratos Wistar para os vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias. Valor de referência = T0..... | 54 |
| 14. Níveis de colesterol sérico de ratos Wistar em mg/dL para os vários tratamentos dietéticos, com 30% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 15, 30 e 45 dias. Valor de referência = T0..... | 57 |
| 15- Níveis de colesterol hepático de ratos Wistar em mg/g de tecido original para os vários tratamentos dietéticos, com 30% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 15, 30 e 45 dias. Valor de referência = T0..... | 58 |
| 16. Níveis de triacilgliceróis séricos de ratos Wistar em mg/dL para os vários tratamentos dietéticos, com 30% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 15, 30 e 45 dias. Valor de referência = T0..... | 60 |
| 17. Níveis de triacilgliceróis hepáticos de ratos Wistar em mg/g de tecido original para os vários tratamentos dietéticos, com 30% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 15, 30 e 45 dias. Valor de referência = T0..... | 61 |
| 18. Níveis de proteínas séricas totais de ratos Wistar em mg/100mL, para os vários tratamentos dietéticos, com 30% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 0, 15, 30 e 45 dias. Valor de referência = T0..... | 62 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| 1. Formulações utilizadas no primeiro ensaio com ratos Wistar, para os diferentes tratamentos (g/kg/dieta) com base nas recomendações da AIN-93G (Reeves <i>et al.</i> , 1993)..... | 31 |
| 2. Formulações utilizadas no segundo ensaio com ratos Wistar, para os diferentes tratamentos (g/kg/dieta) com base nas recomendações da AIN-93 G (Reeves <i>et al.</i> , 1993)..... | 32 |
| 3. Mistura mineral (AIN-93 G MX) que supre as concentrações recomendadas de elementos para a dieta AIN-93G..... | 33 |
| 4. Mistura vitamínica (AIN-93-VX) que supre as concentrações recomendadas de vitaminas para as dietas AIN-93 G. | 34 |
| 5. Composição centesimal e valor de solubilidade encontrados para os tratamentos CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio); CC (caseína comercial)..... | 41 |
| 6. Composição em aminoácidos (g/100g de proteína) do concentrado protéico de soro doce (CSD), do caseinato de sódio (CasNa), isolado protéico de soja (IPS), da caseína comercial (CC) e da referência (teórica) da FAO/WHO, para aminoácidos essenciais..... | 42 |
| 7. Consumo de dieta, consumo do proteína, ganho de peso e ganho de peso por proteína ingerida (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar, após 15, 30, 45 e 60 dias..... | 44 |
| 8. Níveis de colesterol sérico em mg/dL (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 20% de proteína, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 dias..... | 48 |
| 9. Níveis de colesterol hepático em mg/g de tecido original (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 20% de proteína, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 dias..... | 49 |
| 10. Níveis de triacilgliceróis séricos em mg/dL (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 20% de proteína, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 dias..... | 51 |
| 11. Níveis de triacilgliceróis hepático em mg/g de tecido original (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 20% de proteína, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 dias..... | 52 |

| | |
|--|----|
| 12. Níveis de proteínas séricas totais em mg/100mL (média ± desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 20% de proteína, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 dias..... | 53 |
| 13. Consumo de dieta, consumo de proteína, ganho de peso, ganho de peso/proteína ingerida, após 15, 30 e 45 dias..... | 55 |
| 14. Níveis de colesterol sérico em mg/dL (média ± desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 30% de proteína, nos tempos de 15, 30 e 45 dias..... | 56 |
| 15. Níveis de colesterol hepático em mg/g de tecido original (média ± desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 30% de proteína, nos tempos de 15, 30 e 45 dias..... | 58 |
| 16. Níveis de triacilgliceróis séricos em mg/dL (média ± desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 30% de proteína, nos tempos de 15, 30 e 45 dias..... | 59 |
| 17. Níveis de triacilgliceróis hepático em mg/g de tecido original (média ± desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 30% de proteína, nos tempos de 15, 30 e 45 dias..... | 60 |
| 18. Níveis de proteínas séricas totais em mg/100mL (média ± desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 30% de proteína, nos tempos de 15, 30 e 45 dias..... | 62 |

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos: produzir um concentrado protéico de soro doce (CSD) utilizando-se ultrafiltração e diafiltração, e caseinato de sódio (CasNa); verificar o efeito das proteínas do lactosoro e do caseinato de sódio (CasNa), comparativamente ao isolado protéico de soja (IPS) e a caseína comercial (CC) nos níveis séricos e hepáticos de colesterol total e triacilgliceróis, bem como sobre as proteínas séricas totais. O CSD apresentou a seguinte composição, expressa em base seca: 83,84% de proteína, 4,48% de lipídios, 2,77% de cinzas, 8,88% de lactose, 96,37% de sólidos totais. A solubilidade foi 93,09% em tampão citrato-fosfato, pH 4,6. Para o CasNa obteve-se 76,88% de proteína, 1,66% de lipídios, 9,01% de cinzas, 19,91% de lactose, 93,85% de sólidos totais. A solubilidade em água, pH ajustado a 7, foi de 98,2%.

Foram feitos dois ensaios biológicos com ratos Wistar normolipidêmicos, cada ensaio com os tratamentos CSD, IPS, CasNa e CC. Os animais receberam dieta e água "ad libitum". Todas as dietas foram isoprotéicas e isocalóricas com base nas recomendações de Reeves *et al.*, (1993), substituindo-se o óleo vegetal por 6% de gordura de coco e acrescentando-se 1% de colesterol.

No primeiro ensaio utilizou-se 20% de proteína para todas as dietas. Foram utilizados 106 animais recém-desmamados, sendo que 10 foram separados e sacrificados para obtenção dos valores de referência (T0) e os demais divididos em 4 grupos com 24 ratos cada. Nos tempos 15, 30, 45 e 60 dias, foram sacrificados 6 animais de cada grupo, efetuando-se análises para verificar o efeito das dietas, principalmente do CSD, na redução dos níveis séricos e hepáticos de colesterol total e triacilgliceróis. Notou-se um efeito positivo na redução dos níveis de colesterol do CSD e IPS, mais evidente para os níveis séricos do que para os hepáticos.

Um segundo ensaio foi feito com 123 animais de 57 dias de idade, onde todas as dietas continham 30% de proteína. Quinze animais foram sacrificados para a obtenção dos valores de referência (T0) e os demais foram divididos em 4 grupos com 27 animais em cada grupo. Nos tempos 15, 30 e 45 dias os animais foram sacrificados e as análises foram feitas da mesma maneira que no primeiro ensaio. A hipocolesterolemia foi mais notada

quanto aos níveis hepáticos, apresentando menores valores para o tratamento com CSD e com o IPS, respectivamente. Os resultados para triacilgliceróis não permitiram concluir sobre os efeitos dos tratamentos sobre a lipídemia, no soro sanguíneo e no fígado, tanto no primeiro quanto no segundo ensaios.

SUMMARY

The present work had the following objectives: to produce whey protein concentrate (WPC) using ultrafiltration and diafiltration, and sodium caseinate (CasNa); to verify the effect of milk whey protein on serum and liver total cholesterol and total blood serum protein, comparatively to soy bean protein isolate (SPI) and commercial casein (CC). The WPC presented the following composition (dry basis): protein 83.84%, total lipids 4.48%, ash 2.77%, lactose 8.88% and total solids 96.37%. Solubility in citrate-phosphate buffer, (pH 4.6) was 93.09%. For the sodium caseinate the composition was: protein 76.88%, total lipids 1.66%, ash 2.77%, lactose 8.88% and total solids 93.85%. The solubility in water, pH adjusted to 7.0, was 98.2%.

Two biological assays with rats were performed with the treatments WPC, SPI, CasNa and CC. During the assays the animals received diet and water ad libitum. All the diets were isoproteic and isocaloric, based on recommendations of Reeves *et al.*, (1993), by 6% coconut replacing the oil plus 1% cholesterol.

In the first assay, 20% protein was utilized in all diets. One hundred and six weaning rats were used, 10 rats were sacrificed at the beginning for reference (T0) and the remaining animals divided in 4 groups of 24 rats each. Six animals were sacrificed from each group after 15, 30, 45 and 60 days of experiment. Analysis were performed to verify the influence of the treatments on blood serum and liver levels of cholesterol and triacylglycerols. A positive reduction of cholesterol was demonstrated for the rats fed WPC and SPI. Cholesterol reduction was more evident in the blood serum than in the liver.

A second assay was performed using 123 animals with 57 days of age and all diets were prepared with 30% protein. Fifteen animals were sacrificed at the beginning for reference value, the remaining were divided in 4 groups of 27 rats per group. After 15, 30 and 45 days of experiment animals were sacrificed and analysis were performed in the blood serum and liver, as in the first assay. Hypocholesterolemia was noticed mainly in the liver, which presented lower values for the treatments with WPC and SPI. The results for triacylglycerols did not permit any conclusion as to the effect of the treatments on blood serum and liver lipidemia for both, the first and second assays.

1. INTRODUÇÃO

O leite bovino contém 3,9% de gordura, 3,3% de proteína, 5% de lactose e 0,7% de minerais. Pode ser considerado o alimento mais completo da natureza e o único que satisfaz às necessidades dos recém-nascidos, nos primeiros meses de vida. O leite humano difere do leite de outras espécies de mamíferos por apresentar a menor concentração de proteína, porém a mais elevada relação proteínas de soro/caseínas. Portanto, as proteínas de soro de outros tipos de leite, por exemplo do leite de vaca, oferece um perfil de aminoácidos que mais se aproxima ao do leite humano. As principais proteínas do leite de vaca são as caseínas (~80%) e as proteínas do soro (~20%). As caseínas podem ser separadas das proteínas do soro principalmente por dois processos: precipitação no pH isoeletrico (pH 4,6, 20°C); coagulação pela ação da enzima quimosina (renina), no processo industrial de fabricação de queijos (Wong *et al.*, 1996).

Quando a caseína é removida do leite desnatado, o líquido remanescente recebe o nome de soro de leite. Se a remoção da caseína é feita pela adição de ácido (pH 4,6), o soro se denomina “soro ácido”, se feito pela ação da quimosina, tem-se o “soro doce” que em geral, contém maior quantidade de peptídios e aminoácidos livres, resultantes da ação da quimosina sobre as caseínas. O soro contém 93,6% de água e 6,4% de sólidos. Desidratado, o soro contém cerca de 12% de proteínas, 3% de gordura, 10% de minerais e 75% de lactose (Wong *et al.*, 1996).

Morr & Ha (1993) estimaram que a produção mundial de soro proveniente da fabricação de queijos e de caseína era da ordem de 86 bilhões de Kg, o que continha aproximadamente 0,5 bilhão de Kg de proteínas do soro.

Para Santos & Martinez (1996), as proteínas de soro de leite possuem propriedades nutritivas e funcionais bem superiores a outras proteínas de origem animal e as de origem vegetal. Sabe-se que essas proteínas têm sido usadas cada vez mais em nutrição humana pelo seu elevado valor nutritivo, superior às do ovo integral e às do leite humano, além de apresentarem várias propriedades fisiológicas especiais.

Segundo Bird (1996), 45% do soro produzido na Europa entre 1991-1992 foi processado com destino à alimentação animal, 40% utilizado na fabricação de soro em pó, 12% na fabricação de Concentrado Protéico de Soro (CPS) e 3% na produção de lactose.

Devido ao seu alto teor de água (93%) e baixo teor protéico (0,7%), o uso de soro lácteo em produtos alimentícios convencionais têm sido bastante limitado, já que o custo da secagem é bastante elevado. O fracionamento dos componentes do soro por ultrafiltração (UF) modifica este quadro, tornando viável o aproveitamento das proteínas do soro (Thijssen & Van Oyen, 1977).

Para Marshall & Harper (1988), nos últimos 25 anos, as proteínas de soro foram reconhecidas como sendo valiosos nutrientes que poderiam ser utilizados de diferentes modos. Eles consideraram que esse período foi de rápido crescimento na tecnologia de alimentos, tendo havido um grande aumento do uso de proteínas funcionais em alimentos processados bem como a recuperação econômica das proteínas de soro.

Mais recentemente, muitos alimentos passaram a ser estudados por suas propriedades funcionais fisiológicas por conterem componentes que agem modulando o metabolismo no sentido de oferecer maior proteção à saúde (Mazza, 1998; Sgarbieri, 1999).

A aterosclerose é a principal causa de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, levando a doenças como infarto do miocárdio e derrame cerebral, respectivamente, sendo a principal causa de morte nas populações ocidentais (mais de 40% de todas as mortes). Isso pode ser atribuído, em parte, às mudanças ocorridas nos hábitos alimentares, com aumento no consumo de produtos industrializados e ricos em gorduras, ao invés de vegetais e fibras. Uma elevação no colesterol sérico total é um dos maiores fatores de risco de aterosclerose (Grundy, 1995). Evidências experimentais indicaram que a diminuição do colesterol sérico pode reduzir a progressão e então induzir a regressão do processo aterosclerótico (Goldman & Cook, 1984).

Dados de literatura sugerem que doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson, câncer, aterosclerose, imunodeficiências e doenças infecciosas tiveram seus efeitos prejudiciais diminuídos pela ingestão contínua de proteínas de soro de leite (Bounous *et al.*,

1981). Já Kajikawa *et al.* (1994) afirmaram que a ingestão de proteínas de leite afeta os níveis séricos de lipídios, especialmente, as proteínas de soro que tendem a reduzir esses níveis.

Potter *et al.* (1993) já consideravam a proteína como sendo um fator da dieta que pode influenciar os lipídios séricos. Segundo Carrol (1991) proteínas de origem animal, como a caseína, geralmente são hipercolesterolêmicas e aterogênicas quando comparadas com proteínas vegetais, como a proteína de soja, tanto em seres humanos quanto em uma variedade de modelos animais. Goldberg (1995) citado por Dias (1997) sugere o uso da proteína de soja como alternativa não-farmacológica para redução do colesterol. Salienta, ainda, que, na prevenção primária de enfermidades coronarianas, médicos e pacientes desejam evitar o uso de medicamentos para reduzir concentrações elevadas de colesterol. Assim, o uso de adjuntos à dieta, tais como fibras e proteína de soja, pode reduzir, aos níveis desejados, as concentrações de lipídios, sem uso de terapia farmacológica. De acordo com seus estudos, a proteína de soja, incorporada a uma dieta baixa em gorduras, pode reduzir as concentrações de colesterol total e das lipoproteínas de baixa densidade, LDL.

Com o propósito de verificar os possíveis efeitos funcionais fisiológicos das proteínas de soro de leite, na forma de concentrado protéico, na redução dos níveis de colesterol e triacilgliceróis séricos, foram enfocados neste trabalho:

- produção de um concentrado protéico de soro doce (CSD) e caseinato de sódio (CasNa) com o mínimo de desnaturação das proteínas;
- efetuar a caracterização química do concentrado protéico de soro doce e do caseinato de sódio (composição centesimal e de aminoácidos e solubilidade);
- verificar o efeito das proteínas do lactosoro (concentrado protéico de soro doce) e do caseinato de sódio nos níveis lipídicos de ratos Wistar, particularmente nos níveis de colesterol total e triacilgliceróis a nível sérico e hepático e proteína sérica total, comparativamente à uma caseína e um isolado protéico de soja comerciais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Proteínas de soro

Após a remoção da caseína do leite, como resultado dos processamentos de queijo ou extração de caseína, permanecem no soro as proteínas e peptídios que resultam da ação da plasmina e quimosina para o leite tratado com renina e ainda com uma pequena e variável quantidade de β -caseína (Marshall & Harper, 1988).

As proteínas do soro incluem β -Lactoglobulina (β -Lg), α -Lactalbumina (α -La), imunoglobulinas (Ig), albumina sérica bovina (BSA) e polipeptídios de menores pesos moleculares derivados da proteólise de algumas das caseínas. Os dois grupos principais são o da β -Lg e da α -La, representando mais de 80% das proteínas do soro, sendo que a β -Lg representa aproximadamente 55% e a α -La 25% (Horne, 1990).

A β -lactoglobulina, principal proteína do soro, existe no leite como um dímero em temperatura ambiente e entre pH 5 e 7. Acima de 40°C o dímero começa a se dissociar em monômeros, forma primária da β -Lg durante a desnaturação térmica. A α -lactalbumina (α -La) é a segunda proteína mais importante do soro, sendo a de menor peso molecular e a mais termoresistente. A α -La é uma proteína que liga cálcio e estas ligações de cálcio são fortemente dependentes do pH. Sabemos que a lactalbumina é produzida pela precipitação térmica ou precipitação ácida na presença de íons cálcio. A albumina sérica bovina (BSA) contém a maior cadeia peptídica de todas as proteínas de soro e está envolvida nas ligações com ácidos graxos (Marshall & Harper, 1988). A BSA é sintetizada no fígado e entra para a circulação aparecendo no leite através das células secretoras, onde formam um menor componente de aproximadamente 1-2% do total de proteínas do leite (Horne, 1990).

As imunoglobulinas (Ig) no leite e no soro incluem IgG, IgA e IgM, sendo que a IgG corresponde a 80% do total das imunoglobulinas. Essas proteínas, junto com a lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima e xantina oxidase são importantes em relação às propriedades antimicrobianas do colostro (Reiter, 1985). A maioria das proteoses e

peptonas do soro são produtos da degradação da β -caseína e contribui para a propriedade formadora de espuma apresentada pelo soro. Em alguns leites eles podem contribuir com mais de 20% do conteúdo protéico de soro (Horne, 1990).

O soro contém de 4 a 7g de proteína/litro, sendo que a concentração real depende do tipo de soro (ácido ou doce, tipo de queijo ou caseína), estágio de lactação e condições de processamento usados na manufatura do queijo ou caseína (Marshall & Harper, 1988).

As proteínas nativas do soro são separadas das caseínas no leite bovino pela sua solubilidade em pH 4,6. As proteínas do soro apresentam diferentes sensibilidades para temperaturas maiores que 50°C. O grau de desnaturação depende dos componentes da proteína, da concentração total dos sólidos e de proteína, temperatura, tempo de exposição, pH e força iônica. As Ig são mais sensíveis à temperatura enquanto que a fração proteose-peptona é termoestável em uma larga faixa de pH (Marshall & Harper, 1988).

As proteínas de soro apresentam alto valor nutricional e, dependendo do tipo de processamento, alta funcionalidade incluindo solubilidade em uma larga faixa de pH, formação de gel termoinduzido, espumas estáveis e emulsifica quantidades significantes de lipídios (Marshall & Harper, 1988).

Dependendo do método de secagem do produto, da variação das características de absorção de água, vários produtos de diferentes graus de funcionalidade podem ser produzidos por uma variedade de tratamentos térmicos e ajuste de pH (Marshall & Harper, 1988).

Os derivados protéicos de soro são formas solúveis contendo 25-95% de proteína em peso seco e são produzidos comercialmente por UF, adsorção e troca iônica, e precipitação com polifosfato ou filtração em gel, freqüentemente associado com a desmineralização e cristalização da lactose. Os produtos protéicos de soro com mais de 90% de proteína em peso seco são chamados de isolados protéicos de soro (IPS), semelhante aos produtos que são produzidos na indústria de soja (Marshall & Harper, 1988).

As técnicas para a produção de soro foram revistas por Evans & Gordon (1990), Marshall (1982) e Matthews (1984).

Recentemente, produtos protéicos puderam ser preparados também em plantas-piloto ou em produção comercial por técnicas de fracionamento das proteínas do soro de leite. Entre eles têm-se a α -lactalbumina, β -lactoglobulina, fosfolipoproteínas, lactoferrina, lactoperoxidase e Ig (Marshall & Harper, 1988).

2.2 Produtos protéicos de soro

O soro líquido pode passar por várias etapas de processamento antes de se tornar concentrado ou isolado protéico. Essas etapas incluem predigestão parcial, coagulação das caseínas, ultrafiltração e diafiltração para remoção de lactose (açúcar do leite, com peso molecular de 342 Da), sais minerais e gordura; osmose reversa para separar diferentes partículas moleculares; dois processos de troca iônica e secagem de alta velocidade com baixa temperatura para evitar desnaturação dos componentes protéicos do soro (Brink, 1996).

Os produtos obtidos de soro integral (queijo; soro em pó; e soro desmineralizado) contém, relativamente, baixas concentrações de proteína (10-15%) e a proteína, geralmente, tem somente papel nutricional nos alimentos. As proteínas de soro são usadas em alguns tipos de queijo (incluindo o queijo feito da ultrafiltração do leite) e combinadas com as caseínas ou proteínas microbianas, como um meio de aumentar o rendimento. As proteínas de soro são mais concentradas no soro deslactosado e desmineralizado (15-25% em peso seco), mas tem poucas características funcionais (Marshall & Harper, 1988).

2.3 Concentrado protéico de soro

Em 1990, somente nos EUA, a indústria de alimentos fabricou aproximadamente 80.000 toneladas de concentrado protéico de soro (CPS) com teores de 35-75% de proteína (Morr, 1992).

A concentração das proteínas do soro pode ser conseguida por ultrafiltração (UF) e diafiltração (DF). Para todos os concentrados protéicos de soro o fracionamento de outros componentes do soro (principalmente água e lactose) representa somente uma parte do processo. As principais operações para concentração de proteínas estão descritos a seguir.

2.3.1 Ultrafiltração

A ultrafiltração é uma técnica preferida para a fabricação do CPS com $\geq 50\%$ de proteína (Morr & Foegeding, 1990).

A UF é um processo de fracionamento físico-químico e uma técnica de concentração onde uma solução pressurizada flui sobre uma membrana porosa (Porter & Michaels, 1970). Segundo Kosikowsky (1986), trata-se de um processo que permite a separação seletiva de solutos de baixo peso molecular juntamente com a água, a partir de alimentos líquidos. Essa separação dependerá do valor “cut off” da membrana, que é indicado pelo peso molecular mínimo que a membrana irá reter e, deste modo, ocorre uma concentração de substâncias macromoleculares na solução processada (retentado). De acordo com Morr & Ha (1993), ultrafiltração é um processo industrial utilizado para o fracionamento de soro com o objetivo de produzir um concentrado protéico de soro com alto teor de proteína. É usualmente seguida de diafiltração com água desionizada para a remoção de lactose residual e minerais do retentado antes da secagem.

As principais vantagens da UF sobre outros processos de separação são: não envolve mudança de fase; pode ser conduzido a baixas temperaturas e pressão hidrostática, não afetando substâncias termosensíveis; não necessita de reagentes químicos (Porter & Michaels, 1970). A figura 1 ilustra o princípio de funcionamento da ultrafiltração.

A membrana só permite a separação seletiva de proteína da lactose, dos sais minerais e da água. O retentado ou concentrado (a solução na qual a proteína é concentrada, com solutos de alto peso molecular) flui ao longo da membrana, enquanto sob efeito de pressão, a água flui através da membrana, junto com solutos de baixo peso molecular (o permeado). A proteína é retida pela membrana, junto com glóbulos de gordura, colóides ou

sólidos em suspensão, e é concentrada em relação aos outros solutos do soro original (Glover, 1986).

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 (Beaton, 1979). No caso do soro, isto é causado principalmente pela precipitação de 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).

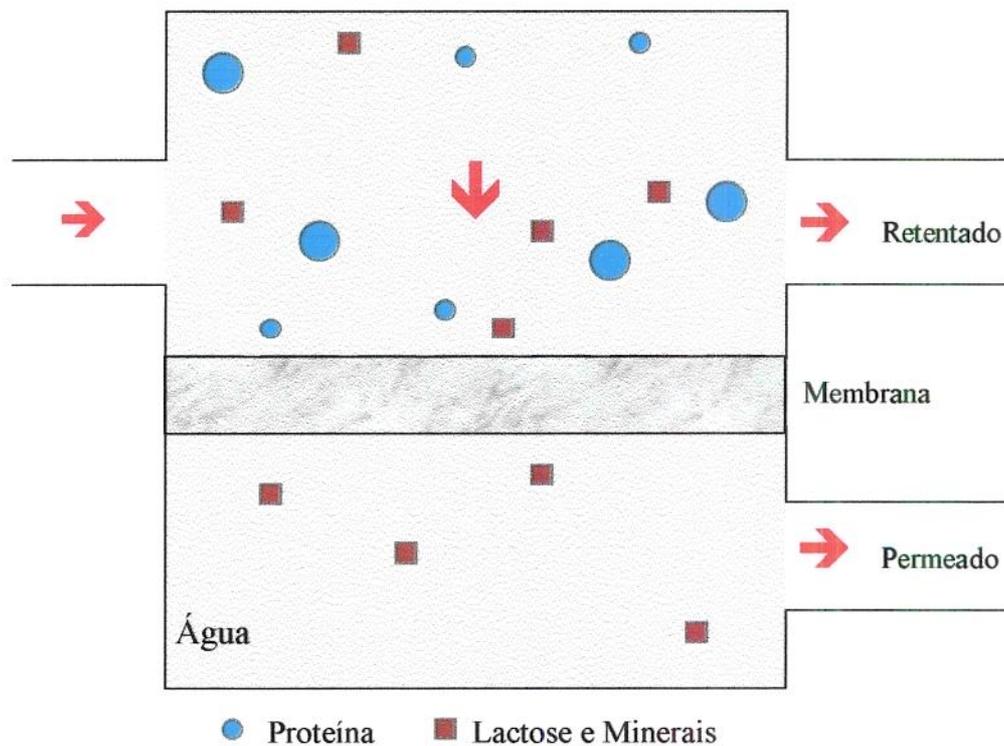


Figura 1 - Representação esquemática da ultrafiltração do soro.

Assim, qualquer tratamento tecnológico leva 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. Com esse intuito, há

uma série de propostas de pré-tratamentos do soro a ser submetido à UF. São elas:

- clarificação e filtração, que tem o objetivo de remover partículas em suspensão como gordura residual, microorganismos, finos de caseína etc., e, com isso retardar a formação da camada secundária sobre a membrana ativa (Mello, 1989);
- aquecimento e o simples ajuste de pH do soro ácido de 4,6 para 7,0 pela adição de hidróxido de cálcio ou sódio, faz o fosfato de cálcio precipitar. O sedimento, removido por gravidade, contém lipídios e proteínas, além de minerais. A aplicação dessa técnica de neutralização melhora o fluxo mas as concentrações de minerais no CPS resultante aumentam, devido ao alto coeficiente de rejeição do cálcio e fosfato a pH 7. O fosfato de cálcio residual não removido no processo de decantação fica retido no produto. Esse processo compreende a base da patente concedida a J. M. Attebery (US Patent 3 560 219; citada por Mattheus *et al.*, 1978) e uma variante do pré-tratamento proposto por Kim *et al.* (1989) que confirmaram ser a taxa de permeação do soro assim tratado, o dobro do soro controle. As proteínas do CPS obtido pela UF do soro tratado são mais solúveis a pH 3, mas apresentam menor poder de emulsificação que as proteínas do CPS do soro controle (Mello, 1989).

A diminuição do pH tem o efeito de solubilizar o fosfato de cálcio; abaixo do pH 5, não sendo provável a precipitação do fosfato de cálcio. Além disso, o pH afeta a carga elétrica e a capacidade de hidratação da proteína. Quanto maior a distância do ponto isoelétrico, maior será a carga líquida. Uma alta carga líquida favorece a dispersão da proteína e diminui a tendência à deposição. O efeito do pH sobre o comportamento de associação/dissociação da β -Lg, que constitui aproximadamente 50% da proteína bruta do soro, é bem conhecido. Na faixa de pH de 5,2 a 7,5, todas as variantes genéticas da β -Lg existem como dímeros. A dissociação, para a forma monomérica, tem sido observada abaixo do pH 3,5, com a extensão da dissociação aumentando em função da diminuição do pH. A faixa de pH geralmente utilizada neste pré-tratamento vai de 3,0 a 1,5, sendo que a melhora na taxa de permeação depende do tipo de soro utilizado, particularmente do seu teor mineral (Viotto, 1993).

- substituição do cálcio pelo sódio; desmineralização, seqüestro de cálcio com EDTA ou adição de citrato de sódio e pré-concentração do soro (Ennis *et al.*, 1981; Hayes *et al.*, 1981).

O pré-tratamento oferece um meio de se controlar a composição e o processamento do soro e, portanto, altera a taxa de permeação, composição e propriedades do CPS resultante. A caracterização dos fluxos líquidos do processo de UF, o acompanhamento das mudanças de composição e propriedades funcionais do CPS e o efeito sobre o desempenho da membrana, provocado pelo uso de pré-tratamento do soro, contribuem para um melhor entendimento do fenômeno de “fouling” durante a UF do soro, sendo extremamente importantes para o estabelecimento de uma tecnologia de obtenção comercial do CPS (Viotto, 1993).

Portanto, a UF fornece uma nova forma de concentrar solutos de alto peso molecular presentes em solução sem aplicação de calor e sem uso de condições físicas ou químicas severas. Para as proteínas isso significa concentração sem qualquer modificação séria na estrutura e na funcionalidade. Por exemplo, as proteínas em alimentos podem ser concentradas com um mínimo de desnaturação e enzimas podem ser concentradas sem perda significativa de atividade (Mello, 1989).

A diafiltração pode ser combinada à UF, usada para separar mais lactose e sais minerais e elevar a concentração de proteína do soro de 60% a 80%, ou mais. Diafiltração é um processo de membrana que aumenta a concentração protéica adicionando água continuamente ao retentado à medida que este circula pelo sistema de UF. A diafiltração promove a lavagem ou separação subsequente da lactose e sais minerais das proteínas e permite obter uma proporção proteína-sólidos mais elevada. Como resultado da diafiltração, a concentração de proteína no CPS se eleva para os valores iguais ou superiores a 80% (Marshall & Harper, 1988). A diafiltração aumenta a pureza do concentrado protéico e a funcionalidade dos ingredientes bem como o controle final da composição (Huffman, 1996).

2.4 Composição dos derivados protéicos de soro de leite

Os derivados protéicos de soro constituem-se de diferentes produtos que podem diferir significativamente tanto em composição quanto no desempenho em sistemas alimentícios. Eles variam em conteúdo protéico de 25->95%, de 0,2 a 10% de gordura, de 0,1 a 15% de cinzas e de 0 a 60% de lactose. Com o aumento nos teores de proteína aumentam também os teores de gordura, a razão proteína/carboidrato, a razão proteína/cinzas, o valor nutricional e a funcionalidade por unidade de peso do concentrado.

Para uma igual concentração a importância nutricional e a funcionalidade dos CPS são os mesmos para produtos com os níveis protéicos acima de 50% (Harper, 1984).

2.5 Propriedades funcionais fisiológicas das proteínas de soro de leite

As proteínas de soro de leite apresentam propriedades fisiológicas importantes (imunológicas), devido ao fato de promoverem aumento nos níveis de glutathione celular. O fator de crescimento ligado a insulina (IGF-1) é um hormônio 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 da formação de músculo e esqueleto em adultos. Os estudos indicam que a quantidade de IGF-1 é diretamente proporcional à qualidade e quantidade de proteína na dieta. Hidrolisando o soro para obter di, tri, e oligopeptídios, aumenta-se o valor biológico (VB) e assim aumenta a liberação de IGF-1. Isso torna o soro a melhor proteína formadora da massa corporal (Brink, 1996).

Brink (1996) afirmou que as proteínas de soro parecem ser as únicas proteínas com habilidade de aumentar a resposta imune, elevar os níveis de glutathione celular e prolongar a vida de animais de experimentação. A glutathione é um tripeptídeo composto por cisteína, ácido glutâmico e glicina, sendo encontrada em quase todas as células do organismo animal e humano. A glutathione é um potente agente antioxidante e desintoxicante que neutraliza radicais livres. Protege contra a clivagem do DNA causada por raios X e radiações ultravioleta do sol ajudando a manter a capacidade carreadora de oxigênio das células

vermelhas do sangue (Brink, 1996).

Os cientistas encontraram que níveis reduzidos de glutathione estão associados com uma resposta imune deficiente. Em particular eles mostraram que glutathione intracelular está diretamente relacionada com a habilidade dos linfócitos em responder a um estímulo mitogênico. Também que a resposta imune humoral, envolvendo produção de anticorpos requer rápida síntese protéica, a qual, por sua vez, requer uma ingestão adequada na dieta de aminoácidos essenciais, sendo todos encontrados em abundância nas proteínas de soro de leite (Bounous & Gold, 1991).

As proteínas de soro de leite possuem propriedades nutritivas e funcionais bem superiores a outras proteínas de origem animal e as de origem vegetal. Essas proteínas têm sido usadas cada vez mais em nutrição humana pelo seu elevado valor nutritivo, superior às do ovo integral e às do leite humano além de apresentarem várias propriedades fisiológicas especiais. O perfil de aminoácidos das proteínas de soro de leite é muito semelhante ao das proteínas do leite humano, prestando-se muito bem à formulação de produtos que substituem, com vantagens, o leite de vaca na alimentação infantil (Renner, 1988). Produtos genericamente chamados “leites humanizados” poderão ser formulados pela adição, ao concentrado protéico de soro de leite, de caseína, óleo vegetal, minerais e vitaminas, além de fatores protetores como lisozima, probióticos e outros fatores de regulação (Renner, 1988).

Os concentrados protéicos de soro poderão ser usados na formulação de produtos de alta densidade calórica e baixo resíduo, como em dietas para pós-cirurgia, cardíacos, geriátricos e pacientes imobilizados (Satterlee, 1981).

Várias características da composição de aminoácidos das proteínas de soro são altamente desejadas para fórmulas infantis, por exemplo, relação ideal igual a 1,0 para cisteína/metionina, baixos teores de aminoácidos aromáticos, particularmente, fenilalanina e tirosina (favorece crianças com fenilcetonúria) (Hambraeus, 1982), elevados teores dos aminoácidos essenciais de cadeias ramificadas como valina, leucina e isoleucina, considerados importantes para o desempenho de esportistas (Steele & Harper, 1990). Estudos recentes mostraram que a ingestão de elevados teores de aminoácidos ramificados

auxilia na recuperação de traumas múltiplos (Brenan *et al.*, 1986) e de queimaduras (Alexander & Gottschlich, 1990).

As proteínas de soro de leite têm sido apontadas (Bounous *et al.*, 1983) como importantes moduladores do sistema imunológico, tanto o sistema celular como o sistema humoral, estimulando particularmente a formação de células plaquetárias pelo baço.

A mistura de proteínas de soro e de soja a 50%, induziu resposta imune quatro vezes superior à dieta com proteína de soja apenas. Dieta para hamsters contendo 20% de proteína de soro aumentou em 50% a longevidade dos machos (Birt *et al.*, 1982). Dieta com 20% de proteína de soro (Constantino *et al.*, 1989) inibiu a incidência e o tamanho de tumores de cólon induzidos pela dimetilhidrazina (DMH) em camundongos, quando comparada com dietas comercial da Purina e dieta de caseína, ambas com 20% de proteína.

Trabalhos desenvolvidos no Canadá (Bounous *et al.*, 1981) revelaram uma série de propriedades fisiológicas muito importantes para as proteínas de soro de leite bovino, quando não desnaturadas. Dentre essas propriedades têm sido citadas: a) elevação de glutathione no baço, fígado, linfócitos, coração, cérebro e no sangue. Os trabalhos dos canadenses especulam que a L-glutamylcisteína presente em algumas das proteínas do soro (soroalbumina) é absorvida intacta, servindo como substrato para a síntese da glutathione. A hipótese é que a ação antioxidante e desintoxicante da glutathione mantém os linfócitos em ótimas condições de funcionamento, permitindo um melhor combate aos agressores do organismo.

O declínio dos níveis de glutathione com o envelhecimento também foi associado ao aumento do risco de aterosclerose. Isso porque a glutathione é capaz de prevenir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ligada ao colesterol. Quando as LDL 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, levando à ataques cardíacos e derrames (Brink, 1996).

2.6 Lipoproteínas Sangüíneas

Os principais lipídios circulantes no sangue humano são de 4 tipos: triacilgliceróis; colesterol livre; ésteres do colesterol e fosfolipídios. Estes são transportados pelo sangue na forma de moléculas esféricas complexas, de tamanho e densidade variáveis, as chamadas lipoproteínas (Mahan & Arlin, 1995).

Os lipídios têm propriedades comuns, sendo insolúveis em água; solúveis em solventes orgânicos, como éter e clorofórmio; utilizáveis pelos organismos vivos. A maior parte das gorduras naturais é composta de cerca de 98% a 99% de triacilgliceróis e a grande maioria desses são de cadeias longas. O restante 1 a 2%, inclui traços de mono e diacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios e matérias não saponificáveis contendo esteróis (Mahan & Arlin, 1995).

Os triacilgliceróis (principais componentes de gorduras e óleos comuns), são compostos de carbono, hidrogênio e oxigênio. Estruturalmente eles são ésteres de um álcool triídrico (glicerol) e ácidos graxos. Os ácidos graxos podem ter de 4 a 30 átomos de carbono e constituem a parte principal do triacilglicerol (Mahan & Arlin, 1995).

O colesterol também é outro lipídio importante na manutenção da integridade das membranas celulares e precursor de hormônios esteróides e ácidos biliares. É sintetizado na maioria dos tecidos, particularmente no fígado e na mucosa intestinal. O colesterol é também um determinante da fluidez da membrana para as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (Thomas & Holub, 1994). No ser humano, o colesterol é derivado da dieta (200-400mg/dia) e da síntese endógena (750-1000mg/dia). A velocidade de síntese do colesterol é influenciada pela própria concentração de colesterol dentro da célula, em um sistema de controle do tipo "feedback" (Mahan & Arlin, 1995). O colesterol endógeno (como ácidos biliares) e o colesterol da dieta são ambos transformados no intestino e absorvidos. A absorção do colesterol endógeno parece ser mais eficiente do que do colesterol da dieta (Thomas & Holub, 1994).

Os lipídios são insolúveis em solução aquosa e não podem circular no plasma. Para isto, combinam-se com proteínas especializadas chamadas de apolipoproteínas ou

apoproteínas. O complexo apoproteína-lipídio é denominado lipoproteína. A principal função das lipoproteínas é transportar os lipídios no organismo, incluindo as vitaminas lipossolúveis, e também ajudar a estabilizar membranas celulares. As apoproteínas possuem uma seqüência peculiar de aminoácidos que as permitem se ligar aos lipídios e se dissolver no meio aquoso do plasma. Estas proteínas possuem uma série de funções, como ativar enzimas responsáveis pela hidrólise dos lipídios e se ligar a receptores celulares específicos que permitem a degradação celular das lipoproteínas (Mahan & Arlin, 1995).

As lipoproteínas são macromoléculas complexas (Khachadurian, 1990) que contém um núcleo hidrofóbico onde concentram-se ésteres de colesterol e triacilgliceróis, envolvidas por uma camada de fosfolípidios, colesterol livre e proteínas denominadas apolipoproteínas, as quais mantêm a sua estabilidade e solubilidade. Segundo Lawn (1992), a lipoproteína é uma partícula no sangue que, quando presente em grandes quantidades, aumenta o risco de doenças coronárias. Uma parte dessa partícula consiste de fosfolípidios, colesterol e apolipoproteínas B-100, sendo idêntica à lipoproteína de baixa densidade (LDL), que transporta colesterol. A porção restante, apolipoproteína está ligada a apolipoproteína B-100 em um único ponto dando a essa partícula propriedades distintas.

As apolipoproteínas são classificadas pelas letras A, B, C, D e E. Elas são importantes para a solubilização dos lipídios bem como para a regulação do seu metabolismo, atuando como cofatores de enzimas e mediando a interação das lipoproteínas com receptores celulares, responsáveis pela remoção das partículas do plasma (Neyra, 1997). As lipoproteínas apresentam uma grande variabilidade no seu tamanho e na sua composição (Lippel *et al.*, 1987).

As lipoproteínas são classificadas em 5 grandes classes: quilomícrons, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL), (Gurr, 1986).

Os quilomícrons consistem de triacilgliceróis (~85%) e somente 2% de proteína. É a maior lipoproteína sendo a que apresenta a menor densidade. Por causa do seu tamanho, a sua presença no plasma pode ser facilmente reconhecida pela opalescência que causam.

Eles são os principais carreadores da gordura derivada da dieta. As VLDL formam uma classe menor em tamanho, com menos triacilgliceróis (~50%), 20% de colesterol e 20% de fosfolipídios. Elas são as principais carreadoras do triacilglicerol formado no fígado a partir de carboidrato. Uma outra classe, as HDL, ainda menor em tamanho, têm 50% de proteína, 20% de colesterol e 20% de fosfolipídios. Seu papel é transportar o excesso de colesterol das membranas para o fígado onde ele pode ser degradado ou convertido em ácidos biliares (Gurr, 1986).

Os quilomícrons desaparecem rapidamente do fluxo sanguíneo e após cerca de 10 minutos, somente uma parte permanece no sangue. Isso ocorre devido a separação dos ácidos graxos dos triacilgliceróis por ação da lipase lipoprotéica, liberada dentro dos capilares sanguíneos próximos ao tecido adiposo ou muscular. A atividade dessa enzima é controlada pela dieta e por hormônios. Após uma refeição contendo quantidades significativas de gordura e carboidrato, quando o suprimento de energia pode exceder à necessidade imediata do organismo, a secreção de insulina garante que a enzima esteja ativa. Os ácidos graxos são liberados dos triacilgliceróis dos quilomícrons e no tecido adiposo, sendo reincorporados em triacilgliceróis (Esfahani, 1990).

No sangue humano, a maior partícula carreadora de colesterol é a LDL. Ela consiste cerca de 2.000 moléculas de colesterol, 1.000 moléculas de fosfolipídios e uma grande proteína na superfície chamada apolipoproteína B-100. Altos níveis de LDL estão associados com elevados riscos das doenças coronarianas, tanto que é conhecido como “mau colesterol”. Já os níveis sanguíneos das lipoproteínas de alta densidade (HDL), conhecidas como “bom colesterol” estão inversamente associadas ao risco de doenças cardíacas (Lawn, 1992).

A LDL é originária principalmente da degradação das VLDL ricas em triacilgliceróis, mas podem também ser produzidas no fígado. A LDL é rica em colesterol (principalmente ésteres de colesterol) sendo responsável por cerca de 65% dos níveis de colesterol total do sangue. A LDL contém pequena quantidade de triacilgliceróis, mas grande quantidade de fosfolipídios e proteínas comparadas com as VLDL e os quilomícrons. O principal componente apolipoprotéico presente é a apo B-100, a qual é necessária para levar a LDL aos tecidos. As LDL circulam pelo sangue todo e podem

interagir com os receptores apo B e E (receptores de LDL) encontrados no fígado, músculo e células adiposas (Brown & Goldstein, 1984). O fígado é rico em receptores de LDL, e é o principal local que remove as LDL do sangue (Thomas & Holub, 1994). Além disso, existem outros mecanismos que não envolvem receptores ou mecanismos “scavenger” para a remoção da LDL nos vasos sanguíneos. Partículas de LDL modificadas podem também ser carregadas por macrófagos via mecanismo de receptor modificado (Steinberg *et al.*, 1989).

De acordo com Norum (1992), a quantidade e o tipo de gordura na dieta exercem efeitos nas concentrações lipídicas séricas. Os ácidos graxos saturados aumentam as concentrações de colesterol total sérico enquanto que os poliinsaturados, diminuem essas concentrações. Já o ácido oléico (monoinsaturado) e o ácido esteárico (saturado) são neutros. Os efeitos das gorduras saturadas no colesterol sérico são vistos somente com ácidos graxos saturados contendo cadeias curtas de 12, 14 e 16 átomos de carbono; todos aumentando o colesterol total, principalmente por aumento das concentrações de LDL. Os ácidos graxos de cadeias menores, influenciaram pouco a LDL sérica.

Sabe-se que os macrófagos acumulam ésteres de colesterol, e funcionam como precursores das células espumosas que são encontradas no início das lesões ateroscleróticas. A entrada das LDL modificadas é mediada por um receptor específico conhecido como receptor “scavenger”, que não é capaz de reconhecer a LDL na sua forma nativa. Estudos recentes sugerem que uma modificação oxidativa da LDL (LDLOx), ocorre *in vivo* e a tomada de LDLOx pelos macrófagos no espaço subendotelial funciona como um gatilho para a formação de células espumosas (aterogênese). Assim, substâncias que previnem a conversão de macrófagos em células espumosas, devido ao excesso de LDL modificada ou que acelerem a conversão de células espumosas em macrófagos por remoção do colesterol acumulado, são consideradas anti-aterogênicas (Kajikawa *et al.*, 1994).

As HDL são produzidas no fígado e em outros tecidos. Esta fração lipoprotéica é especialmente rica em proteínas e fosfolipídios, com pouco triacilgliceróis. A função da HDL é transportar o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado. Acredita-se que o colesterol levado para o fígado pelas HDL, seja excretado como ácidos biliares (Thomas & Holub, 1994). Sabe-se que as HDL reduzem os ésteres de colesterol celular nas células

espumosas. Acredita-se que a função anti-aterogênica das HDL envolve a capacidade de reduzir ésteres de colesterol celular nas células espumosas (Kajikawa *et al.*, 1994).

Kajikawa *et al.* (1994) investigaram o efeito das proteínas de soro e da caseína na formação das “células espumosas” e verificaram que houve inibição do acúmulo de ésteres de colesterol nos macrófagos, mais do que quando se utilizou a caseína. Esses efeitos foram atribuídos, principalmente, à lactoferrina.

As VLDL são partículas ricas em triacilgliceróis secretadas pelo fígado. A síntese de triacilgliceróis e fosfolípidios contidas na partícula acontecem no retículo endoplasmático e é regulada por vários fatores nutricionais e hormonais. Os substratos incluem os lipídios derivados da dieta e os ácidos graxos mobilizados do tecido adiposo, bem como carboidratos da dieta e álcool. A apoproteína B-100 e apo E são também sintetizadas no fígado, visto que foram identificadas em partículas VLDL antes de sua secreção para o sangue. As apo A e C encontradas nas VLDL são adquiridas primeiramente pela troca ou rede de transferência que ocorre durante a circulação (Khachadurian, 1990). A VLDL transporta cerca de 15% do colesterol encontrado no sangue (Thomas & Holub, 1994).

Após a secreção, os triacilgliceróis nas VLDL são hidrolisados pela lipase lipoprotéica de maneira similar à hidrólise dos quilomícrons. A partícula resultante, designada como lipoproteína de densidade intermediária (IDL), é relativamente rica em colesterol e apo E, mas pobre em triacilgliceróis e apo C. As IDL têm dois principais destinos metabólicos. Elas são retiradas do fígado via um receptor que reconhece a apo B e E, presumivelmente o mesmo receptor que reconhece a LDL, ou então são convertidas em LDL (Khachadurian, 1990).

2.7 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo estreitamento do lúmen das artérias grandes e médias, devido ao espessamento local da íntima (Davies & Woolf, 1993, citado por Neyra, 1997). Como o nome diz, ela é caracterizada pela presença

de um núcleo gorduroso (atero = um tumor contendo um material “gruel-like”) e rigidez de artéria (“esclerosis”) (Khachaturian, 1990). A hipótese mais amplamente aceita é que a aterosclerose é uma resposta imuno-inflamatória da íntima arterial à injúria, ocasionada por fatores extrínsecos, principalmente a hipercolesterolemia (Davies & Woolf, 1993, citado por Neyra, 1997).

A lesão aterosclerótica se desenvolve em vários estágios: inicialmente se formam as camadas de gordura, caracterizadas pelo acúmulo de colesterol em macrófagos residentes, convertendo-se em “foam cells” (células espumosas). A maioria dessas células espumosas, parecem surgir de macrófagos derivados de monócitos na íntima arterial. As camadas de gordura podem então se desenvolver dentro das placas fibrosas, consistindo em uma capa de tecido conectivo denso, cobrindo uma área que contém tipos diferentes de células, incluindo células espumosas, macrófagos, células de músculo liso e linfócitos T. Nesse estágio ocorre necrose das células espumosas, as células se debilitam e são depositados cristais de colesterol e lipídios extra-celulares. Os estágios finais da aterosclerose são caracterizados pela maturidade das placas fibrosas formadas pela contínua proliferação de células mioíntimas, espumosas e necrose de célula endotelial, hemorragia, trombose e deposição de cálcio (Balz, 1995).

Segundo Harris (1997) níveis de lipoproteína (LDL) acima de 300mg/dL aumentam de 2 a 5 vezes os riscos de desenvolver doenças coronarianas. Essa conclusão surge de inúmeros estudos onde encontramos uma correlação direta entre o aumento da lipoproteína (LDL) e o infarto precoce do miocárdio ou artéria coronária.

Os lipídios que se acumulam no desenvolvimento das lesões aterosclerótica contém principalmente o colesterol derivado da LDL-colesterol. Sabe-se que a LDL é a fração lipoprotéica mais aterogênica no sangue. Quando há um elevado nível de colesterol LDL, considera-se que existe um fator de risco significativo para doenças coronarianas. Ao contrário, considera-se a HDL anti-aterogênica por facilitar a passagem do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado e conseqüente excreção. Altos níveis de colesterol HDL protegem contra doenças coronarianas, enquanto que um baixo nível de colesterol HDL representa fator de risco. O melhor indicativo de risco para doenças do coração é o quociente LDL/HDL colesterol (Gordon *et al.*, 1989), que deve ser o menor possível.

As apolipoproteínas que se encontram na superfície das lipoproteínas do sangue, determinam o destino final das lipoproteínas individuais devido à sua interação com enzimas e receptores em várias células do corpo. A liberação das células no sangue se completa via interação da apo B na LDL com receptores de LDL em vários tecidos periféricos e no fígado. A apo B também representa fator de risco para doenças do coração (Sniderman, 1988). A presença de apo A1 na superfície da HDL pode ser responsável pelo papel protetor dessa lipoproteína. A razão apoB/apoA1 pode ser o melhor indicador de risco que a apo B sozinha (Thompson, 1984).

As discrepâncias dos resultados obtidos entre os vários investigadores se deve, em parte, às diferenças individuais e entre espécies e, também, ao grande número de variáveis nos constituintes da dieta. As dietas ricas em gordura animal ou colesterol podem produzir hipercolesterolemia e aterosclerose em certas espécies como coelhos, pombos e porcos, embora em ratos, cães e alguns primatas não humanos a resposta tenha sido bem menor (Khachadurian, 1990). Em porcos, macacos e coelho que receberam colesterol na dieta, encontrou-se um maior transporte de colesterol em LDL, enquanto nas espécies resistentes (ratos e cachorros) o colesterol é carregado em associação com as HDL (Stehbens, 1986).

O fator da dieta que pode influenciar os lipídios séricos é a proteína (Potter *et al.*, 1993). O tipo de proteína na dieta pode influenciar a concentração de colesterol sérico (Kritchevsky, 1995; Beyen, 1990, Carrol & Kurowska, 1995). Proteínas de origem animal, como a caseína, geralmente exerce um efeito hipercolesterolêmico e aterogênico quando comparada com proteínas vegetais, como a proteína de soja, em humanos e em uma variedade de modelos animais (Carrol, 1991). Contudo, diferentes proteínas de origem animal podem causar diferentes graus de hipercolesterolemia, por diferentes mecanismos (Lovati *et al.*, 1990). A proteína de soro de leite em substituição à caseína em formulados infantis, promoveu uma diminuição na concentração de colesterol sérico (Tseng *et al.*, 1990).

Nos coelhos não é necessário adicionar suplementos de colesterol para se obter uma resposta metabólica hipercolesterolêmica, ao contrário de ratos e porcos, em que a adição é necessária para se obter uma resposta colesterolêmica. Em revisão feita por Barth & Pfeuffer (1988) sobre proteína da dieta e aterogênese, encontra-se que onze de 13 estudos

feitos com indivíduos normais mostraram que a caseína e a proteína de soja não induziram diferenças nos níveis de colesterol sérico. Segundo esses pesquisadores até aquele momento, nenhuma hipocolesterolemia comprovadamente induzida por proteína havia sido observada em primatas, e em particular, em humanos em situações onde se utilizou metodologias nutricionais adequadas. Eles citam ainda o aparecimento de outra linha de pesquisa, na medida em que foi observado um aumento nas concentrações séricas de tiroxina após consumo de proteína de soja, maior do que aqueles observados após consumo de caseína.

De acordo com Potter (1995), o efeito hipocolesterolêmico apresentado pela proteína de soja já foi demonstrado em humanos e em modelos animais, mas ainda se investiga o mecanismo pelo qual isso ocorre. Dentre os possíveis mecanismos responsáveis por esse efeito encontra-se o aumento na excreção dos ácidos biliares, principalmente em ratos e coelhos. Como resultado disso, o colesterol vai sendo retirado do corpo. Nesse caso, há uma alteração no metabolismo hepático de colesterol para que se produza colesterol para aumentar a 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 das concentrações de colesterol sérico, particularmente da fração LDL. É evidente que a proteína de soja, seus aminoácidos e os constituintes não protéicos ou a combinação desses fatores alteram o colesterol sérico. Há indicações de que o mecanismo varie de acordo com o modelo animal e que o componente responsável reaja de modo diferente de acordo com a espécie. É provável que o efeito redutor de colesterol apresentado pela soja resulte da ação combinada de seus componentes (proteínas, aminoácidos e peptídios, saponinas, ácido fitico, inibidores de tripsina, fibras e isoflavonóides) promovendo uma situação em que o metabolismo de colesterol é alterado resultando na diminuição das concentrações séricas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Foram utilizados: concentrado protéico de soro doce (CSD); caseinato de sódio (CasNa) produzidos no ITAL, isolado protéico de soja (IPS) - SAMPROSOY 90 NB, Ceval Alimentos e caseína comercial (M. CASSAB).

3.1.1 Soro doce

Obtido pela coagulação da caseína pela renina (quimosina), processo utilizado na fabricação de queijo, subproduto conhecido como “soro doce”. Foi utilizado soro de leite, produzido experimentalmente na instalação piloto do TECNOLAT (ITAL).

3.1.2 Caseinato de sódio

Obtido na produção de soro ácido, pela precipitação da caseína no ponto isoeletrico (pH 4,6, 20°C).

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção experimental dos concentrados protéicos de soro ácido e soro doce (> 80% de proteína), do caseinato de sódio, do coágulo e da caseína.

Todo o processamento de concentração do soro foi efetuado em unidade de ultrafiltração instalada na Planta Piloto de Leite - TECNOLAT, ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas, SP) ilustrada na Figura 2. A matéria-prima, o leite tipo “B” foi obtido da Cooperativa de Produtores de leite da Região de Campinas, Jaguariúna, SP.

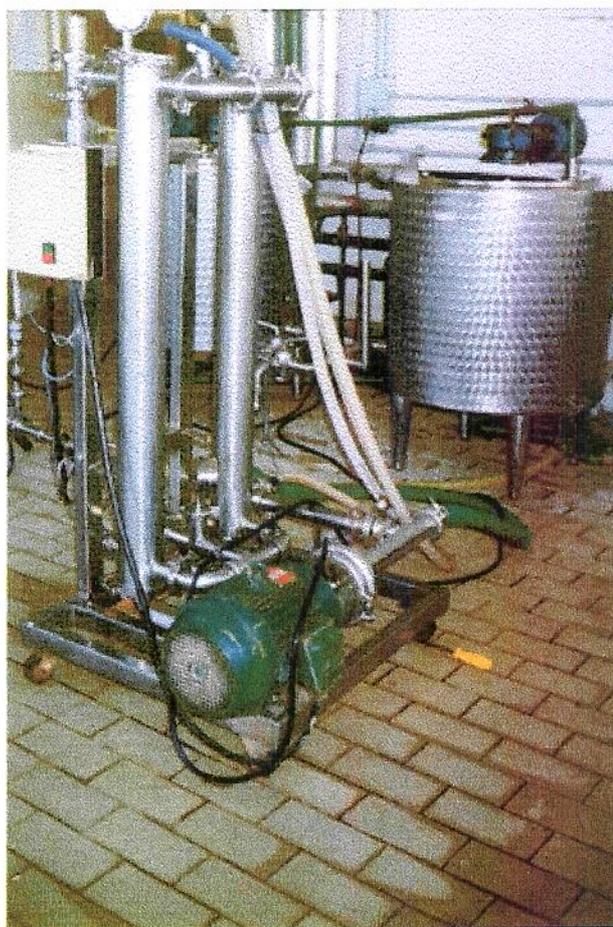


Figura 2 - Equipamento de ultrafiltração (WGM Equipamentos/KOCH Membrane Systems).

O leite foi recebido desnatado e pasteurizado, acondicionado em 8 galões de 50 litros cada, totalizando um volume inicial de 400 litros. O leite recebido era transferido para um tanque de camisa dupla (ou encamisado) de aço inox (com capacidade para 500 litros, da marca TQ-BIASINOX), passando previamente por dessorador, onde era homogeneizado e aquecido entre 30-35° C. Adicionava-se o coalho – renina (30mL/100L de leite) e solução de CaCl_2 50% (25mL CaCl_2 /100L de leite) e deixava-se em repouso por aproximadamente 40 minutos a 1 hora com o tanque fechado. O leite coagulado era então cortado com uma lira horizontal e vertical com 1 cm de espaço entre os fios. O soro era sifonado, e passado em dessorador sendo recolhido em torno de 325 litros de soro em tambores de 50 litros. O material obtido era pesado e transferido para um tanque de alimentação em aço inox (com

capacidade para 200 litros) onde era aquecido a 37° C. Esse material era ultrafiltrado por uma membrana de (5000 Da) atingindo-se um fator de concentração de 8 durante aproximadamente 3 horas e, então, diafiltrado (12 ciclos) em aproximadamente 5 horas. Cada ciclo de diafiltração, corresponde à passagem de um volume de água destilada igual ao retentado. Tanto a concentração quanto a diafiltração era controlada pela pesagem do permeado. A temperatura do equipamento era mantida entre 40 e 42° C, enquanto a pressão de entrada era de 5 psi e a de saída de 3 psi. Após o término do processamento, o material era recolhido e acondicionado em bandejas, sendo congelado em câmara fria a -20°C na FRUTOTHEC/ITAL/Campinas, onde permanecia até a liofilização, realizada na LIOTÉCNICA/SP. O material restante, o coágulo de caseína, era lavado, ressuspenso em água e seco por "spray dryer".

Para a produção do soro ácido, precipitou-se a caseína adicionando-se ácido láctico (2,5litros/400litros de leite) e a separação do soro se deu por sifonação e centrifugação. As demais condições de processamento foram iguais à do soro doce, diferindo apenas quanto ao tempo gasto na concentração e diafiltração, que foi duas vezes maior, partindo-se do mesmo volume inicial de soro. O material restante, o precipitado de caseína isoeletrica foi lavado e ressuspenso em solução de NaOH (pH 7,5). A solução de caseinato de sódio foi seca em spray dryer.

Cada processamento foi seguido de limpeza e higienização das membranas, constando das etapas: enxague e limpeza alcalina (NaOH 50%, pH 10,5); enxague e cloro alcalina (NaOH 50%, 180-200ppm de Cl₂, pH 10,5) seguida do enxague final. Todas as etapas foram efetuadas com água à temperatura entre 51 a 54°C. Ao final media-se o fluxo do permeado para verificar a eficiência da limpeza e a integridade da membrana.

A Figura 3 ilustra as operações envolvidas na obtenção experimental do concentrado protéico de soro doce e do caseinato de sódio.

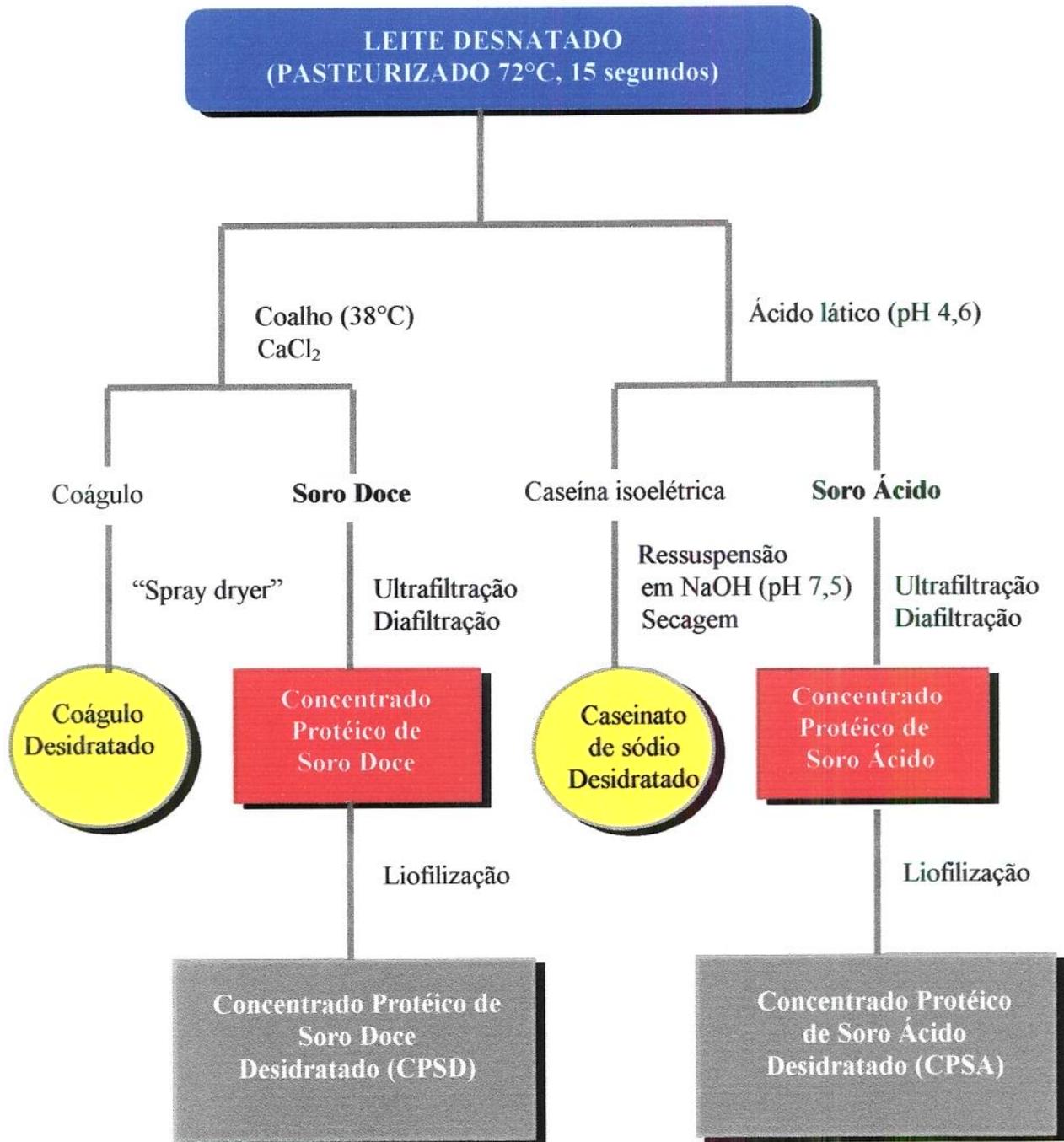


Figura 3 - Fluxograma para a obtenção dos concentrados protéicos de soro doce e ácido, do caseinato de sódio e do coágulo.

A pasteurização foi aplicada em condições que preservassem ao máximo as propriedades originais das proteínas, sendo necessária para a estabilização microbiológica do produto. Utilizaram-se 72°C por 15 segundos (HTST) porque assim os nutrientes e mesmo a integridade das proteínas são melhor preservados. O desnate foi feito por centrifugação a 35-40°C para facilitar o processo.

A concentração foi feita pela combinação de ultrafiltração e diafiltração. A ultrafiltração é uma operação em que se usa membranas ultrafiltrantes, sob pressão, projetadas para reter partículas de vários tamanhos. No caso de soro de leite as membranas deverão reter moléculas com peso superior a 10 kD. Para se obter a concentração e o grau de pureza desejados, após a ultrafiltração, faz-se a diafiltração. Adicionando-se água continuamente à corrente de retentado, a diafiltração aumenta a concentração de proteína aumentando a eficiência de eliminação de lactose e minerais.

Após a concentração, a desidratação do soro foi feita por liofilização.

3.2.2 Caracterização química dos concentrados protéicos de soro de leite e do caseinato de sódio

Composição centesimal:

- **Proteína**

Determinada pelo método de semi-micro Kjeldahl da “Association of analytical chemists – AOAC” (1990). O método se baseia na digestão da matéria orgânica até a completa oxidação de carbono e hidrogênio e redução do nitrogênio protéico que é retido sob a forma de sulfato de amônio. A amônia liberada do material digerido após adição de solução de NaOH concentrada e aquecida, é recolhida em um volume conhecido de solução ácida (após destilação, a amônia é recolhida em ácido bórico). O excesso é titulado com

solução ácida padronizada (HCl diluído). Para transformação de N em proteína foi utilizado o fator 6,38.

- **Lipídios totais**

Método de Bligh-Dyer (1959). Neste método, a amostra é homogeneizada com uma mistura de clorofórmio e metanol em proporção tal que um sistema miscível (monofásico) é formado com a água da amostra. Com volumes determinados de clorofórmio e água há separação do sistema monofásico em duas camadas, formando um sistema bifásico: a camada clorofórmica, mais pesada, contendo os lipídios, e a camada metanólica, contendo água e os compostos não-lipídicos. Desta forma, é obtido um extrato lipídico purificado, quando a camada de clorofórmio é isolada. É necessário que as proporções entre os volumes de clorofórmio, metanol e água, sejam de 1:2:0,8 e 2:2:1,8, antes e após a diluição, respectivamente. Este método apresenta vantagens em relação aos outros métodos: todas as classes de lipídios são extraídas, polares e apolares, pois o clorofórmio é um solvente orgânico para qualquer classe de lipídios, e o metanol têm a função dupla de facilitar a extração da amostra e desfazer as ligações lipídios-proteínas (Loverne, 1965); a extração é realizada sem aquecimento, podendo os lipídios extraídos ser utilizados para qualquer tipo de determinação, sem alterações químicas e físicas; o método independe da umidade da amostra.

- **Lactose**

Determinada de acordo com metodologia de Acton (1977). Fundamenta-se na reação do extrato aquoso filtrado com fenol e ácido sulfúrico concentrado, com formação de compostos coloridos. A intensidade do complexo colorido é dependente da temperatura alcançada durante a adição de ácido sulfúrico. Recomenda-se adicionar o ácido sulfúrico lentamente para que não haja aquecimento rápido da amostra, nem alteração na absorbância. A intensidade do complexo colorido é também dependente da razão inicial desse resfriamento.

- **Resíduo mineral (cinzas)**

Foi determinado por meio de incineração das amostras em mufla à temperatura de 450°C, segundo o método da AOAC (1990).

- **Umidade**

Foi feita por secagem das amostras em estufa a 105°C até peso constante (AOAC, 1990). Os sólidos totais foram obtidos pela diferença entre o peso total da amostra e o conteúdo em umidade.

- **Determinação de aminoácidos**

Feita mediante hidrólise ácida com utilização de HCl 6N, por 22 horas, a 110° C e à vácuo, com exceção do triptofano, determinado segundo metodologia de Spies (1967). Após a hidrólise efetuou-se a filtração em membranas de 0,45µ, transferindo-se o filtrado para um balão volumétrico (50mL) e completando-se o volume com água Milli Q. Uma alíquota do hidrolisado foi diluída, seca em rotavapor (vácuo) e redissolvida em tampão de Pickering pH 2,2. Os aminoácidos foram separados em analisador Dionex em coluna de troca catiônica e quantificados após derivatização pós-coluna com ninidrina, usando-se como referência solução padrão de aminoácidos de Pierce (Spackman *et al.*, 1958).

- **Solubilidade**

Feita com a finalidade de avaliar o grau de desnaturação da proteína. Utilizou-se o método de Morr *et al.* (1985) que é uma modificação do procedimento do índice de solubilidade do nitrogênio. A proteína solúvel foi determinada pelo método semimicro de Kjeldahl (AOAC, 1990).

3.2.3 Ensaio Biológico

- **Animais de experimentação**

Utilizaram-se ratos machos da linhagem Wistar, recém-desmamados e de 57 dias, para o primeiro e o segundo ensaio, respectivamente, livres de patógenos específicos (SPF), provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Unicamp, S.P. Todos os animais foram transportados para o Biotério do ITAL, no período da manhã, em caixas plásticas apropriadas para ratos. Em cada caixa foram transportados, no máximo, 10 animais. O Biotério em questão é do tipo convencional sendo utilizadas, como barreiras de contaminação, a desinfecção sistemática da área física, bem como das gaiolas, bebedouros, comedouros e utensílios utilizados para o manejo de dietas.

Após a chegada dos animais ao biotério, efetuou-se a pesagem e os ratos foram separados em 4 grupos de maneira que não houvesse diferença nos valores de pesos médios entre os grupos. Nos tratamentos os grupos foram aleatoriamente distribuídos. A seguir, os animais foram colocados em gaiolas individuais para crescimento, sendo a temperatura ambiente mantida em $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a luminosidade programada para 12 horas de claro e 12 horas de escuro, durante todo o experimento. Dietas e água foram fornecidas *ad libitum*. Os bebedouros foram higienizados a cada 2 dias e o controle da ingestão das dietas foi efetuado mediante pesagem sistemática.

- **Tratamentos**

Utilizaram-se 4 dietas: CSD (Concentrado protéico de Soro Doce), IPS (Isolado Protéico de Soja), CasNa (Caseinato de Sódio) e CC (Caseína Comercial), esta última como referência.

Todas as dietas foram isoprotéicas, isocalóricas e hipercolesterolêmicas pela substituição do óleo vegetal (AIN-93 G) por 6% de gordura de coco e 1% de colesterol. Os

demais nutrientes foram aqueles recomendados pela AIN-93 G modificada, para crescimento de roedores, segundo Tabelas 1 e 2 (Reeves *et al.*, 1993).

Foram feitos 2 ensaios, com 20 e 30% de proteína, respectivamente, sendo que os tratamentos só diferiram entre si quanto à fonte de proteína. Os animais utilizados foram recém-desmamados e de 57 dias, respectivamente.

- **Composição das dietas experimentais**

A caseína comercial utilizada continha 84,3% de proteína bruta. A fração carboidrato da dieta foi fornecida por amido de milho comercial. Utilizou-se gordura de coco comercial e colesterol (Vetec).

A mistura de minerais foi preparada no ITAL, colocada em embalagem apropriada e mantida em freezer até utilização. A mistura de vitaminas foi gentilmente doada pela ROCHE, SP.

Tabela 1 – Formulações utilizadas no primeiro ensaio com ratos Wistar, para os diferentes tratamentos (g/kg/dieta) baseado nas recomendações da AIN-93 G (Reeves *et al.*, 1993).

| Componentes | AIN-93 G | Tratamentos* | | | |
|------------------------|----------|--------------|--------|--------|--------|
| | | CSD | IPS | CC | CasNa |
| Amido | 397,48 | 389,0 | 380,30 | 352,0 | 381,0 |
| Fonte protéica | 200,0 | 247,54 | 226,46 | 245,52 | 277,39 |
| Amido dextrinizado | 132,0 | 132,0 | 132,0 | 132,0 | 132,0 |
| Sacarose | 100,0 | 78,83 | 100,0 | 100,0 | 48,16 |
| Gordura de coco | 60,0 | 49,31 | 59,0 | 60,0 | 55,68 |
| Colesterol | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| Fibra | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 |
| Minerais | 35,0 | 28,38 | 27,35 | 35,0 | 30,84 |
| Vitaminas | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| L-cistina | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 |
| Bitartarato de colina | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Tert-butilhidroquinona | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,014 |

* Dietas contendo 20% da fonte protéica.

Recomendações calculadas tendo em base a utilização de caseína com 85% de proteína.

CSD: Concentrado Protéico de Soro Doce, IPS: Isolado Protéico de Soja, CasNa: Caseinato de Sódio, CC: Caseína Comercial.

Tabela 2 – Formulações utilizadas no segundo ensaio com ratos Wistar, para os diferentes tratamentos (g/kg/dieta) com base nas recomendações da AIN-93 G (Reeves *et al.*, 1993).

| Componentes | AIN-93 G | Tratamentos* | | | |
|------------------------|----------|--------------|--------|--------|--------|
| | | CSD | IPS | CC | CasNa |
| Amido | 397,48 | 186,41 | 173,28 | 131,71 | 174,39 |
| Fonte protéica | 200,0 | 371,31 | 339,69 | 368,28 | 416,08 |
| Amido dextrinizado | 132,0 | 132,0 | 132,0 | 132,0 | 132,0 |
| Sacarose | 100,0 | 118,24 | 150,0 | 150,0 | 72,24 |
| Gordura de coco | 60,0 | 73,96 | 88,5 | 90,0 | 83,52 |
| Colesterol | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| Fibra | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 |
| Minerais | 35,0 | 42,57 | 41,02 | 52,5 | 46,26 |
| Vitaminas | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| L-cistina | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 |
| Bitartarato de colina | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Tert-butilhidroquinona | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,014 |

* Dietas contendo 30% da fonte protéica.

- CSD: Concentrado Protéico de Soro Doce, IPS: Isolado Protéico de Soja, CasNa: Caseinato de Sódio, CC: Caseína Comercial.

Nas Tabelas 3 e 4 encontram-se descritas as recomendações de vitaminas e minerais para animais em crescimento, segundo a AIN-93 G (Reeves *et al.*, 1993).

Tabela 3 - Mistura mineral (AIN-93 G - MX) que supre as concentrações recomendadas de elementos para a dieta AIN-93G.

| Componentes | Quantidades |
|---|--------------|
| Elementos minerais essenciais: | |
| | g/kg mistura |
| Carbonato de cálcio anidro - 40,04 % de Ca | 357,00 |
| Fosfato de potássio monobásico - 22,76% de P, 28,76% de K | 196,00 |
| Citrato de potássio, tripotássio monoidratado - 36,16 de K | 70,78 |
| Cloreto de sódio - 39,34% de Na, 60,66% de Cl | 74,00 |
| Sulfato de potássio - 44,87% de K, 18,39% de S | 46,60 |
| Óxido de magnésio - 60,32% de Mg | 24,00 |
| Citrato férrico - 16,5% de Fe | 6,06 |
| Carbonato de zinco - 52,14% de Zn | 1,65 |
| Carbonato manganoso - 47,79% de Mn | 0,63 |
| Carbonato cúprico - 57,47% de Cu | 0,30 |
| Iodato de potássio - 59,3 % de I | 0,01 |
| Selenato de sódio anidro - 41,79% de Se | 0,01025 |
| Paramolibdato de amônio, 4 H ₂ O - 54,34% de Mo | 0,00795 |
| Elementos minerais potencialmente benéficos: | |
| Meta-silicato de sódio, 9 hidrato, 9,88% de Si | 1,45 |
| Sulfato de cromo e potássio, 12 H ₂ O - 10,42% de Cr | 0,275 |
| Cloreto de lítio - 16,38% de Li | 0,0174 |
| Ácido bórico - 17,5% de B | 0,0815 |
| Fluoreto de sódio - 45,24% de F | 0,0635 |
| Carbonato de níquel - 45% de Ni | 0,0318 |
| Vanadato de amônio - 43,55% de V | 0,0066 |
| Sacarose (q.s.p.) | 221,026 |

- Fonte: Reeves *et al.* (1993).

Tabela 4 - Mistura vitamínica (AIN-93-VX) que supre as concentrações recomendadas de vitaminas para as dietas AIN-93 G.

| Componentes | Quantidades |
|---|--------------|
| | g/kg mistura |
| Ácido nicotínico | 3,000 |
| Pantotenato de Ca | 1,600 |
| Piridoxina-HCl | 0,700 |
| Tiamina-HCl | 0,600 |
| Riboflavina | 0,600 |
| Ácido Fólico | 0,200 |
| D-Biotina | 0,020 |
| Vitamina B12 (cianocobalamina) - 0,1% de manitol | 2,500 |
| Vitamina E (acetato de tocoferol) - 500 UI/g | 15,000 |
| Vitamina A (Retinil palmitato) - 500.000 UI/g | 0,800 |
| Vitamina D ₃ (colecalfiferol) - 400.000 UI/g | 0,250 |
| Vitamina K | 0,075 |
| Sacarose (q.s.p.) | 974,655 |

- Fonte: Reeves *et al.* (1993).

Delineamento Experimental

Primeiro Ensaio

Utilizaram-se 106 animais, dos quais 10 foram separados para a obtenção dos valores utilizados como referência (T0) e os demais divididos em 4 grupos contendo, cada um, 24 ratos com 21 dias. Nos tempos de 15, 30, 45 e 60 dias foram sacrificados 6 animais de cada tratamento e efetuadas as dosagens de colesterol total e triacilgliceróis no fígado e no soro e proteína sérica total, segundo o fluxograma da Figura 4. O primeiro ensaio teve a duração de 60 dias. A quantidade de dieta foi calculada levando-se em conta um consumo hipotético diário, por animal, de 15 gramas. Os ingredientes foram pesados e as dietas preparadas, acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em freezer (-14°C), durante todo o experimento.

Segundo Ensaio

Após a coleta dos dados e verificação dos resultados do primeiro ensaio, realizou-se um segundo ensaio de 45 dias.

Utilizaram-se 123 animais, dos quais 15 foram sacrificados para a obtenção dos valores utilizados como referência (T0) e os demais divididos em 4 grupos de 27 animais. Os animais foram iniciados nos tratamentos dietéticos aos 57 dias de idade. Até então, todos animais receberam ração comercial (Nuvital) autoclavada à 120°C durante 40 minutos. A Figura 5 ilustra o delineamento experimental utilizado.

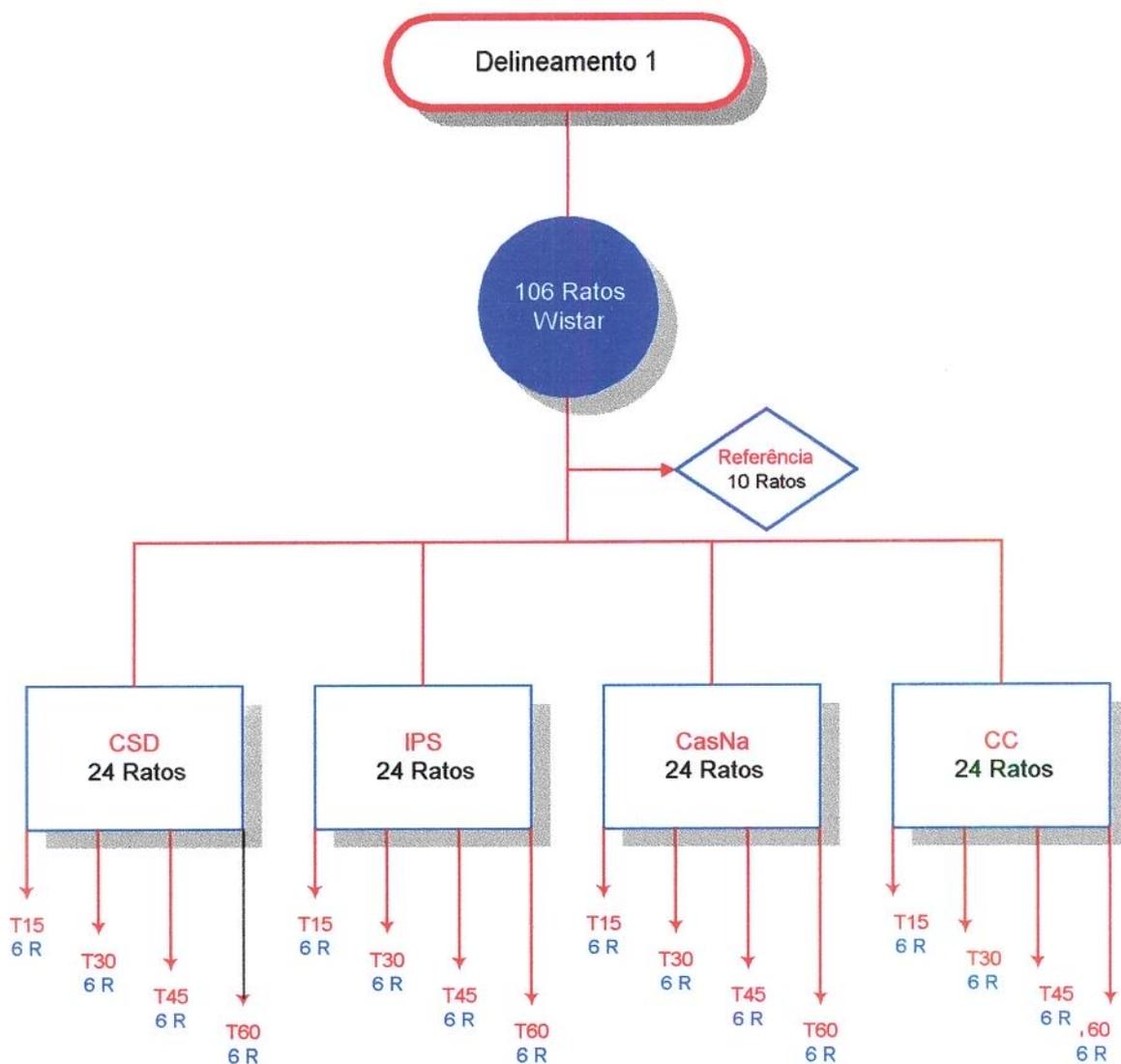


Figura 4 - Delineamento experimental do primeiro ensaio, utilizando ratos machos Wistar recém-desmamados, sacrificados aos 15, 30, 45 e 60 dias para os diferentes tratamentos CSD: Concentrado Protéico de Soro Doce, IPS: Isolado Protéico de Soja, CasNa: Caseinato de Sódio, CC: Caseína Comercial.

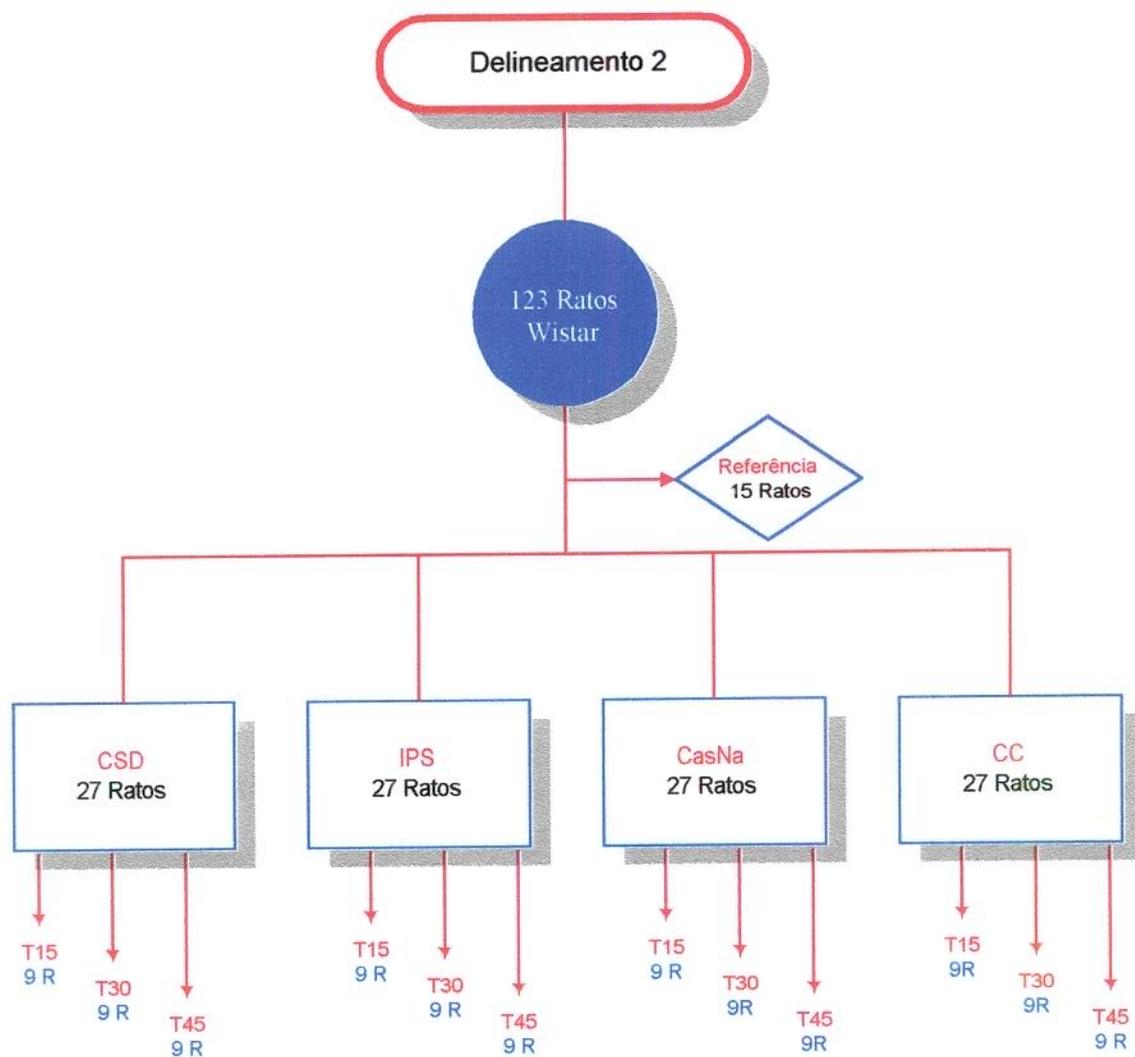


Figura 5 - Delineamento experimental do segundo ensaio utilizando ratos machos Wistar, sacrificados aos 15, 30 e 45 dias para os diferentes tratamentos. CSD: Concentrado Protéico de Soro Doce, IPS: Isolado Protéico de Soja, CasNa: Caseinato de Sódio, CC: Caseína Comercial.

Determinações no soro sanguíneo e no fígado

A coleta de sangue foi feita após 16 horas de jejum. Os animais foram anestesiados com éter etílico PA - ACS (Casa Americana) e as amostras de sangue foram coletadas por punção do plexo braquial com pipetas de Pasteur e colocadas em tubos de ensaio de 5 mL. Após coagulação total do sangue, os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria a 37°C por 15 minutos e em banho de gelo a 4°C por 15 minutos para retração do coágulo e separação do soro. O soro foi coletado com pipeta Pasteur e transferido para tubos de centrifuga. O material foi centrifugado em centrífuga REVAN Ciclo I por 15 minutos a 3.000 rpm. Coletou-se o sobrenadante em Ependorf previamente rotulado, do qual eram retiradas as alíquotas necessárias para cada análise.

Após sangria, efetuou-se deslocamento cervical no animal, sendo o fígado retirado, pesado e colocado em solução salina a 0,8% de NaCl (p/v). Preparou-se uma suspensão de células (10% p/v) mediante maceração do fígado em álcool isopropílico PA - ACS (Synth). A suspensão foi transferida para tubo de centrifuga permanecendo em repouso por 48 horas sob refrigeração. Posteriormente efetuou-se centrifugação em centrífuga BECKMAN-AVANTIS-25, por 15 minutos, a 3.000 rpm. Coletou-se o sobrenadante em recipientes plásticos com tampa previamente rotulados, dos quais eram retiradas as alíquotas necessárias para cada análise. Todas as determinações foram feitas em duplicata.

Efetuaram-se as seguintes análises:

- **Colesterol total** (Abell *et al.*, 1952) - Feito pela reação de Lieberman-Buchard, utilizando Kits da Laborlab.
- **Triacilgliceróis** (Fossati & Prencipe, 1982) - Feito pelo método totalmente enzimático, com utilização de Kits da Laborlab.
- **Proteína total** (Bradford, 1976) - consiste em quantificar a ligação de uma proteína ao corante *Comassie Brillante Blue* e comparar esta ligação a diferentes quantidades de uma

proteína padrão, geralmente albumina sérica bovina. Este micrométodo é indicado para valores menores que 1µg de proteínas. Na faixa de 1 a 10µg ou de 10 a 100µg a dosagem deve ser feita aumentando-se o volume da solução de corante e da solução de proteínas em 5 ou em 25 vezes, respectivamente.

Determinação do Quociente de Eficiência Protéica (PER)

O PER mede o quociente do ganho de peso em gramas pela quantidade de proteína ingerida em gramas, de um grupo de ratos recém-desmamados submetidos a uma dieta contendo 10% (p/p) da proteína em estudo. Esse é o método oficial usado como método controle nos Estados Unidos e por isso encontra-se descrito na AOAC, citado por Sgarbieri (1996).

É necessário ressaltar que as dietas, no primeiro ensaio, continham 20% de proteínas, 6% de gordura de coco e 1% de colesterol. Como houve utilização de uma quantidade de proteína maior que aquela preconizada para os cálculos desse índice (dieta com apenas 10% de proteína), considera-se como sendo valores operacionais modificados, a serem calculados utilizando-se a fórmula:

$$PER_{op} \text{ modificado} = \frac{\text{Ganho de Peso (g)} + 0,1 [\text{Peso Inicial (g)} + \text{Peso Final (g)}]}{\text{Proteína consumida (g)}}$$

Este índice, segundo Sgarbieri (1996) é utilizado como uma tentativa de corrigir o PER, quando a concentração de proteína na dieta excede ao recomendado para o cálculo de PER. O fator 0,1 x (peso inicial mais peso final) do grupo experimental dá resultados semelhantes em magnitude à perda do grupo na dieta aprotéica.

3.2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa “Statistica: Basic Statistics and Tables”. 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).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização química dos produtos utilizados nos ensaios com ratos Wistar.

4.1.1 Composição centesimal e solubilidade

A Tabela 5 apresenta a composição centesimal e os valores de solubilidade verificados para o concentrado protéico de soro doce e o caseinato de sódio produzidos no ITAL e para o isolado protéico de soja e caseína comerciais.

Tabela 5 - Composição centesimal e valor de solubilidade encontrados para os produtos CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio); CC (caseína comercial).

| Fonte Protéica | Caracterização (%) | | | | | |
|------------------|--------------------------|----------------|---------------------|----------|--------|---------|
| | Solubilidade da proteína | Sólidos Totais | Proteína (N x 6,38) | Lipídios | Cinzas | Lactose |
| CSD | 93,09 ¹ | 96,37 | 83,84 | 4,48 | 2,77 | 8,87 |
| CasNa | 98,20 ² | 93,85 | 76,82 | 1,66 | 9,01 | 19,91 |
| IPS ³ | 93,50 | 96,00 | 92,00 ⁴ | 0,50 | 4,00 | - |
| CC ³ | 92,00 | 88,10 | 84,30 | 1,40 | 3,50 | - |

- CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio) e CC (caseína comercial).

- Valores expressos em base seca como gramas por 100 gramas de produto.

¹ Solubilidade em tampão citrato-fosfato em pH 4,6.

² Solubilidade em água destilada com pH ajustado para 7,0.

³ Dados analíticos fornecidos pelo fabricante.

⁴ Fator de conversão do N para proteína = 6,25.

4.1.2 Perfil de aminoácidos das quatro fontes protéicas usadas nos ensaios com ratos Wistar.

A composição em aminoácidos das quatro fontes protéicas utilizadas, comparadas com a referência (teórica) da FAO/WHO, são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição em aminoácidos (g/100g de proteína) do concentrado protéico de soro doce (CSD), do caseinato de sódio (CasNa), isolado protéico de soja (IPS), da caseína comercial (CC), comparados os perfis de aminoácidos essenciais com a referência teórica da FAO/WHO*.

| Aminoácidos | Fonte protéica | | | | FAO/WHO* (teórico) |
|-----------------------------|----------------|-------|------------------|-----------------|-----------------------|
| | CSD | CasNa | IPS ¹ | CC ¹ | |
| Ác. Aspártico | 9,55 | 6,32 | 8,00 | 7,17 | - |
| Treonina | 6,40 | 3,61 | 3,60 | 4,15 | 3,4 |
| Serina | 5,14 | 5,17 | 5,70 | 5,93 | - |
| Ác. Glutâmico | 16,56 | 19,72 | 20,4 | 21,87 | - |
| Prolina | 5,55 | 9,07 | 5,30 | 9,97 | - |
| Glicina | 1,66 | 1,52 | - | 1,80 | - |
| Alanina | 4,42 | 2,56 | 4,20 | 3,03 | - |
| Valina | 5,04 | 5,33 | 4,50 | 6,16 | 3,5 |
| Metionina + cistina | 3,43 | 2,80 | 2,10 | 2,17 | 2,5 |
| Isoleucina | 5,29 | 4,00 | 4,30 | 4,62 | 2,8 |
| Leucina | 9,81 | 7,97 | 7,80 | 8,87 | 6,6 |
| Fenilalanina + tirosina | 6,15 | 8,85 | 9,50 | 9,92 | 6,3 |
| Lisina | 9,27 | 5,08 | 6,50 | 7,67 | 5,8 |
| Histidina | 5,15 | 5,95 | 2,70 | 2,84 | 1,9 |
| Triptofano | 1,12 | 0,92 | 1,00 | 1,40 | 1,1 |
| Arginina | 1,45 | 1,96 | 8,00 | 1,96 | - |
| Escore Químico ² | 0,98 | 0,87 | 0,84 | 0,87 | - |

¹ - Valores da literatura.

² - Escore químico calculado: fenilalanina + tirosina (CSD); lisina (CasNa); metionina + cistina (IPS e CC).

* FAO/WHO, 1990.

Os aminoácidos são requeridos para a síntese de proteína corpórea e outros compostos importantes contendo nitrogênio tais como creatina, hormônios e alguns neurotransmissores (Steele & Harper, 1990).

As proteínas de soro de leite estão sendo cada vez mais usadas com propósito nutricional, por apresentarem altos escores em testes tradicionais de qualidade protéica. Além disso, os teores de aminoácidos essenciais e de aminoácidos de cadeia ramificada encontrados nas proteínas de soro de leite são superiores àqueles da maioria das proteínas conhecidas. Seu perfil de aminoácidos assemelha-se com o do leite humano, podendo ser utilizado em fórmulas infantis e em substitutos do leite em virtude dessa semelhança (Smithers, *et al.*, 1996). Os escores químicos (Tabela 6), mostraram que apenas o CSD atende totalmente o padrão teórico da FAO/WHO (1990), para crianças de 1 a 5 anos. A Cas Na mostra-se limitante em lisina (EQ 87%), o IPS e a CC apresentaram-se limitantes em sulfurados totais (EQ 84%).

4.2 Primeiro Ensaio

4.2.1 Ganho de Peso e Ingestão de dieta

Ratos Wistar, recém-desmamados, foram alimentados por 60 dias com dietas preparadas com as distintas fontes protéicas, mas com o mesmo tipo e quantidade de gordura. O aspecto saudável dos animais mostrou que tanto o estado sanitário como o manejo dos animais foram eficientes e que a natureza dos lipídios e a presença do colesterol na dieta não modificou, aparentemente, a saúde dos mesmos. Os valores obtidos de consumo de dieta e ganho de peso encontram-se na Tabela 7.

Analisando esses dados, verifica-se que os animais não exibiram em todos os tratamentos dietéticos um consumo de dieta e ganho de peso corporal similares, apresentando variações no decorrer do experimento.

Ao final de 15 dias, os animais que receberam a dieta CasNa ganharam menos peso embora a quantidade de proteína consumida não tenha sido diferente. O CSD, o IPS e a CC foram as dietas que mais promoveram ganho de peso por unidade de consumo de proteína.

Tabela 7 - Consumo de dieta, consumo de proteína, ganho de peso e ganho de peso por proteína ingerida (média \pm desvio padrão) de ratos Wistar, após 15, 30, 45 e 60 dias, nas dietas.

| Parâmetro medido em diferentes períodos (dias) | Tratamentos | | | |
|--|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | CSD | IPS | CasNa | CC |
| 0 - 15 | | | | |
| CD (g) | 242,23 \pm 7,15 ^b | 258,27 \pm 10,90 ^a | 264,17 \pm 5,77 ^a | 262,40 \pm 4,96 ^a |
| CP (g) | 48,45 \pm 1,43 ^b | 51,65 \pm 2,18 ^a | 52,83 \pm 1,15 ^a | 52,48 \pm 0,98 ^a |
| GP (g) | 78,99 \pm 16,97 ^{ab} | 64,73 \pm 10,17 ^{ab} | 56,13 \pm 10,73 ^b | 85,52 \pm 10,32 ^a |
| GP/CP | 1,62 \pm 0,31 ^a | 1,26 \pm 0,23 ^{ab} | 1,06 \pm 0,22 ^b | 1,63 \pm 0,20 ^a |
| 16 - 30 | | | | |
| CD (g) | 240,77 \pm 23,66 ^b | 285,42 \pm 21,29 ^{ab} | 290,80 \pm 9,69 ^{ab} | 327,10 \pm 47,37 ^a |
| CP (g) | 48,15 \pm 4,73 ^b | 57,08 \pm 4,26 ^{ab} | 58,15 \pm 1,93 ^{ab} | 65,41 \pm 9,47 ^a |
| GP (g) | 61,19 \pm 7,51 ^c | 113,51 \pm 18,21 ^b | 144,47 \pm 8,92 ^a | 81,72 \pm 12,20 ^c |
| GP/CP | 1,28 \pm 0,21 ^b | 1,99 \pm 0,30 ^a | 2,48 \pm 0,095 ^a | 1,28 \pm 0,34 ^b |
| 31 - 45 | | | | |
| CD (g) | 332,30 \pm 31,18 ^b | 407,00 \pm 21,72 ^a | 420,25 \pm 28,82 ^a | 407,50 \pm 26,30 ^a |
| CP (g) | 66,45 \pm 6,23 ^b | 81,89 \pm 4,59 ^a | 84,05 \pm 5,76 ^a | 81,50 \pm 5,26 ^a |
| GP (g) | 23,34 \pm 4,41 ^b | 31,77 \pm 5,10 ^b | 46,63 \pm 5,97 ^a | 23,26 \pm 5,81 ^b |
| GP/CP | 0,35 \pm 0,09 ^b | 0,39 \pm 0,05 ^b | 0,55 \pm 0,03 ^a | 0,28 \pm 0,06 ^b |
| 46 - 60 | | | | |
| CD (g) | 296,05 \pm 18,77 ^a | 326,67 \pm 27,04 ^a | 330,37 \pm 25,62 ^a | 348,65 \pm 84,21 ^a |
| CP (g) | 59,20 \pm 3,75 ^b | 65,33 \pm 5,41 ^{ab} | 66,07 \pm 5,12 ^{ab} | 74,72 \pm 11,01 ^a |
| GP (g) | 65,27 \pm 6,81 ^b | 73,02 \pm 6,96 ^{ab} | 76,55 \pm 9,21 ^{ab} | 82,02 \pm 7,95 ^a |
| GP/CP | 1,10 \pm 0,13 ^a | 1,12 \pm 0,18 ^a | 1,15 \pm 0,08 ^a | 1,11 \pm 0,21 ^a |

- CSD (concentrado protéico de soro doce), IPS (isolado protéico de soja), CasNa (caseinato de sódio), CC (caseína comercial), CD (consumo de dieta), CP (consumo de proteína), GP (ganho de peso), GP/CP (ganho de peso/consumo de proteína).
- Médias obtidas com 4 animais; médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o período de 16-30 dias, o CasNa foi o tratamento que promoveu o maior ganho de peso, bem como a maior relação entre ganho de peso e proteína consumida, seguido pelo IPS. De 31-45 dias, houve uma diminuição drástica no ganho de peso para todos os tratamentos, embora o consumo de dieta tenha aumentado. Como consequência, houve também uma queda na relação do ganho de peso e proteína consumida. Nos últimos 15 dias verificou-se um maior ganho de peso para todos os tratamentos sendo que, o CasNa e o IPS apresentaram os maiores valores, diferindo dos demais.

A Figura 6 representa os valores médios de ganho de peso (g) para ratos Wistar nos vários tratamentos em 60 dias de experimento.

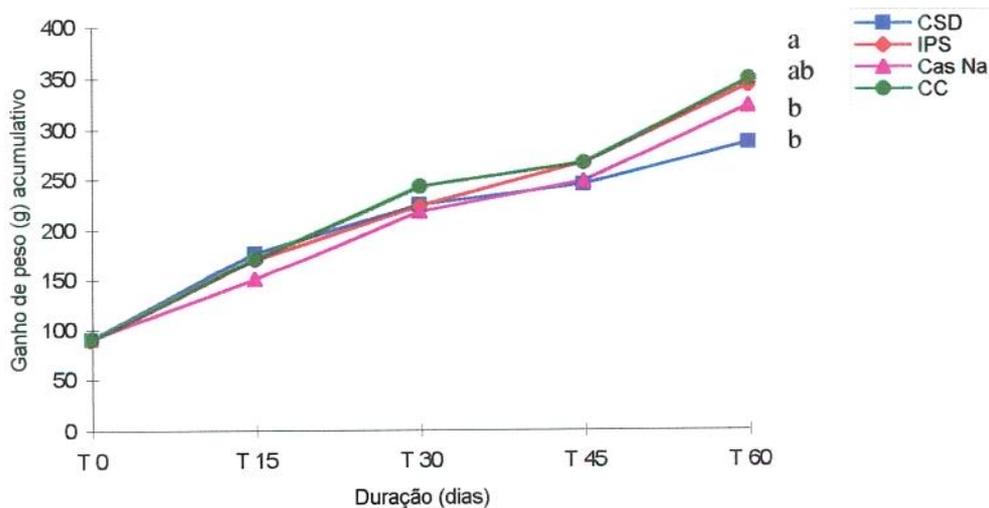


Figura 6 - Valores médios de ganho de peso (g) para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa) e caseína comercial (CC).

Analisando a Figura 6, observamos que a CC apresentou um maior ganho de peso ao final de 60 dias de experimento, enquanto que o CSD e o Cas Na não diferiram estatisticamente entre si, apresentando um menor ganho de peso, que a CC e o IPS.

Os valores médios dos quocientes GP/CP, aos 30 e aos 60 dias, para os vários tratamentos, são apresentados graficamente na Figura 7.

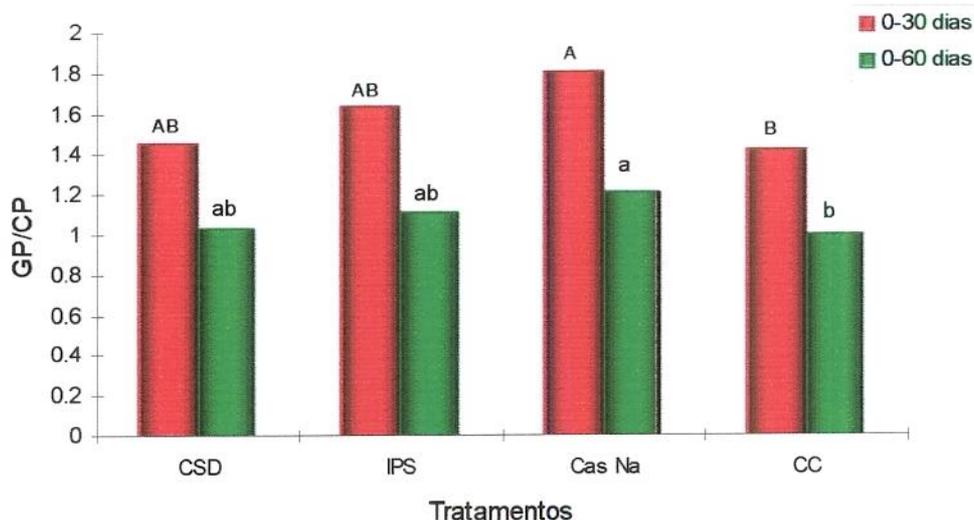


Figura 7 - Valores médios de ganho de peso por consumo de proteína (GP/CP) para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa) e caseína comercial (CC), computados aos 30 e aos 60 dias nas dietas.

De acordo com a Figura 7, o ganho de peso por consumo de proteína (GP/CP) tanto de 0-30 dias quanto de 0-60 dias de experimento, não diferiu estatisticamente para as dietas de CSD e IPS. A dieta de CC mostrou-se inferior ao CasNa tanto aos 30 como aos 60 dias mas não diferiu estatisticamente das demais dietas.

4.2.2 Quociente de Eficiência Protéica Operacional (PER_{Op}), modificado.

Não é muito fácil conceituar a qualidade protéica. A capacidade que uma proteína tem de suprir o organismo em seus requerimentos de nitrogênio e aminoácidos depende de sua composição em aminoácidos e também da digestibilidade da proteína, composição da dieta, da saúde e do “status” fisiológico e nutricional do animal que a consome. Outro fator

complicador é a habilidade que os animais têm para reutilizar os aminoácidos na síntese protéica (Walker, 1983). No cálculo desse índice, introduziu-se uma correção (ver Materiais e Métodos) como forma de compensar pelo excesso de proteína na dieta. Os valores obtidos para o PERop (modificado) são mostrados na Figura 8.

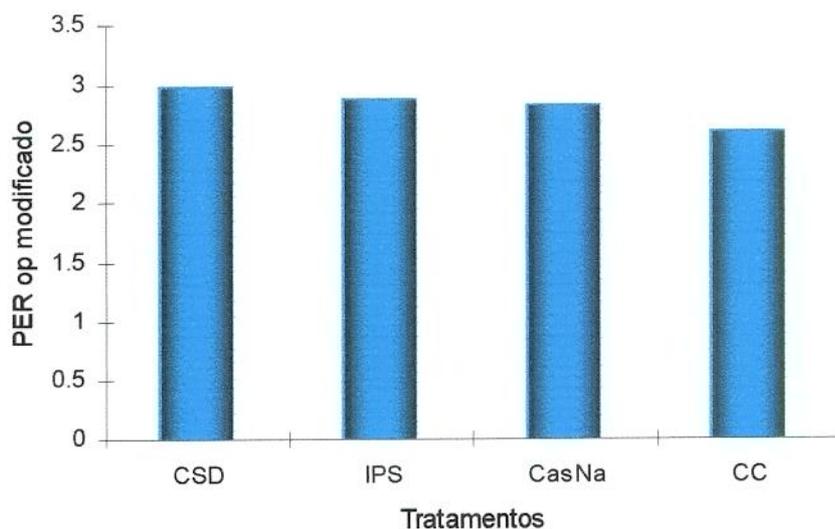


Figura 8 - Valores médios de PERop modificado (Quociente de Eficiência Protéica Operacional Modificado) para ratos Wistar submetidos aos vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa) e caseína comercial (CC). Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com a correção proposta (ver Materiais e Métodos), os valores de PER se aproximaram aos valores reportados na literatura e que foram de aproximadamente 2,3 para a CC, 2,8 para o IPS e Cas Na e 3,0 para o CSD (Figura 8).

4.2.3 Colesterol sérico e hepático

Os valores de referência para todas as análises (colesterol total, triacilgliceróis), foram obtidos a partir de análises efetuadas no primeiro e no segundo ensaio com 10 e 15 ratos Wistar recém-desmamados e de 57 dias respectivamente, que foram sacrificados no

tempo zero (T0). Os resultados dessas análises foram tabulados e se calculou média e desvio-padrão. Para a construção do valor de referência utilizou-se média \pm 2 desvios padrão.

No presente experimento só foram alterados o tipo e a fonte de lipídios e a concentração de proteína em relação as recomendações da AIN-93 G, para ratos em crescimento.

A Tabela 8 e a Figura 9 apresentam as concentrações de colesterol sérico total. A Tabela 9 e a Figura 10 apresentam as concentrações hepáticas de colesterol.

Tabela 8 - Níveis de colesterol sérico em mg/dL (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 20% de proteína, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 dias.

| Tratamentos | Tempo (dias) | | | |
|-------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | T 15 | T 30 | T 45 | T 60 |
| CSD | 75,27 \pm 2,72 ^{Bb} | 87,17 \pm 1,30 ^{Ba} | 77,51 \pm 4,54 ^{Cb} | 69,55 \pm 4,41 ^{Bb} |
| IPS | 73,16 \pm 3,01 ^{Ba} | 74,67 \pm 3,29 ^{Ba} | 66,5 \pm 2,10 ^{Dab} | 67,78 \pm 1,65 ^{Cb} |
| CasNa | 94,93 \pm 5,23 ^{Ab} | 122,77 \pm 5,63 ^{Aa} | 90,06 \pm 4,68 ^{Bbc} | 77,56 \pm 4,51 ^{ABc} |
| CC | 87,75 \pm 1,79 ^{Ab} | 116,57 \pm 2,93 ^{Aa} | 106,02 \pm 2,93 ^{Aab} | 87,82 \pm 1,79 ^{Ab} |

- CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio); CC (caseína comercial).
- Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
- Valor de referência (média \pm 2DP) = 58,76 \pm 9,72.
- Amplitude de variação relativa de referência: 49,04 \rightarrow 68,48.

Os valores mais altos de colesterol sérico em todos os tratamentos foram observados com 30 dias na dieta, particularmente para o CasNa e CC. Entretanto, os tratamentos CSD e o IPS apresentaram os menores valores, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Portanto, notou-se que durante todo o experimento tanto o CSD quanto o IPS apresentaram os menores valores.

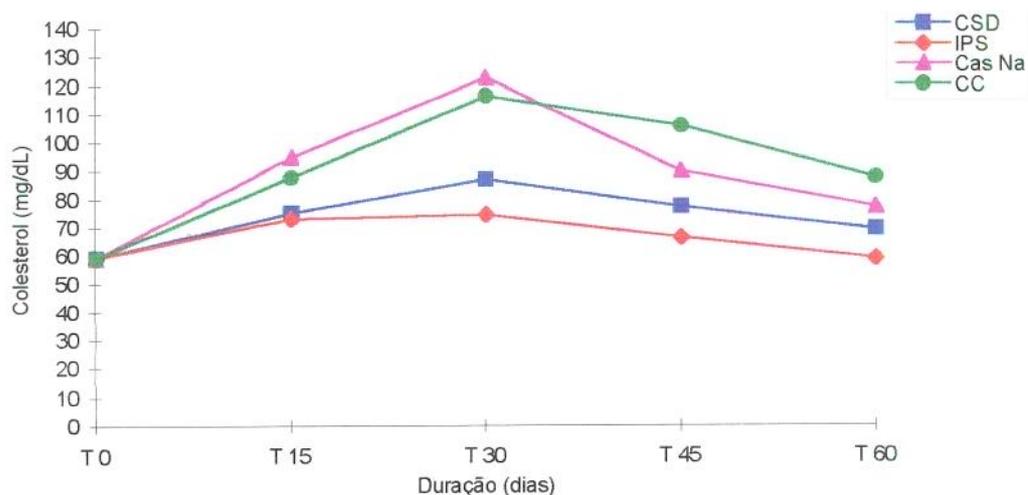


Figura 9 - Níveis de colesterol sérico em mg/dL (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias. Valor de referência = T0.

Tabela 9 - Níveis de colesterol hepático em mg/g de tecido original (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 20% de proteína, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 dias.

| Tratamentos | Tempo (dias) | | | |
|-------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | T 15 | T 30 | T 45 | T 60 |
| CSD | 7,08 \pm 0,33 ^{Bb} | 12,02 \pm 0,90 ^{Aa} | 12,17 \pm 1,84 ^{Aa} | 11,54 \pm 0,89 ^{Aa} |
| IPS | 7,36 \pm 0,39 ^{Bb} | 7,49 \pm 0,07 ^{Bb} | 11,91 \pm 2,10 ^{Aa} | 13,50 \pm 2,14 ^{Aa} |
| CasNa | 12,84 \pm 2,41 ^{Aa} | 11,38 \pm 0,14 ^{Aa} | 14,01 \pm 0,99 ^{Aa} | 13,59 \pm 0,66 ^{Aa} |
| CC | 7,20 \pm 0,70 ^{Bc} | 10,69 \pm 0,77 ^{Abc} | 15,79 \pm 1,60 ^{Aa} | 13,57 \pm 3,34 ^{Aab} |

- CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio); CC (caseína comercial).
- Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
- Valor de referência (média \pm 2DP) = 5,79 \pm 0,71.
- Amplitude de variação relativa de referência: 5,08 \rightarrow 6,50.

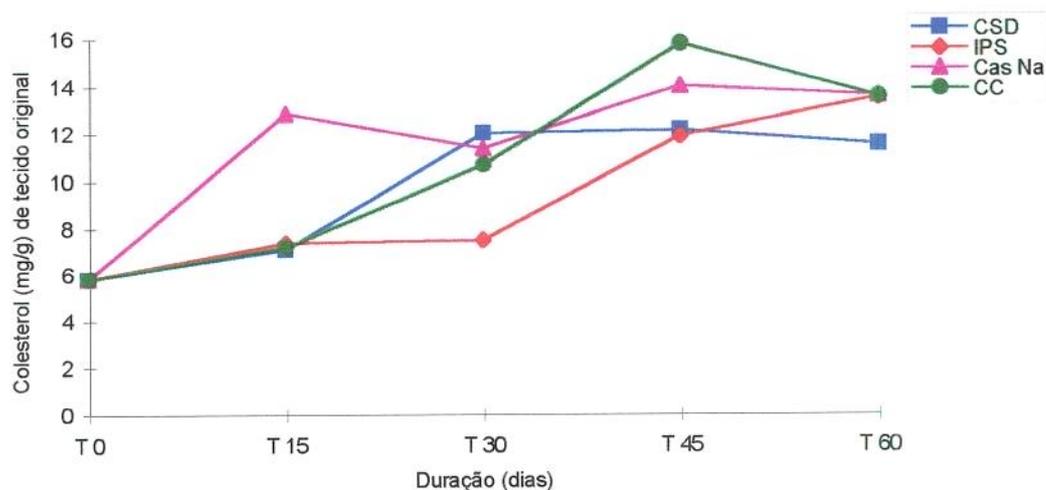


Figura 10 - Níveis de colesterol hepático em mg/g de tecido original (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias. Valor de referência = T0.

Quanto aos níveis hepáticos, no tempo 15 o CasNa apresentou o maior valor, diferindo dos demais. Já no tempo 30 o IPS diferiu dos demais por apresentar o menor valor. De 30 a 45 dias o CasNa e a CC apresentaram um maior valor mas, não apresentou nenhuma diferença significativa entre os tratamentos, o mesmo se verificou no último período de ensaio, onde o CSD apresentou um menor valor, não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

4.2.4 Triacilgliceróis séricos e hepáticos

A Tabela 10 e a Figura 11 apresentam as concentrações de triacilgliceróis séricos e a Tabela 11 e a Figura 12, as concentrações hepáticas.

Os níveis de triacilgliceróis séricos encontrados no início do experimento (T 15) foram iguais para todos os tratamentos. Com 30 dias nas dietas, o CSD e o IPS apresentaram valor menor, diferindo dos demais, o mesmo não se notando no tempo 45, onde apresentaram o maior valor. Ao final do experimento o CSD foi o que apresentou maior aumento, diferindo dos demais tratamentos.

Tabela 10 - Níveis de triacilgliceróis séricos em mg/dL (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 20% de proteína, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 dias.

| Tratamentos | Tempo (dias) | | | |
|-------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | T 15 | T 30 | T 45 | T 60 |
| CSD | 58,34 \pm 3,97 ^{Ac} | 73,99 \pm 2,75 ^{Cb} | 81,13 \pm 2,96 ^{Aab} | 81,80 \pm 0,97 ^{Aa} |
| IPS | 48,58 \pm 0,93 ^{Ac} | 75,76 \pm 6,50 ^{BCab} | 82,61 \pm 5,96 ^{Aa} | 64,18 \pm 7,13 ^{Bb} |
| CasNa | 59,79 \pm 7,56 ^{Ab} | 91,23 \pm 4,65 ^{Aa} | 64,83 \pm 4,85 ^{Bb} | 61,90 \pm 8 07 ^{Bb} |
| CC | 53,21 \pm 1,80 ^{Ad} | 87,34 \pm 4,14 ^{ABa} | 73,2 \pm 1,16 ^{ABb} | 65,63 \pm 2,08 ^{Bc} |

- CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio); CC (caseína comercial).
- Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
- Valor de referência (média \pm 2DP) = 45,16 \pm 14,36.
- Amplitude de variação relativa de referência: 30,80 \rightarrow 59,52.

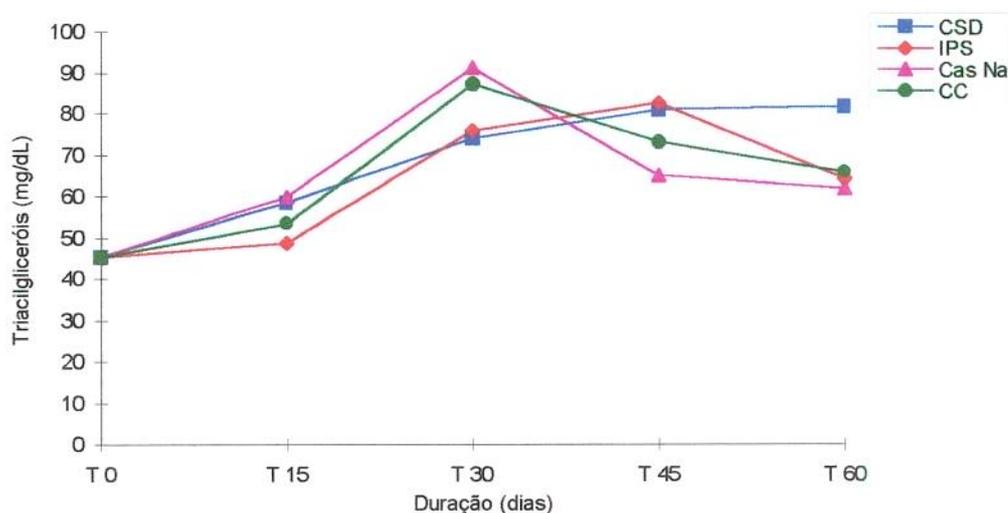


Figura 11 - Níveis de triacilgliceróis séricos em mg/dL (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias. Valor de referência = T0.

Tabela 11 - Níveis de triacilgliceróis hepáticos em mg/g de tecido original (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 20% de proteína, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 dias.

| Tratamentos | Tempo (dias) | | | |
|-------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | T 15 | T 30 | T 45 | T 60 |
| CSD | 8,56 \pm 0,40 ^{BCc} | 15,00 \pm 0,83 ^{Ba} | 12,35 \pm 0,77 ^{Bb} | 11,17 \pm 1,50 ^{Bb} |
| IPS | 16,20 \pm 0,13 ^{Aab} | 10,55 \pm 0,22 ^{Cb} | 17,97 \pm 2,55 ^{Aa} | 12,63 \pm 1,23 ^{Bb} |
| CasNa | 12,04 \pm 0,02 ^{ABb} | 13,52 \pm 0,46 ^{Bb} | 18,87 \pm 1,94 ^{Aa} | 11,30 \pm 0,30 ^{Bb} |
| CC | 7,71 \pm 0,14 ^{Cc} | 19,29 \pm 0,58 ^{Aa} | 13,51 \pm 1,03 ^{Bb} | 16,66 \pm 2,15 ^{Aa} |

- CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio); CC (caseína comercial).
- Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
- Valor de referência (média \pm 2DP) = 5,88 \pm 0,89.
- Amplitude de variação relativa de referência: 4,98 \rightarrow 7,67.

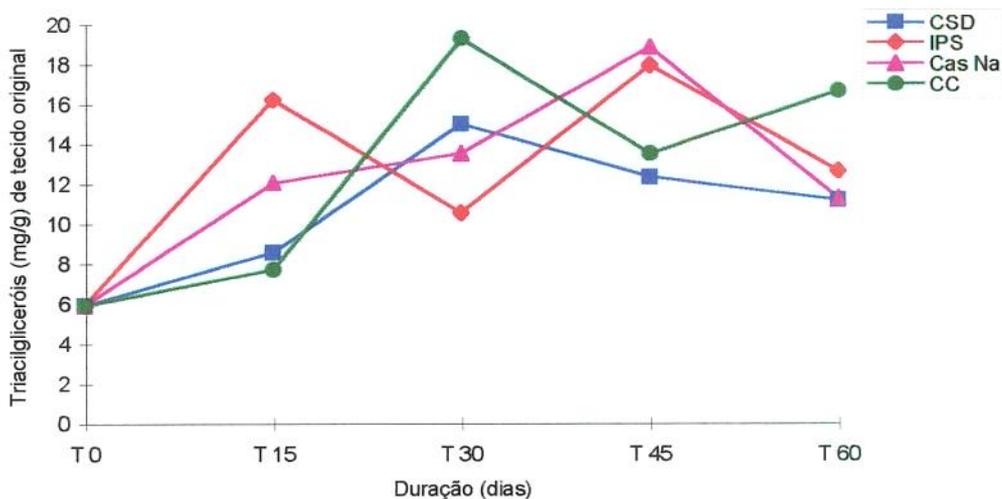


Figura 12 - Níveis de triacilgliceróis hepáticos em mg/g de tecido original (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias. Valor de referência = T0.

Analisando os níveis hepáticos, no tempo 15, verificamos que o CSD e a CC apresentaram um menor valor não diferindo estatisticamente entre si. No tempo 30 a CC apresentou maior valor, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos. Para o IPS e para o CasNa os valores mais altos se deram aos 45 dias. Somente a CC diferiu estatisticamente dos outros tratamentos ao final do experimento, apresentando o valor mais elevado.

4.2.5 Proteína total

A Tabela 12 e a Figura 13, apresentam as concentrações de proteína total verificados para todos os tratamentos dietéticos.

Tabela 12 - Níveis de proteínas séricas totais em mg/100mL (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 20% de proteína, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 dias.

| Tratamentos | Tempo (dias) | | | |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | T 15 | T 30 | T 45 | T 60 |
| CSD | 5,36 \pm 0,66 | 6,50 \pm 1,62 | 7,41 \pm 0,48 | 6,85 \pm 1,48 |
| IPS | 5,37 \pm 0,38 | 6,53 \pm 1,49 | 7,28 \pm 0,67 | 7,74 \pm 0,91 |
| CasNa | 5,32 \pm 0,81 | 7,53 \pm 0,74 | 7,02 \pm 0,70 | 7,30 \pm 1,10 |
| CC | 5,62 \pm 0,73 | 6,25 \pm 0,57 | 7,28 \pm 1,05 | 6,66 \pm 0,56 |

- CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio); CC (caseína comercial).
- Não houve diferença estatisticamente significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.
- Valor de referência (média \pm 2 DP) = 3,20 \pm 0,56.
- Amplitude de variação relativa de referência: 2,64 \rightarrow 3,76.

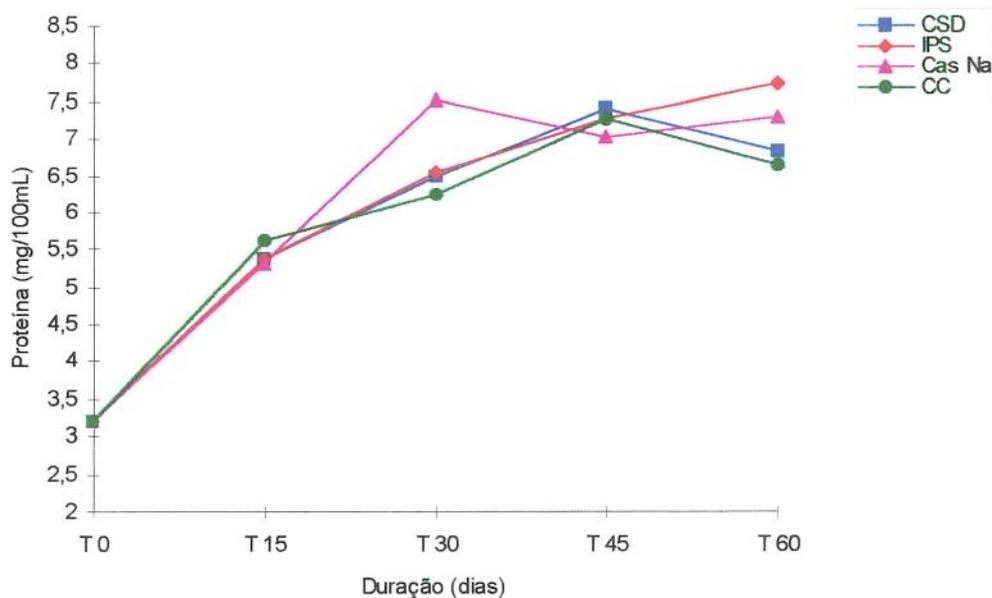


Figura 13 - Níveis de proteínas séricas totais em mg/100mL de ratos Wistar para os vários tratamentos dietéticos, com 20% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias. Valor de referência = T0.

As proteínas totais séricas se mantiveram, nos primeiros 15 dias de experimento, ao redor de 5mg/100mL apresentando entre os demais tempos 30, 45 e 60, média entre 6 e 7 mg/100mL. Todos os tratamentos se mantiveram acima do valor referência durante todo o experimento sem, contudo, apresentarem entre si diferença estatística significativa.

4.3 Segundo Ensaio

Em virtude de algumas evidências apresentadas por Zhang & Beynen (1993) e de sugestões na literatura de que 30% de proteína de soro de leite na dieta produziria um efeito hipocolesterolêmico mais evidente do que 20% de proteína, optou-se por repetir o primeiro ensaio, agora com 30% de proteína. Utilizou-se para este ensaio ratos com 57 dias de idade.

4.3.1 Ganho de Peso e Ingestão de dieta

Os valores obtidos de consumo de dieta e ganho de peso encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 - Consumo de dieta, consumo do proteína, ganho de peso, ganho de peso/proteína ingerida, após 15, 30 e 45 dias.

| Parâmetros medidos em diferentes períodos (dias) | Tratamentos | | | |
|--|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | CSD | IPS | CasNa | CC |
| 0 - 15 | | | | |
| CD (g) | 281,48 ± 21,77 ^b | 358,28 ± 82,01 ^a | 274,58 ± 11,18 ^b | 305,85 ± 15,32 ^b |
| CP (g) | 84,45 ± 6,54 ^b | 96,57 ± 3,18 ^a | 82,38 ± 3,36 ^b | 97,75 ± 11,85 ^a |
| GP (g) | 20,04 ± 4,97 ^b | 36,55 ± 6,82 ^a | 38,31 ± 5,92 ^a | 40,50 ± 3,37 ^a |
| GP/CP | 0,24 ± 0,07 ^b | 0,38 ± 0,08 ^a | 0,47 ± 0,07 ^a | 0,42 ± 0,06 ^a |
| 16 - 30 | | | | |
| CD (g) | 371,92 ± 40,14 ^b | 485,10 ± 80,35 ^a | 298,12 ± 41,93 ^b | 421,68 ± 10,05 ^{ab} |
| CP (g) | 111,57 ± 12,04 ^b | 145,53 ± 24,12 ^a | 97,91 ± 8,97 ^b | 120,50 ± 10,45 ^{ab} |
| GP (g) | 70,93 ± 9,57 ^a | 85,20 ± 9,19 ^a | 89,14 ± 14,11 ^a | 74,58 ± 6,56 ^a |
| GP/CP | 0,61 ± 0,08 ^b | 0,60 ± 0,12 ^b | 0,91 ± 0,13 ^a | 0,62 ± 0,11 ^b |
| 31 - 45 | | | | |
| CD (g) | 231,73 ± 54,27 ^b | 358,10 ± 61,09 ^{ab} | 270,87 ± 66,51 ^b | 449,53 ± 53,32 ^a |
| CP (g) | 75,49 ± 14,17 ^b | 107,42 ± 18,32 ^b | 81,26 ± 19,95 ^b | 145,61 ± 29,05 ^a |
| GP (g) | 103,88 ± 9,54 ^a | 120,77 ± 9,51 ^a | 116,84 ± 13,20 ^a | 121,86 ± 12,10 ^a |
| GP/CP | 1,42 ± 0,33 ^{ab} | 1,15 ± 0,22 ^{ab} | 1,52 ± 0,44 ^a | 0,87 ± 0,22 ^b |

- CSD (concentrado protéico de soro doce), IPS (isolado protéico de soja), CasNa (caseinato de sódio), CC (caseína comercial), CD (consumo de dieta), CP (consumo de proteína), GP (ganho de peso), GP/CP (ganho de peso/consumo de proteína).
- Médias obtidas com 6 animais; médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao final de 15 dias, os animais que receberam a dieta CSD ganharam menos peso, embora a quantidade de proteína consumida não tenha sido muito diferente dos demais

tratamentos. Nesse tempo o grupo em CSD apresentou o menor valor de ganho de peso por consumo de proteína. No período de 16 a 30 dias os animais em dieta de CasNa apresentaram o menor consumo o que não interferiu no ganho de peso. No último período do experimento, de 31-45 dias, os animais mostraram uma redução no consumo de dieta em todos os tratamentos, comparados ao período anterior, com exceção da CC. Contudo, não houve diferença significativa no ganho de peso entre os tratamentos. O CSD que promoveu o menor consumo de dieta e de proteína dentre os tratamentos, mostrou uma relação GP/CP de 1,42g, que não diferiu do IPS e do CasNa ($p < 0,05$), mas foi significativamente superior a CC.

4.3.2 Colesterol sérico e hepático

A Tabela 14 e a Figura 14 apresentam as concentrações de colesterol sérico total e a Tabela 15 e Figura 15, as concentrações hepáticas.

Tabela 14 - Níveis de colesterol sérico em mg/dL (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 30% de proteína, nos tempos de 15, 30 e 45 dias.

| Tratamentos | Tempo (dias) | | |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | T 15 | T 30 | T 45 |
| CSD | 39,37 \pm 6,34 ^{Bb} | 47,81 \pm 8,05 ^{Bb} | 70,03 \pm 6,22 ^{Aa} |
| IPS | 47,56 \pm 7,60 ^{Bb} | 35,57 \pm 5,10 ^{Bb} | 53,37 \pm 10,89 ^{Aa} |
| CasNa | 51,36 \pm 9,97 ^{Bb} | 40,66 \pm 6,31 ^{Bb} | 67,35 \pm 11,28 ^{Aa} |
| CC | 70,70 \pm 12,79 ^{Aa} | 69,68 \pm 10,04 ^{Aa} | 68,57 \pm 12,15 ^{Aa} |

- CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio); CC (caseína comercial).
- Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
- Valor de referência (média \pm 2 DP) = 37,05 \pm 5,88.
- Amplitude de variação relativa de referência: 31,17 \rightarrow 42,93.

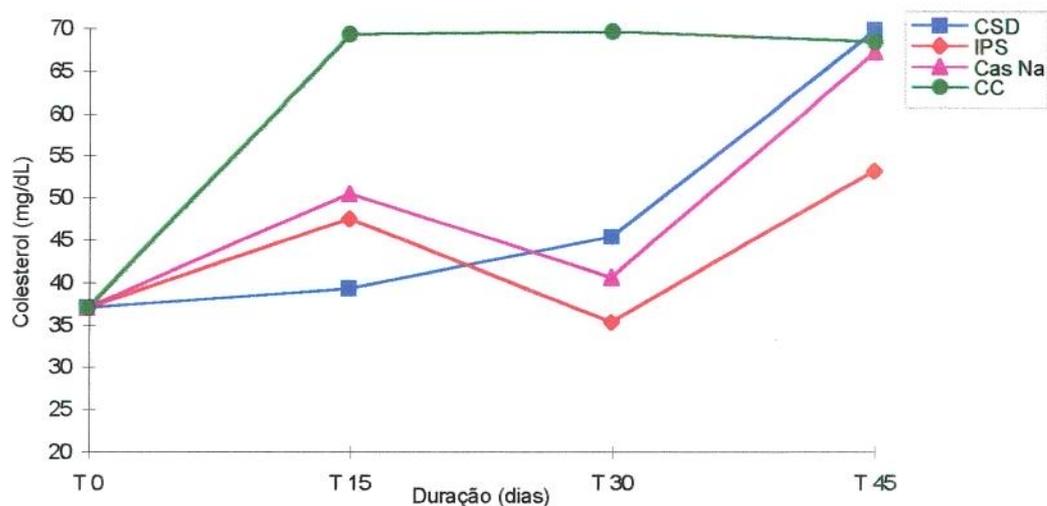


Figura 14 - Níveis de colesterol sérico de ratos Wistar em mg/dL para os vários tratamentos dietéticos, com 30% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 15, 30 e 45 dias. Valor de referência = T0.

Quanto aos níveis séricos de colesterol, os tratamentos CSD, IPS e CasNa apresentaram valor significativamente menor ($p < 0,05$) que a CC nos tempos 15 e 30, não diferindo entre si. Ao final do experimento (T 45) houve uma elevação dos índices de colesterol sérico em todos os tratamentos, não diferindo estatisticamente da CC.

Segundo os dados apresentados na Tabela 15, aos 15 dias de tratamento dietético o IPS apresentou o menor nível de colesterol hepático, diferindo dos demais tratamentos. Aos 30 dias, os animais em dieta de CC apresentaram valor mais elevado, diferindo dos demais tratamentos. Ao final do experimento, o CSD apresentou valor mais baixo seguido do IPS e do CasNa, que não diferiram entre si estatisticamente. O valor mais elevado foi apresentado pela CC ($p < 0,05$).

Tabela 15 - Níveis de colesterol hepático em mg/g de tecido original (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 30% de proteína, nos tempos de 15, 30 e 45 dias.

| Tratamentos | Tempo (dias) | | |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | T 15 | T 30 | T 45 |
| CSD | 4,01 \pm 0,35 ^{Aa} | 3,85 \pm 0,49 ^{Ba} | 4,27 \pm 0,58 ^{Ca} |
| IPS | 2,23 \pm 0,43 ^{Bb} | 3,80 \pm 0,36 ^{Ba} | 4,77 \pm 0,86 ^{BCa} |
| CasNa | 4,20 \pm 0,86 ^{Aa} | 4,58 \pm 0,61 ^{Ba} | 5,78 \pm 0,74 ^{ABa} |
| CC | 4,04 \pm 0,30 ^{Ab} | 6,77 \pm 0,61 ^{Aa} | 6,15 \pm 0,15 ^{Aa} |

- CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio); CC (caseína comercial).
- Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
- Valor de referência (média \pm 2 DP) = 5,79 \pm 0,71.
- Amplitude de variação relativa de referência: 5,08 \rightarrow 6,50.

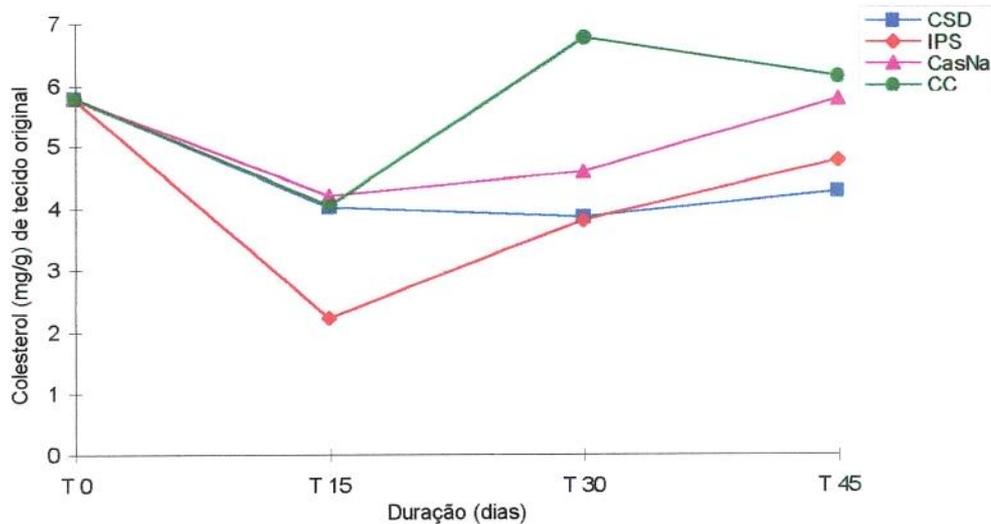


Figura 15 - Níveis de colesterol hepático de ratos Wistar em mg/g de tecido original para os vários tratamentos dietéticos, com 30% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 15, 30 e 45 dias. Valor de referência = T0.

4.3.3 Triacilgliceróis sérico e hepático

A Tabela 16 e a Figura 16 apresentam as concentrações de triacilgliceróis sérico. Os níveis séricos de triacilgliceróis em todos os tratamentos subiram muito no tempo 15, a saber: CSD (228 %); IPS (352 %); CasNa (275 %) e CC (347 %) do valor de referência. No tempo 30, somente o IPS apresentou aumento em relação ao tempo anterior. Já o CasNa não apresentou nenhuma diferença significativa entre os diferentes tempos. Ao final do experimento, os menores valores foram obtidos com os animais tratados com IPS e CasNa.

As concentrações hepáticas de triacilgliceróis são apresentadas na Tabela 17 e Figura 17.

Tabela 16 - Níveis de triacilgliceróis séricos em mg/dL (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 30% de proteína, nos tempos de 15, 30 e 45 dias.

| Tratamentos | Tempo (dias) | | |
|-------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | T 15 | T 30 | T 45 |
| CSD | 73,62 \pm 16,66 ^{Bb} | 91,98 \pm 21,33 ^{BCb} | 158,84 \pm 16,33 ^{Aa} |
| IPS | 113,62 \pm 25,64 ^{Ab} | 155,87 \pm 25,81 ^{Aa} | 113,85 \pm 2,50 ^{Bb} |
| CasNa | 88,92 \pm 19,52 ^{ABa} | 70,79 \pm 8,92 ^{Ca} | 93,52 \pm 16,42 ^{Ba} |
| CC | 111,87 \pm 19,41 ^{Ab} | 111,82 \pm 23,78 ^{Bb} | 158,17 \pm 2,72 ^{Aa} |

- CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio); CC (caseína comercial).
- Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
- Valor de referência (média \pm 2 DP) = 32,24 \pm 5,94.
- Amplitude de variação relativa de referência: 26,30 \rightarrow 38,18.

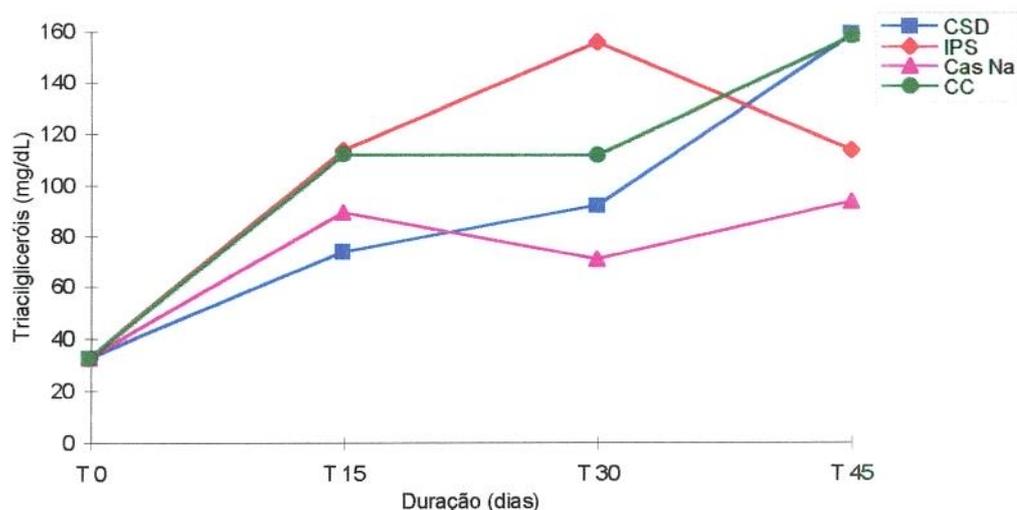


Figura 16 - Níveis de triacilgliceróis séricos de ratos Wistar em mg/dL para os vários tratamentos dietéticos, com 30% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 15, 30 e 45 dias. Valor de referência = T0.

Tabela 17 - Níveis de triacilgliceróis hepático em mg/g de tecido original (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 30% de proteína, nos tempos de 15, 30 e 45 dias.

| Tratamentos | Tempo (dias) | | |
|-------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | T 15 | T 30 | T 45 |
| CSD | 17,31 \pm 1,70 ^{Aa} | 10,92 \pm 1,22 ^{Ac} | 14,99 \pm 1,07 ^{Bb} |
| IPS | 8,40 \pm 1,49 ^{Cc} | 11,27 \pm 1,86 ^{Ab} | 13,96 \pm 0,47 ^{Ba} |
| CasNa | 11,68 \pm 1,72 ^{Bb} | 13,09 \pm 2,48 ^{Ab} | 18,43 \pm 0,67 ^{Aa} |
| CC | 4,41 \pm 0,73 ^{Db} | 5,45 \pm 0,64 ^{Bb} | 17,98 \pm 1,35 ^{Aa} |

- CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio); CC (caseína comercial).
- Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
- Valor de referência (média \pm 2 DP) = 5,88 \pm 0,89.
- Amplitude de variação relativa de referência: 4,99 \rightarrow 6,78.

Os dados da Figura 17 mostram que o grupo em CC apresenta níveis hepáticos de triacilgliceróis significativamente mais baixos que os demais tratamentos. O tratamento CSD apresenta valores mais elevados no décimo quinto dia (T 15) caindo bruscamente aos 30 dias (T 30), que passa a não diferir dos demais tratamentos, exceto o da CC que permanece ao nível estatístico mais baixo ($p < 0,05$). No final do ensaio (T 45), IPS e CSD apresentam níveis hepáticos de triacilgliceróis inferiores aos dos tratamentos CC e CasNa ($p < 0,05$).

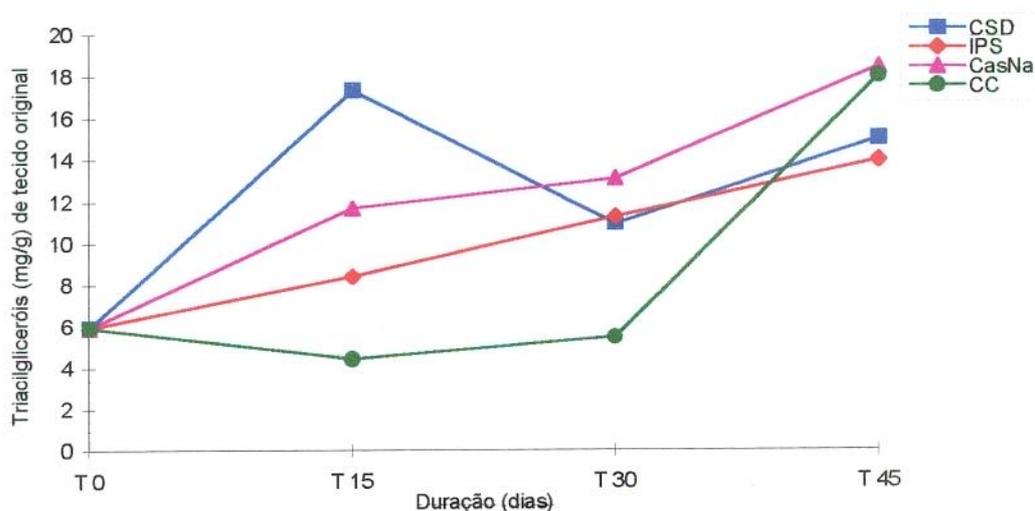


Figura 17 - Níveis de triacilgliceróis hepáticos de ratos Wistar em mg/g de tecido original para os vários tratamentos dietéticos, com 30% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 15, 30 e 45 dias. Valor de referência = T0.

4.3.4 Proteínas totais

A Tabela 18 e a Figura 18, apresentam as concentrações de proteína sérica total verificadas para todos os tratamentos dietéticos. Os dados da Figura 18, indicam uma elevação da proteína sérica a 219% do valor referência, aos 15 dias nas dietas, não tendo havido diferença entre os vários tratamentos. Nos demais tempos (T 30) e (T 45) os valores permaneceram no mesmo nível, sem diferença entre os tratamentos.

Tabela 18 - Níveis de proteínas séricas totais em mg/100mL (média \pm desvio-padrão) de ratos Wistar para os diferentes tratamentos dietéticos, com 30% de proteína, nos tempos de 15, 30 e 45 dias.

| Tratamentos | Tempo (dias) | | |
|-------------|------------------|------------------|------------------|
| | T 15 | T 30 | T 45 |
| CSD | 23,29 \pm 1,84 | 23,19 \pm 1,23 | 23,00 \pm 0,68 |
| IPS | 23,36 \pm 1,30 | 22,81 \pm 0,84 | 23,89 \pm 0,82 |
| CasNa | 23,48 \pm 1,37 | 22,54 \pm 0,64 | 22,83 \pm 0,45 |
| CC | 23,28 \pm 1,66 | 23,13 \pm 1,32 | 22,94 \pm 0,82 |

- CSD (concentrado protéico de soro doce); IPS (isolado protéico de soja); CasNa (caseinato de sódio); CC (caseína comercial).
- Não houve diferença estatística significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.
- Valor de referência (média \pm 2 DP) = 10,37 \pm 2,23.
- Amplitude de variação relativa de referência: 5,91 \rightarrow 14,83.

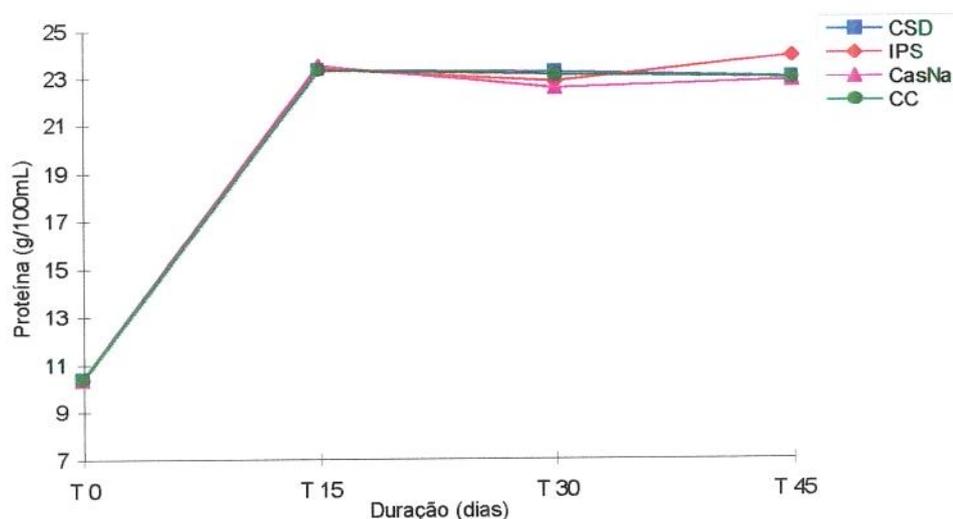


Figura 18 - Níveis de proteínas séricas totais de ratos Wistar em mg/100mL, para os vários tratamentos dietéticos, com 30% de proteína: concentrado protéico de soro doce (CSD), isolado protéico de soja (IPS), caseinato de sódio (CasNa), caseína comercial (CC), nos tempos de 0, 15, 30 e 45 dias. Valor de referência = T0.

5. DISCUSSÃO

5.1 Composição de aminoácidos

Comparando o perfil de aminoácidos dos tratamentos CSD, CasNa, IPS e CC com o padrão FAO/WHO (1990), verificou-se que o CSD, o CasNa, o IPS e a CC, apresentaram valores acima do padrão citado para aminoácidos essenciais, exceto para a lisina, aminoácido limitante do CasNa, fenilalanina + tirosina, para o CSD e, metionina + cistina para o IPS e CC. Os valores de escore químico calculados foram 0,87, 0,98, 0,84 e 0,87 para o CasNa, CSD, IPS e CC, respectivamente.

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 (~ 1,0) para cisteína/metionina; mais baixos teores 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 elevados teores de aminoácidos ramificados auxiliam na recuperação de traumas múltiplos (Brenan *et al.*, 1986) e de queimaduras (Alexander & Gottschlich, 1990).

5.2 Ganho de Peso, Ingestão de Dieta e PERop modificado

O primeiro ensaio foi realizado com uso de dietas contendo 20% de proteína e com animais recém-desmamados. No segundo ensaio utilizou-se dietas com 30% de proteína e os animais foram iniciados nos tratamentos experimentais com 57 dias de idade. Desse modo, o PERop só foi determinado para os animais do primeiro ensaio, após 30 dias de tratamento dietético.

De acordo com os resultados obtidos no final do primeiro ensaio (T60) apresentados na Tabela 7, o consumo de dieta e a razão entre o ganho de peso e o consumo de proteína, não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. Ao final do segundo ensaio (T45), não

houve diferença significativa no ganho de peso entre os tratamentos, conforme apresentado na Tabela 13. Quanto à razão entre o ganho de peso e o consumo de proteína, verificou-se que o CSD, CasNa e IPS não diferiram entre si, apresentando os maiores valores.

Na Figura 8 foram apresentados os resultados do PERop modificado, realizado no primeiro ensaio. Os valores obtidos para esse parâmetro, foram superiores a 2,0 em todos os tratamentos, indicando que todas as proteínas utilizadas eram de boa qualidade, não tendo aparentemente, outros fatores que pudessem ter interferido nos resultados.

Segundo Sgarbieri (1996), os valores de PER diminuem à medida que se aumenta a concentração de proteínas na dieta muito acima de 10%. Essa variação do valor de PER com a concentração de proteína irá depender principalmente da natureza da proteína, sendo mais notável em proteínas de elevado valor nutritivo. Pode-se observar que alguns tipos de proteína mostram uma diminuição do valor de PER em concentrações superiores a 10% da dieta, embora outras, só alcancem seu valor máximo em concentrações acima de 10%. Teores inferiores a 6% podem ser insuficientes para alcançar o mínimo de proteína necessária para o crescimento animal; entre 7-10% a proteína será mais utilizada por estar limitante e, portanto, deve ser utilizada preferencialmente, para a síntese de proteínas corporais; entretanto, se o teor protéico for elevado além de 12-15%, o gasto de proteínas para fins energéticos será maior, diminuindo a eficiência da proteína da dieta para fins anabólicos.

Alguns fatores podem interferir com os valores de PER dentre os quais: a concentração de proteína e de gordura na dieta; idade e linhagem dos animais bem como o seu manuseio. O aumento de gordura acima de 12% eleva os valores de PER significativamente, pela diminuição do total ingerido e, conseqüentemente, com redução da proteína consumida, diminuindo o denominador da expressão do PER.

Segundo Friedman (1996), valores de PER abaixo de 1,50 descrevem uma proteína de baixa qualidade; entre 1,50 e 2,00, uma qualidade intermediária; acima de 2,00, qualidade boa a alta.

Renner (1988), em ensaio de avaliação nutricional, encontrou valores de PER de 3,6, 2,9 e 2,1 para proteínas de soro de leite, caseína e proteína de soja, respectivamente. Os

valores encontrados no presente experimento diferem dos citados e isso pode ser devido às diferenças na concentração de proteína e ao tipo de lipídios utilizados nas dietas.

5.3 Colesterol sérico e hepático

Os resultados encontrados para o colesterol sérico nos dois ensaios (Figuras 9 e 14) consubstanciam a natureza hipercolesterolêmica da caseína e as propriedades hipocolesterolêmicas do IPS e CSD, que mantiveram consistentemente os níveis mais baixos de colesterol no primeiro ensaio (Figura 9) e também no segundo ensaio (Figura 14) até os 30 dias de experimento. A razão pela qual registrou-se uma significativa elevação do colesterol sérico para o CSD, CasNa e o IPS aos 45 dias nas dietas não é aparente, portanto, não temos explicações para esses resultados.

No caso do fígado, o colesterol foi significativamente mais baixo no primeiro ensaio apenas com 30 dias de experimento e aos 60 dias não houve diferença estatística entre os tratamentos. No segundo experimento, houve uma tendência bem mais definida de abaixamento do colesterol hepático nos tratamentos com IPS e CSD, sugerindo mesmo a nível hepático, um efeito hipocolesterolêmico dessas duas fontes protéicas.

Segundo Kritchevsky (1979) e Beynen (1990), o tipo e a quantidade (Nagaoka *et al.*, 1991) de proteína pode influenciar a concentração de colesterol sérico. As proteínas de origem animal geralmente exercem um efeito hipercolesterolêmico, quando comparadas às de origem vegetal (Carrol, 1991), podendo causar diferentes graus de hipercolesterolemia, por meio de diferentes mecanismos (Lovati *et al.*, 1990). No presente experimento só foram alteradas a fonte e a quantidade de proteína, mantendo os outros fatores constantes para que as mudanças ocorridas nos resultados pudessem ser atribuídas ao tipo e concentração de proteína utilizadas. Zhang & Beynen (1993) utilizaram 15 e 30% de proteína demonstrando que as concentrações de colesterol a nível sérico e hepático são geralmente diminuídas com a alta ingestão de proteínas. Wong *et al.* (1996) observaram que indivíduos hipercolesterolêmicos apresentaram redução do colesterol sérico quando a proteína animal da dieta foi substituída por proteína de soja.

No primeiro ensaio foi possível observar efeito hipocolesterolêmico para as

proteínas de soro de leite e de soja, visto que o CSD e o IPS apresentaram níveis mais baixos em todo o experimento comparando com a CC, que se manteve alta durante todo o ensaio, não diferindo do CasNa apenas no tempo 30.

Nagaoka *et al.* (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 um efeito hipocolesterolêmico, quando comparadas com a caseína. O modo pelo qual as proteínas de soro reduziram o colesterol hepático foi atribuído principalmente à diminuição do HDL-colesterol. Porém, a proporção de HDL-colesterol em relação ao colesterol total em ratos alimentados com a dieta de proteínas de soro de leite, não foi estatisticamente diferente dos valores encontrados para os animais em dieta de caseína. 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 proteínas de soro lácteo.

Segundo Yoshida *et al.* (1988) e Norton *et al.* (1987), as proteínas de soro de leite diminuem o colesterol sérico. Já Stahelin e Ritzel (1979), afirmam que as mesmas proteínas não afetam os níveis de colesterol sérico. Lovati *et al.* (1990) encontraram uma elevação nesses níveis séricos.

Torna-se aparente que, alguns dos resultados obtidos sobre os efeitos das proteínas de soro e da caseína nas concentrações de colesterol sérico e hepático de ratos são contraditórios. Sautier *et al.* (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 *et al.* (1989) contudo, só encontraram esse efeito hipocolesterolêmico, quando as dietas foram adicionadas de colesterol. Nesses dois estudos a concentração de proteína da dieta foi de 200g/kg. Além disso, Lapré *et al.* (1989) sugeriram que esse efeito das proteínas de soro não foi observado em ratos alimentados com dietas contendo 0,15% de colesterol. Zhang & Beynen (1993) observaram que a proteína de soro reduziu o colesterol hepático, mas não o colesterol sérico, quando dada em uma concentração de 150g/kg de dieta. Isso confirmou os resultados de Lapré *et al.* (1989). Contudo, 300g de proteína de soro por kg de dieta promoveram uma redução nos níveis de colesterol sérico, hepático e nas frações de VLDL. Visto que essa fração de lipoproteína é a

principal carreadora de triacilgliceróis séricos, não é surpresa que as concentrações totais de triacilgliceróis tenham diminuído consideravelmente em ratos alimentados com elevadas concentrações de proteínas de soro de leite. Assim, as proteínas de soro lácteo têm a propriedade de reduzir o colesterol e a caseína de elevá-lo. Para ver se o efeito hipocolesterolêmico das proteínas de soro de leite pode ser explicado pela sua composição de aminoácidos os animais foram também alimentados com misturas de aminoácidos que simulavam proteínas de soro e caseína. Sabe-se contudo, que os efeitos obtidos com as misturas de aminoácidos podem não dar informação a respeito do mesmo efeito produzido pelas proteínas intactas. Uma proteína não pode simplesmente ser substituída por uma mistura de aminoácidos correspondente à sua composição, porque a ordem na qual os peptídios ou aminoácidos são liberados durante a digestão é característico de cada proteína. O efeito diferencial das proteínas de soro e da caseína nos níveis de colesterol sérico e hepático, não foi semelhante aos resultados obtidos com misturas de aminoácidos de composição similar. As misturas de aminoácidos produziram concentrações de colesterol sérico significativamente diferentes dos obtidos com as proteínas intactas. Assim, a atividade redutora de colesterol apresentada pelas proteínas de soro de leite, quando comparadas com a caseína, reside nas diferenças estruturais da proteína ou dos componentes não protéicos e não nas diferenças entre as composições de aminoácidos. Ao contrário, o efeito hipocolesterolêmico das proteínas de soja versus caseína, em ratos, foi bem reproduzido quando se alimentaram os animais com uma mistura de aminoácidos que simulassem essas proteínas (Yadav & Liener, 1977; Nagata *et al.*, 1981). Essas diferenças registradas experimentalmente para o efeito hipocolesterolêmico das proteínas de soja e de soro de leite, poderão estar sugerindo mecanismos de ação bioquímica diferente para o mesmo fenômeno.

Sirtori *et al.* (1977) e Potter (1998), afirmam que a utilização de proteína de soja como substituto da proteína animal promove redução nos níveis de colesterol séricos. Em humanos, essa redução de colesterol foi notada na fração LDL, enquanto a HDL-colesterol, permanece inalterada ou aumenta. Em ratos alimentados com proteína de soja, uma maior quantidade de colesterol foi associada com as HDL e LDL (Vahouny *et al.*, 1985).

O efeito hipocolesterolêmico 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, mas pesquisas efetuadas com outras espécies, incluindo humanos, foram menos consistentes. Em estudos efetuados com aminoácidos que simulassem 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).

O mecanismo pelo qual as proteínas de soro de leite e não a caseína, produziria hipocolesterolemia não é conhecido. Em coelhos, as proteínas de soro de leite diminuíram ligeiramente as concentrações de colesterol total sérico, fato associado com o aumento da excreção fecal de esteróides neutros e ácidos biliares (Lovati *et al.*, 1990). Em ratos, contudo, as proteínas de soro não alteraram a excreção de esteróides neutros e ácidos biliares nas fezes (Sautier *et al.*, 1983). Quando se utilizou 300g de proteína de soro por Kg de dieta, Zhang & Beynen (1993) encontraram redução significativa na excreção fecal de ácidos biliares. Beynen (1990) achou improvável que as proteínas de soro inibam a reabsorção de ácidos biliares observada com as proteínas de soja em ratos.

Zhang & Beynen (1993) acham possível que em ratos alimentados com níveis altos de proteínas de soro de leite, a síntese de colesterol seja inibida quando comparada com ratos alimentados com caseína. Isso ficou mais evidente quando se observou que as proteínas de soro induziram uma 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 colesterologênese. Admitindo que o colesterol que vem da síntese hepática “*de novo*” é o principal precursor de ácidos biliares, a excreção reduzida desses ácidos em ratos alimentados com proteínas de soro de leite, poderia indicar que essas proteínas inibem a síntese do colesterol.

No segundo ensaio é confirmado o efeito hipercolesterolêmico da caseína citado na literatura embora ao final do experimento (T 45), todos os tratamentos se mostrassem iguais estatisticamente, evidenciando uma elevação do colesterol sérico. Verificou-se que, em relação ao CSD, manteve-se o nível de colesterol dentro da faixa de normalidade por cerca de 30 dias de tratamento dietético. Os animais alimentados com CC apresentaram uma elevação nos níveis séricos, logo de início mantendo-se em nível praticamente igual ao inicial e elevado durante todo o experimento.

5.4 Triacilgliceróis séricos e hepáticos

Analisando os níveis de triacilgliceróis séricos, no primeiro ensaio (Tabela 10 e Figura 11) e no segundo ensaio (Tabela 16 e Figura 16) com ratos Wistar, observou-se no todo, uma elevação dos níveis em todos os tratamentos em relação ao valor de referência, ao longo dos experimentos. No primeiro experimento, os níveis séricos de triacilgliceróis cresceram na mesma proporção para o IPS e o CSD até os 45 dias. Para o CSD, o nível continuou se elevando até aos 60 dias enquanto que o IPS diminuiu, o mesmo ocorrendo com a CC e o CasNa, quando esses últimos tratamentos se igualaram, apresentando-se significativamente mais baixo para o CSD. No segundo ensaio, o aumento foi significativo para todos os tratamentos até o fim do ensaio, exceto para o IPS que, tendo atingido um valor máximo no trigésimo dia, apresentou uma queda no final do ensaio (T45), tendo se igualado ao CasNa que se manteve o mais baixo aos 30 e 45 dias.

Com relação aos valores hepáticos de triacilgliceróis, não se observou, no primeiro ensaio (Tabela 11 e Figura 12), nenhuma tendência definida que permitisse eleger qualquer tratamento como o mais interessante. No segundo ensaio (Tabela 17 e Figura 17), o IPS e o CasNa mostraram uma tendência de elevação contínua dos triacilgliceróis. Para o CSD o valor foi significativamente mais alto aos 15 dias seguido de queda semelhante à ascensão aos 30 dias. No grupo com caseína os níveis permaneceram baixos (semelhantes ao do valor de referência) até aos 30 dias. No final do experimento, IPS e o CSD apresentaram níveis mais baixos que se assemelharam, enquanto que a CC e o CasNa promoveram níveis idênticos, mais elevados.

Segundo Norum (1992), os níveis séricos de triacilgliceróis variam com a dieta. Na fase pós-prandial há um aumento devido ao aparecimento dos quilomícrons e seus remanescentes no sangue. A concentração de triacilgliceróis depende tanto da quantidade quanto do tipo de gordura na dieta. A duração dessa elevação pós-prandial é maior após uma ingestão de gordura saturada do que com gordura poliinsaturada. O tipo e a quantidade de gordura na dieta vão também afetar as concentrações de triacilgliceróis no jejum.

Marquez-Ruiz *et al.* (1992) verificaram as modificações nos triacilgliceróis e apolipoproteína-B em ratos alimentados com dietas contendo leite integral, desnatado e proteínas de soro de leite. Os resultados do estudo demonstraram que a dieta que continha

leite integral afetou os níveis hepáticos e séricos de lipídios em ratos. Uma redução significativa de triacilgliceróis séricos foi observada nos grupos alimentados com proteínas de soro de leite, e foi associada com uma redução significativa na fração VLDL.

Nagaoka *et al.* (1991) não encontraram diferença significativa entre os níveis de triacilgliceróis séricos e hepáticos em ratos alimentados com caseína e com proteínas de soro de leite. Os níveis totais de lipídios hepáticos, colesterol hepático e níveis de fosfolipídios foram significativamente menores no grupo alimentado com proteínas de soro de leite.

Yuan & Kitts (1993) verificaram os efeitos de produtos de leite e dos constituintes de algumas proteínas sobre os lipídios séricos e hepáticos em ratos Wistar normotensivos. Eles encontraram níveis de triacilgliceróis e colesterol total similares para os animais alimentados com caseína, proteínas de soro, proteínas de leite desnatado e isolado protéico de soja.

Em nossa pesquisa foram também realizadas determinações de HDL e LDL-colesterol no soro e fígado dos ratos que receberam os vários tratamentos dietéticos. Em função de inconsistência dos resultados obtidos e com base da literatura optamos por não apresentar esses dados.

Chegou-se a conclusão que a metodologia utilizada para essas determinações, não foi adequada para extrair essas lipoproteínas. Por outro lado Chapman (1980) afirma que a lipoproteína sérica dominante no rato é a HDL, enquanto que no homem é a LDL. Portanto, a fórmula utilizada para o cálculo da LDL-colesterol sérica deve ser aplicada apenas para humanos e não para ratos.

Com base nos resultados apresentados nesta tese e reportados na literatura, torna-se evidente que a questão dos efeitos das proteínas (animal versus vegetal), na colesterolemia e lipidemia, é ainda assunto bastante controverso e que ainda exige muitas pesquisas, em condições metodológicas bem controladas, para que dados mais consistentes e conclusões definitivas possam ser apresentadas.

5.5 Proteína total

As diferentes fontes de proteína utilizadas nas dietas não interferiram de maneira diferenciada nos níveis de proteínas séricas totais. Notou-se que os níveis de proteínas séricas totais não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, durante toda a duração do primeiro e do segundo ensaios, mantendo-se acima do valor de referência. O que se verificou, foi um aumento nesses níveis quando se utilizou 30% de proteína, em relação ao primeiro ensaio. Esses dados estão de acordo com aqueles obtidos por Jong (1996), segundo o qual as proteínas totais não são indicativos de variações no metabolismo lipídico.

6. Conclusões

1. A composição centesimal e o perfil aminoacídico do CasNa e CSD produzidos em planta piloto, atendeu às expectativas e foram semelhantes aos da literatura.
2. Na relação ganho de peso por consumo de proteína do primeiro ensaio, tanto para os 30 dias quanto para os 60 dias finais, CasNa, IPS e CSD foram mais eficientes, ficando evidente a superioridade do CasNa em relação à CC. Quando se calculou o PERop modificado, os valores variaram de 2,3 até 3,0, não havendo diferença estatística significativa ($p < 0,05$).
3. Com base no ganho de peso acumulativo no primeiro ensaio, verificou-se aos 60 dias uma diferença em favor ao CasNa e da CC, estatisticamente superior ao IPS e CSD ($p < 0,05$).
4. Quanto a colesterolemia, verificou-se um efeito positivo do CSD e do IPS, quando se utilizou 20% e 30% de proteína na dieta. O efeito hipocolesterolêmico foi bem mais evidente para o soro sanguíneo e fígado, no primeiro e segundo ensaios, respectivamente.
5. Em relação à lipídemia (triacilgliceróis), os resultados não mostraram nenhuma tendência definida tanto a nível sérico quanto a nível hepático.
6. Observou-se um aumento das proteínas séricas da ordem de 2 a 3 vezes, tanto no primeiro quanto no segundo ensaio. No primeiro ensaio a elevação foi mais lenta e contínua, enquanto que no segundo a elevação ocorreu nos 15 primeiros dias, permanecendo constante nos 30 dias restantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABELL, L.L.; LEVY, B.B.; BRODIE, B.B.; KENDALL, F. E.. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 195, p. 357-366, 1952.
- ACTON, G.H. The determination of lactose in cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 32, n. 3, p. 111-114, 1977.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) - **Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemistry**, 15. ed., Washington. D.C., 1141 p., 1990.
- ALEXANDER, J.W.; GOTTSCHLISH, M.M. Nutritional immunomodulation in burns patients. **Critical Care Medicine**, Baltimore, v. 18, n. 2, p. S149-153, 1990.
- BALZ, F. Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low density lipoprotein oxidation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 35, n. 1 e 2, p. 83-98, 1995.
- BARTH, C.A.; PFEUFFER, M. Dietary protein and atherogenesis. **Klinische Wochenschrift**, Berlin, v. 66, n. 4, p. 135-143, 1988.
- BEATON, N. C. Ultrafiltration and reverse osmosis in the dairy industry. an introduction to sanitary conditions. **Jornal of Food Protection**, Ames, v. 42, n. 7, p. 584-590, 1979.
- BEYNEN, A.C. Comparation of the mechanisms proposed to explain the hypocholesterolemic effect of soybean protein versus casein in experimental animals. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 36, p. S87-S93, 1990.
- BIRD, J. The application of membrane systems in the dairy industry. **Journal of the Society of Dairy Technology**, London, v. 49, n. 1, p. 16-23, 1996.
- BIRT, D.F.; BAKER, P.Y.; HRUZA, D.S. Nutritional evaluations of three dietary levels of lactalbumin throughout the lifespan of two generations os Syrian hamsters. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 112, n.11, p. 2151-2160, 1982.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapic method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

- BRENAN, M.F.; CERRA, F.; DALI, J.M.; FISCHER, J.E.; MOLDAWER, L.L.; SMITH, R.J.; WINNARS, E.; WANNEMACHERR, R.; YUNG, V.R. Report on a research workshop: branched-chain amino acids in stress and injury. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Baltimore, 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, Chicago, n. 1, p. 21-28, 1996.
- BOUNOUS, G.; LETORNEAU, L.; KONGSHAVN, P.A.L. Influence of dietary protein type on the immune system of mice. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 113, n. 7, p. 1415-1421, 1983.
- BOUNOUS, G; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical Investigation Medicine**, Berlin, v.14, n. 4, p. 296-309, 1991.
- BOUNOUS, G.; STEVENSON, M.M. KONGSHAVN, P.A.L. Influence of dietary lactalbumin hydrolysate on the immune system of mice and resistance to salmonellosis. **Journal Infections Diseases**, Chicago, v. 144, n. 3, p. 281-282, 1981.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of micogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. **Scientific American**, New York, v. 251, n. 5, p.52-60, 1984.
- CARROL, K.K. Review of clinical studies on cholesterol lowering response to soy protein. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 91, n. 7, p. 820-827, 1991.
- CARROL, K.K.; KUROWSKA, E.M. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. **Journal of Nutrition**, Chicago, v. 125, n. 35, p. 594S-597S, 1995.
- CHAPMAN, M.J. Animal lipoproteins: chemistry, structure and comparative aspects. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 21, n. 7, p. 789-853, 1980.
- 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.M.; BALZOLA, F.; BOUNOUS, G. Modificazioni sulle immunoglobuline A biliari di tipo secretorio on topi nutritive con proteine del siero di latte. **Minerva Dietologia e Gastroenterologia**, Torino, v. 35, n. 2, p. 241-245, 1989.
- DIAS, N.F.G.P. **Desenvolvimento e avaliação de um suplemento alimentar para pré-escolares**. Viçosa, MG.: UFV, 1997. 86 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- 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 of Dairy Science and Technology**, Wellington, v. 16, n.1, p. 69-78, 1981.
- ESFAHANI, M; SWANEY, J.B. **Advances in Cholesterol Research**. 1. ed., New Jersey: Telford, 1990. p. 385-420.
- EVANS, M.T.A.; GORDON, F.G. **Applied Protein Chemistry**. GRAND, R.A. (Ed.) London, Applied Sci. Publishers, 1990.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). **Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation**. Bethesda, Maryland, 1990.
- FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources: a review. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.44, n. 1, p.6-29, 1996.
- FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 28, n. 10, p. 2077-2080, 1982.
- GOMES, F.P. **Curso de Estatística Experimental**. 10. ed., São Paulo: Nobel, 1982. 430 p.
- GURR, M.I. **Role of Fats in Food and Nutrition**. 2. ed. New York: Elsevier Applied Science, 1986. p. 80-93.
- GLOVER, F. A. Modifications to the Composition of Milk. In: ROBINSON, R. K., (Ed.) **Modern Dairy Technology**. v.1. Advances in milk processing. London: Elsevier Applied Science, 1986. p. 235-271.
- GOLDMAN, L.; COOK, E.F. The decline in ischemic heart disease mortality rates. An analysis of the comparative effects of medical interventions and changes in lifestyle. **Annals of International Medicine**, Philadelphia, v. 101, n. 6, p. 825-836, 1984.

- GORDON, D.J., PROBSTFIELD, J.L. GARRISON, R.J., WEATON, J.D.; CASTELI, W.P.; KNOKE, J.D.; JACOBS, D.R. BANGDIWALA, S.; TYROLER, H.A. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. **Circulation**, Texas, v. 79, p. 8-15, 1989.
- GRUNDY, S.M. Role of low-density lipoproteins in atherogenesis and development of conary heart disease a new era. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 41, n. 1, p. 139-146, 1995.
- HAMBRAEUS, L. Nutritional aspects os milk proteins: In: FOX, P.F. (Ed). **Development of Dairy Chemistry**. London: Applied Sciences, 1982. p. 289-313.
- HARRIS, E.D. Lipoprotein (a): a predictor of atherosclerotic disease. **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 3, p. 61-64, 1997.
- HANEMA-AIJER, J. H.; ROBERTSEN, T.; BOOMGAARD, T.H. VAN DEN; GUNNINK, J. W. Fouling of ultrafiltration membranes. The role of protein adsorption and salt precipitation. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 199-217, 1989.
- 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**, Highett, v. 29, n. 3, p. 132-140, 1981.
- HARPER, W.J. Proc. APV Symposium for the soft drink, fruit juice. **Dairy and Food Industries**, Auckland, N.Z. APV, 450 p., 1984.
- HORNE, D.S. Whey proteins. **Journal of the Society of Dairy Technology**, London, v. 53, n. 1, p. 3-4, 1990.
- HUFFMAN, L.M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 49-52, 1996.
- JONG, E. V. **Influência de Dietas Normo e Hiperlipídicas sobre o Perfil Nutricional, Parâmetros Bioquímicos Séricos e Estruturais do Fígado de Ratos Wistar**. Campinas, SP. UNICAMP, 1996. 140p. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, 1996.
- KAJIKAWA, M.; OHTA, T.; TAKASE, M.; KAWASE, K., SHIMAMURA, S., MATSUDA, I. Lactoferrin inhibits cholesterol accumulation in macrophages mediated by acetylated or oxidized low-density lipoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1213, n. 1, p. 82-90, 1994.

- KHACHADURIAN, A.K. Role of cholesterol in atherosclerosis. In: ESFAHANI, M. & SWANEY, J.B. (Eds.). **Advances in cholesterol research**. 1. ed., New Jersey: Telford, 1990. p. 385-420.
- KIM, Y.A.; CHISM, G.W.; MANGINO, M.E. Determination of the beta-lactoglobulina, alfa-lactalbumina and bovine serum albumin of whey protein concentrates and their relationship to protein functionality. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 52, n. 1, p. 124-127, 1989.
- KRITCHEVSKY, D. Vegetable protein and atherosclerosis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 56, n. 3, p. 135-140, 1979.
- KRITCHEVSKY, D. Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, n. 35, p. 589S-593S, 1995.
- 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**, Berne, v. 59, n. 1, p. 93-100, 1989.
- LAWN, R.M. Lipoprotein (a) in heart disease. **Scientific American**, New York, v. 266, n. 6, p. 12-18, 1992.
- LIPPEL, K., S. GIANTURCO, A. FOGELMAN, NESTEL, P.; GRUNDY, S.M.; FISHER, W.; CHAIT, A.; ALBERT, J. ROHEIM, P.S. Lipoprotein Heterogeneity Workshop. **Arteriosclerosis**, Dallas, v. 7, n. 3, p. 315-323, 1987.
- LOVATI, M.R.; WEST, C.E.; SIRTORI, C.R.; BEYNEN, A.C. Dietary animal proteins and cholesterol metabolism in rabbits. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 64, n. 2, p. 473-485, 1990.
- LOVERNE, J.A. Some analytical problems in the analysis of fish and fish products. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, Washington D.C., v. 48, n. 1, p. 60-68, 1965.
- MAHAN, L.K.; ARLIN, M.T. Lipídeos. MAHAN, M.T.; ARLIN, M.T. (Ed.). **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 8. ed. São Paulo: Roca. 1995. p. 40-51.
- MARQUEZ-RUIZ, G.; RICHTER, B.D.; SCHNEEMAN, B.O. Modification of triacylglycerides and apolipoprotein B in rats fed diets containing whole milk, skim milk and milk proteins. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 122, n. 9, p. 1840-1846, 1992.

- MARSHALL, K.R.; HARPER, W.J. Whey protein concentrates. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Philadelphia, n. 233, p. 21-32, 1988.
- MARSHALL, K.R. In: FOX, P.F.(Ed.). **Developments in Dairy Chemistry**. England: Applied Science Publishers, 1982. 383 p.
- MATTHEWS, M.E. Whey protein recovery processes and products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 11, p. 2680-2692, 1984.
- MATTHEWS, M.E.; DOUGHTY, R.K.; SHORT, J.L. Pretreatment of acid casein wheys to improve processing rates in ultrafiltração. **New Zealand Journal Dairy Technology**, Wellington, v.13, n. 14, p. 216-220, 1978.
- MAZZA, G. **Functional foods-biochemical and processing aspects**. Lancaster: Technomic Publishing, 1998. 460 p.
- 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.
- MORR, C.V. Improving the texture and functionality of whey protein concentrate. **Food Technology**, Chicago, v. 46, n. 4, p. 110-108, 1992.
- MORR, C.V., FOEDING, E.A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. **Food Technology**, Chicago, v. 44, n. 4, p. 100-112, 1990.
- 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.
- MORR, C.V.; HA, Y.W. Whey proteins concentrate and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Orlando, v.33, n. 6, p. 431-476, 1993.
- NAGAOKA, S.; KANAMARU, Y.; KUZUYA, Y. Effects of whey protein and casein on the plasma and liver lipids in rats. **Agriculture Biological Chemistry**, Baltimore, v. 55, n. 3, p. 813-818, 1991.
- NAGATA, Y.; TANAKA, K.; SUGANO, M. Further studies on the hipcholesterolemic effect of soyabean protein in rats. **Journal Brazilian of Nutrition**, v. 45, p. 233-241, 1981.

- NEYRA, L.L.C. Efeito da vitamina E em associação com drogas redutoras do colesterol plasmático sobre o perfil lipídico e a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em coelhos hipercolesterolêmicos. Campinas, SP: UNICAMP, 1997. 100 p. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, 1997.
- NORTON, S.A.; BEAMES, C.G.; MAXWELL, C.V.; MORGAN, G.L. Effect os dietary whey upon the serum cholesterol of the pig. **Nutrition Report International**, Los Altos, v. 36, n. 2, p. 273-279, 1987.
- NORUM, K.R. Dietary fat and blood lipids. **Nutrition Reviews**, New York, v. 50, n. 4, p. 10-37, 1992.
- PORTER, M.C.; MICHAELS, A.S. Applications of membrane ultrafiltration to food processing. **Proceedings of the Third International Congress of Food Science and Technology**, p. 462-473, 1970.
- POTTER, S.M. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.125, n. 3, p. 606S-611S, 1995.
- POTTER, S.M. Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 8, p. 231-235, 1998.
- POTTER, S.M.; BAKHIT, R.M.; ESSEX-SORLIE, D.L.; WLINGARTNER, K. E.; CHAPMAN, K.M.; NELSON, R. A. PRABHUDESAI, M. SAVAGE, W. D.; NELSON, A. I.; WINTER, L. W., ERDMAN, J.W. Depression of plasma cholesterol in men by consumption of baked products containing soy protein. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 58, n. 4, p. 501-506, 1993.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY JR., G.C. AIN-93 purified diets for labocamundongsry rodents: report of the american Institute of nutrition ad hoc writing commitee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.
- REITER, B. The biological significance and exploitation of the non-immunoglobulin protective proteins in milk: lysozime, lactoferrin, lactoperoxidase, xanthineoxidase. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Philadelphia, n. 191, p. 2-4, 1985.
- RENNER, E. Effects of agricultural practices on milk and dairy products. In: Karmas and Harris (Eds.). **Nutritional evaluation of food processing**. 3. ed., New York: Van Nostrand Reinhold, 1988. p. 203-224.

- SANTOS, M.M.; MARTINEZ, F.E. Human milk concentrate for preterm infants. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 16, n. 5, p.769-772, 1996.
- SATTERLEE, L.D. Proteins for use in foods. **Food Technology**, Chicago, v. 35, n. 6, 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**, Cambridge, v. 49, n. 3, p. 313-319, 1983.
- SGARBIERI, V.C. Food proteins and peptides presenting specific protection to human health (a review). **Food for health in the pacific rim**. 3. ed. International Conference of Food Science and Technology, Trumbull Conn, USA: Food & Nutrition Press, 1999. p. 335-352.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**. 1.ed. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.
- SIRTORI, C.R.; AGRADI, E.; CONTI, F.; MANTERO, O. GATTI, E. Soybean-protein diet in the treatment of type-II hyperlipoproteinaemia. **Lancet**, London, v. 1, n. 8006, p. 275-277, 1977.
- SMITHERS, G.W.; BALLARD, J.B.; COPELAND, A.D.; KIRTHI, J.S.; 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. 7, 1996.
- SNIDERMAN, A.D. Apolipoprotein B and apolipoprotein A1 as predictors of coronary artery disease. **Canadian Journal Cardiology**, Oakville, v. 4, n. 7, p. 24A-30A, 1988.
- SPACKMAN, D.C.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. **Biochemistry**, New York, v. 30, n. 9, p. 1190-1206, 1958.
- SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, Arlington, v. 39, p. 1412-1415, 1967.
- STAHELIN, H.B.; RITZEL, G. Effect of whey on plasma lipids. **Internation Journal Vitaminology Nutrition Research**, Berne, v. 50, n. 2, p. 229-230, 1979.

- STEBBENS, W.E. An appraisal of cholesterol feeding in experimental atherogenesis. **Progress Cardiovascular Disease**, Orlando, v. 29, n. 2, p. 107-128, 1986.
- STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S. CAREW, T.E., KHOO, J.D.; WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **New England Journal of Medicine**, West Portway, v. 320, n. 14, p. 915-924, 1989.
- STEELE, R.D.; HARPER, A.E. Protein. In: BROWN, M.L. (Ed.). **Present knowledge in Nutrition**, 6. ed., Washington, DC: Nutrition Foundation, 1990. p. 67-79.
- THIJSSSEN, H.A.C.; VAN OYEN, N.S.M. Analysis and economic evaluation of concentration alternatives for liquid foods - quality aspects and costs of concentration. **Journal Food Process Engineering**, Trumbull, v.1, p. 215-240, 1977.
- THOMAS, L.M.; HOLUB, B.J. Nutritional aspects of fats and oils. In: KAMEL, B.S.; KAKUDA, Y. (Eds.). **Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids**. 1.ed., England: Blackie Academic & Professional, 1994. p. 16-49.
- THOMPSON, G. Apoproteins: determinants of lipoprotein metabolism and indices of coronary risk. **British Heart Journal**, London, v. 51, n. 6, p. 585-588, 1984.
- TSENG, E.; POTTER, S.M.; PICCIANO, M.F. Dietary protein source and plasma lipid profiles of infants. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 85, n. 4, p. 548-552, 1990.
- VAHOUNY, G.V.; ADAMSON, I.; CHALCARZ, W.; SATCHITHANANDAM, S.; MUESING, R.; KLURFELD, D.M.; TEPPER, S.A.; SANGHVI, A.; KRITCHEVSKY, D. Effects of casein and soy protein on hepatic and serum lipids and lipoprotein distributions in the rat. **Atherosclerosis**, Limerich, v. 56, n. 2, p. 127-137, 1985.
- VIOTTO, W.H. **Ultrafiltração de soro doce de queijo minas frescal. Efeito de pré-tratamentos do soro no desempenho da membrana e na composição e solubilidade do concentrado protéico de soro**. Campinas, SP: UNICAMP, 1993. 212 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 1993.
- YADAV, N.; LIENER, I.E. Reduction of serum cholesterol in rats fed vegetable protein or an equivalent amino acid mixture. **Nutrition Reports International**, Los Altos, v. 16, n. 4, p. 385-389, 1977.
- YOSHIDA, K.; YAHIRO, M.; AHIKO, K. Effects of addition of arginine, cystine, and glycine to the bovine milk-simulated 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.

- YUAN, Y.V.; KITTS, D.D. Milk product and constituent protein effects on plasma and hepatic lipids and systolic blood pressure of normotensive rats. **Food Research International**, Essex, v. 26, n. 3, p. 173-179, 1993.
- WALKER, A.F. The estimation of protein quality. In: HUDSON, B.J.F. (Ed.). **Developments in Food Proteins - 2**, New York: Applied Science, 1983. p. 293-320.
- WONG, D.W.S.; CAMIRANT, W.M.; PAVLATH, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Orlando, v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.
- ZHANG, X.; BEYNEN, A.C. Influence of dietary fish proteins on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 69, n. 4, p. 767-777, 1993.