

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**  
**GABRIEL INÁCIO DE MORAIS HONORATO DE SOUZA**

**HETEROCOAGULAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DE  
LEITE EM QUITOSANA: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
HIPOLIPIDÊMICO EM CAMUNDONGOS**

**MOGI DAS CRUZES, SP**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**  
**GABRIEL INÁCIO DE MORAIS HONORATO DE SOUZA**

**HETEROCOAGULAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DE  
LEITE EM QUITOSANA: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
HIPOLIPIDÊMICO EM CAMUNDONGOS**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Esposito**

Dissertação apresentada ao mestrado em biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Área de concentração:**

Biotecnologia aplicada a Saúde

**MOGI DAS CRUZES, SP**

**2009**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Souza, Gabriel Inácio de Moraes Honorato de

Heterocoagulação de proteínas do soro de leite em quitosana : avaliação do potencial hipolipidêmico em camundongos / Gabriel Inácio de Moraes Honorato de Souza. – 2009.

90 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -  
Universidade de Mogi das Cruzes, 2009

Área de concentração: Biotecnologia aplicada à  
saúde

Orientador: Profª. Drª. Elisa Esposito

1. Leite - Soro 2. Quitosana 3. Heterocoagulação  
4. Metabolismo lipídico 5. Medicina Experimental I.  
Esposito, Elisa

CDD 619.93

**ATAS**

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**

Às catorze horas do dia vinte e nove de maio de dois mil e nove, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Coacervação de proteínas do soro de leite em quitosana: avaliação do potencial hipolipidêmico em camundongos" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Gabriel Inácio de Moraes Honorato de Souza**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Elisa Esposito e Flávio Aparecido Rodrigues da Universidade de Mogi das Cruzes e Lila Missae Oyama da Universidade Federal de São Paulo, sob a presidência do(a) primeiro(a), como orientador(a) da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO por UNANIMIDADE  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 29 de maio de 2009.

Comissão Examinadora

Julgamento

Elisa Esposito  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisa Esposito

APROVADO  
(aprovado(a)/reprovado(a))

Flávio Rodrigues  
Prof. Dr. Flávio Aparecido Rodrigues

aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

Lila Missae Oyama  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lila Missae Oyama

aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

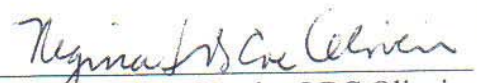
## ADENDO

ADENDO À ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às catorze horas do dia vinte e nove de maio de dois mil e nove, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação “Coacervação de proteínas do soro de leite em quitosana: avaliação do potencial hipolipidêmico em camundongos” para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Gabriel Inácio de Moraes Honorato de Souza**.

Em adendo, o título da dissertação, conforme sugestão da banca, foi alterado para “Heterocoagulação de proteínas do leite em quitosana: Avaliação do potencial hipolipidêmico em camundongos”, o que deverá constar nas cópias definitivas da dissertação.

Mogi das Cruzes, 29 de maio de 2009

  
Prof.ª Dr.ª Regina LBC Oliveira  
Coordenadora do Programa  
Pós-Graduação em Biotecnologia

## **Dedico esse trabalho**

**À minha amada mãe, Maria Nadir Soares de Moraes de Souza, à minha tia Íris Pereira de Moraes, aos meus queridos irmãos Sandra Paola e José Tadeu e ao meu primo Diego Bruno, pelo infinito amor, força e incentivo que se transformaram em luz para esse trabalho.**

**À minha orientadora Elisa Esposito, pelo apoio nas horas mais difíceis em que enfrentei e pelas idéias que sempre estavam em sintonia perfeita.**

**Aos meus queridos e verdadeiros amigos, que sempre estiveram ao meu lado como uma segunda família.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder forças para aprender e viver a cada dia.

A minha orientadora Elisa Esposito, pela paciência, exigência, compreensão e, principalmente, pelo apoio nos momentos difíceis, pois quanto tudo parecia perdido e os obstáculos insuperáveis, me incentivou a criar forças e continuar.

A minha família que é a razão de minha vida.

À Universidade de Mogi das Cruzes pelo espaço concedido e a oportunidade oferecia para realização desse trabalho.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro concedido.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo financiamento do projeto.

À professora Renata Guimarães Moreira, pela disponibilidade de seu laboratório, pelos seus ensinamentos e pela atenção prestadas.

À professora Astrea Filomena, pelo espaço concedido em seu laboratório e seus ensinamentos.

À professora Lila Missae Oyama, pelo auxílio na formulação das dietas e pelos ensinamentos direcionados.

Ao técnico Fábio Fernandes Carvalho do Laboratório de Química Biológica e Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes, pelo apoio e aprendizado.

Ao técnico Bruno Cavalheiro Juliane Suzuki e Cirstiéle Ribeiro do Laboratório Fisiologia de Reprodução de Peixes no IB-USP pelo apoio e ensinamentos.

Aos meus amigos, que foram peças preciosas e fundamentais para esse trabalho. Bruno, Juliane Suzuki, Aline, Carlos Eduardo, Cirstiéle, Renato Honji, Jandyr, Paulo, Vanessa, Joel, Daniel, Daniel Gil, Sara, Paola, Leandro Suzuki, Larissa Suzuki, Alexandre, Clarissa, Luiz Fabiano e aqueles tiveram participação direta e indireta nesse trabalho. Agradeço-os pelos maravilhosos momentos vividos e que continuaremos a viver até o fim de nossas vidas. Galera muito obrigado!



*“Abandone suas idéias fixas. Então você será capaz de desfrutar mais a confusão. E ela não será confusão, mas um caos criativo. Precisamos de um caos criativo no coração para dar à luz estrelas dançantes. Não há outra maneira”.*

**(OSHO)**

## RESUMO

A obesidade é um dos maiores problemas de saúde mundial, desta forma, desenvolver novos alimentos funcionais que visam controlar ou diminuir esse problema se tornaram um grande desafio para a indústria nutracêutica. Os objetivos foram avaliar os efeitos de um heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro do leite) como um alimento funcional como um agente hipolipidêmico. Foram utilizados 18 camundongos adultos *Swiss* machos divididos em 3 grupos: Dieta hipercolesterolemiantes com heterocoagulado (PSQHcol), hipercolesterolemiantes com caseína (Hcol), e dieta normocalórica (Ncal). Houve redução de peso corporal em PSQHcol e o perfil lipídico nesse grupo permaneceu baixo em todos os parâmetros bioquímicos avaliados além de diminuir a formação de tecido adiposo e aumentar a concentração protéica no músculo gastrocnêmio. Os ácidos graxos saturados e polinsaturados das triglicérides de PSQHcol apresentaram menores valores em todos os tecidos no grupo alimentado com proteínas do soro, enquanto que os ácidos graxos monoinsaturados apresentaram-se em maior proporção. Os ácidos graxos monoinsaturados dos fosfolípidios foram maiores em PSQHcol sendo que, o músculo gastrocnêmio apresentou maior concentração de ácido graxo polinsaturado ômega 3 (ácido docosahexaenóico) e, no fígado, maiores concentrações de ácidos graxos monoinsaturados. Foi possível obter um heterocoagulado de proteínas do soro de leite com quitosana com proteínas de alto valor nutricional. A dieta contendo o heterocoagulado apresentou importantes propriedades hipocolesteremiantes.

**Palavras-chave:** Soro do Leite, Quitosana, Heterocoagulação, Metabolismo lipídico, Medicina Experimental.

## ABSTRACT

The obesity is one of the world's largest health problems, thus developing new functional foods aimed at controlling or decrease this issue became a major challenge for nutraceutical industry. The goals were to assess the effects of a heterocoagulated (chitosan/whey milk proteins) as a functional food hypolipidemic agent. Eighteen adult Swiss males were used and divided into 3 groups: hypercholesterolemic with heterocoagulated diet (PSQHcol), hypercholesterolemic with casein (Hcol), and normocaloric (Ncal) diet. A body weight and lipid reductions it was observed in PSQHcol. The lipidic profile in this group also showed a decrease in all biochemical parameters, besides adiposity tissue reduction with concomitant increase in protein concentration in gastrocnemius muscle. The saturated and poly unsaturated fatty acids of triglycerides of PSQHcol presented lowest values in all tissues in the Group whey proteins, whereas mono unsaturated fatty acids were submitted to a greater proportion. Fatty acids were larger mono unsaturated of phospholipids in PSQHcol and the gastrocnemius muscle presented greater concentration of omega 3 fatty acid poly unsaturated (Docosahexaenoic acid) and the liver, the largest concentrations was the mono unsaturated fatty acids. It was possible to obtain a heterocoagulated from whey proteins and chitosan extrated protein with high nutritional value. The diet containing hypocholesterolemiate heterocoagulated presented important properties. It was possible obtain a whey proteins heterocoagulated with chitosan. These heterocoagulated contain high nutritional value proteins and important hypercholesterolemic properties.

**Palavras-chave:** Milk whey, chitosan, heterocoagulated, hypercholesterolemic, lipid metabolism, experimental medicine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Estrutura química dos biopolímeros de maior ocorrência na natureza. Grupo funcional (ilustrado no círculo). Em (1) Quitina; (2) quitosana e (3) Celulose. (THARANATHAN et al.,2003) \_\_\_\_\_ 24
- Figura 2:** Efeito do pH na precipitação de proteínas totais do soro de leite por adição de 0,25mg/mL de quitosana. Desvio padrão dos valores (n=15). (\*) Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05). \_\_\_\_\_ 38
- Figura 3:** Efeito do pH na precipitação de proteínas totais do soro de leite por adição de 75mg/mL de quitosana. Desvio padrão dos valores (n=15). (\*) Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0.05). \_\_\_\_\_ 39
- Figura 4:** Efeito do pH na formação do sistema de duas fases em solução de quitosana 0,75mg/mL e soro de leite (1:1). Em a (pH 3,5), b (pH 4,0) e d (pH 5,0) podemos observar uma possível interação homogênea estável, em que às proteínas e a quitosana apresentam co-solúveis. Em c (pH 4,5), os componentes (proteínas/quitosana) encontram-se em uma mesma fase. \_\_\_\_\_ 40
- Figura 5:** Efeito do pH na precipitação de proteínas totais do soro de leite por adição de 1,50mg/mL de quitosana. Desvio padrão dos valores (n=15). (\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05). \_\_\_\_\_ 41
- Figura 6:** Efeito do pH na precipitação de proteínas totais do soro de leite por adição de 2,25mg/mL de quitosana. Desvio padrão dos valores (n=15). (\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05). \_\_\_\_\_ 41
- Figura 7:** Efeito do pH na precipitação de proteínas totais do soro de leite comparando todas as concentrações em função do pH 4,5. Desvio padrão dos valores (n=15). (\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05). \_\_\_\_\_ 42
- Figura 8:** Efeito do pH na redução de turbidez do soro in natura em adição de 0,75mg/mL de quitosana. SIN representa soro in natura com densidade ótica (D.O) < 3,0. \_\_\_\_\_ 43
- Figura 9:** Perfil eletroforético da concentração 0,75mg/mL em pH4,5. SDS-Page, em gel 12,5% de poli(acrilamida) nas concentrações 300, 200, 100 e 50ng de heterocoagulado (quitosana/proteínas).

Padrões:  $\alpha$ -la= alfa-lactoalbumina (14Kd),  $\beta$ -Lg= beta-Lactoglobulina (18Kd),  $\beta$ -ca= beta-caseína e BSA= Albumina bovina (66Kd). \_\_\_\_\_ 44

**Figura 10:** Variação da conformação da beta-lactoglobulina em função do pH (adaptado de RODRIGUES 1997). \_\_\_\_\_ 45

**Figura 11:** Média  $\pm$  desvio padrão N=6. Efeito da dieta no perfil lipídico plasmático em camundongos (mg/dL). Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. \_\_\_\_\_ 51

**Figura 12:** Média  $\pm$  desvio padrão N=6. Efeito da dieta no perfil lipídico tecidual em camundongos. Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. Lipídios totais do fígado (FIG), músculo gastrocnêmio(GAST) e tecido adiposo branco epididimal (EPI). \_\_\_\_\_ 54

**Figura 13:** Inibição da lipogênese nos adipócitos por Cálcio. Modificado de Zemel et al., (2000)\_\_ 56

**Figura 14:** Média  $\pm$  desvio padrão N=3. Efeito da dieta no peso relativo tecidual em camundongos. Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com coaservado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. Fígado (FIG), músculo gastrocnêmio(GAST) e tecido adiposo branco epididimal (EPI). 57

**Figura 15:** Média  $\pm$  desvio padrão N=3. Efeito da dieta sobre a glicemia após 16h de jejum em camundongos. Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. Fígado (FIG), músculo gastrocnêmio(GAST) e tecido adiposo branco epididimal (EPI). 59

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Distribuição (% p/v) dos componentes do leite no queijo e no soro (adaptado de KIRK e SAWYER, 1991 citado por RODRIGUES et al., 2001). \_\_\_\_\_ 15
- Tabela 2:** Composição média de aminoácidos presente no soro e caseína concentrado. \_\_\_\_\_ 19
- Tabela 3:** Composição nutricional (g.kg<sup>-1</sup>) das dietas fornecidas aos camundongos jovens. \_\_\_\_\_ 32
- Tabela 4:** Composição de ácidos graxos das dietas (%) formuladas. \_\_\_\_\_ 48
- Tabela 5:** Peso inicial (PI), peso final (PF), delta da massa corporal e ingestão protéica (IP)<sup>1</sup> para grupos de camundongos alimentados com caseína hipercolesterolemiantes (Hcol), heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes (PSQHcol) e normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. \_\_\_\_\_ 50
- Tabela 6:** Comparação entre as dietas hipercolesterolemiantes contendo quitosana (Q) v. proteínas do soro (W) de diferentes autores. \_\_\_\_\_ 52
- Tabela 7:** Média ± desvio padrão N=3. Efeito da dieta na concentração protéica do fígado e músculo gastrocnêmio (mg/g), em camundongos. Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol – dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. Fígado (FIG), músculo gastrocnêmio(GAST). \_\_\_\_\_ 58
- Tabela 8:** Tabela 8: Distribuição das concentrações percentual de ácidos graxos neutros individuais, como também o índice de insaturação no tecido adiposo epididimal (EPI) nos grupos Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. \_\_\_\_\_ 62
- Tabela 9:** Distribuição das concentrações percentual de ácidos graxos neutros individuais, como também o índice de insaturação músculo gastrocnêmio (GAST) nos grupos Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. \_\_\_\_\_ 63
- Tabela 10:** Distribuição das concentrações percentual de ácidos graxos neutros individuais, como também o índice de insaturação no fígado (FIG) nos grupos Hcol - dieta com caseína

hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. \_\_\_\_\_ 64

**Tabela 11:** Distribuição das concentrações percentual de ácidos graxos polares individuais, como também o índice de insaturação e atividade estimada das enzimas desaturases e alongase do tecido adiposo epididimal (EPI) nos grupos Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/ proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. \_\_\_\_\_ 67

**Tabela 12:** Distribuição das concentrações percentual de ácidos graxos polares individuais, como também o índice de insaturação e atividade estimada das enzimas desaturases e alongase do músculo gastrocnêmio (GAST) nos grupos Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. \_\_\_\_\_ 68

**Tabela 13:** Distribuição das concentrações percentual de ácidos graxos polares individuais, como também o índice de insaturação e atividade estimada das enzimas desaturases e alongase do fígado (FIG) nos grupos Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. \_\_\_\_\_ 69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(1,25(OH)<sub>2</sub>D) - Hormônio calcitrópico 1,25 hidroxicolecalciferol  
BLG - Beta-lactoglobulina  
ACAT - Enzima acil-CoA: colesterol aciltransferase  
AIN - The American Institute of Nutrition  
AL - Enzima alongase  
ALA - Alfa-lactoalbumina  
BCAA - Aminoácidos de cadeia ramificada  
BQO - Demanda química de oxigênio  
BSA - Albumina do soro bovino  
CCK - Hormônio colecistoquinina  
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
CTP - Colesterol total plasmático  
D.O - Densidade ótica  
D5 - Enzima dessaturase  $\Delta$ 5  
D6 - Enzima dessaturase  $\Delta$ 6  
D9-C16 - Enzima dessaturase  $\Delta$ 9-C16  
D9-C18 - Enzima dessaturase  $\Delta$ 9-C18  
DBO - Demanda biológica de oxigênio  
eIF4F - Eukaryotic translation initiation factor 4F  
EPI - Tecido adiposo branco epididimal  
FAO/WHO - Food and Agriculture Organization/World Health Organization  
FIG - Fígado  
GAST - Músculo gastrocnêmio  
GD - Grau de desacetilação  
GMP - Glicomacropéptídeos  
Hcol - Dieta com caseína hipercolesterolemiantes  
HDL - High Density Lipoprotein  
Ig's - Imunoglobulinas  
IGF-1 - Insulin-like growth factor 1  
IGF-2 - Insulin-like growth factor 2  
LDL - Low density lipoprotein  
LTP - Lipídios totais plasmáticos  
MUFA - Ácidos graxos monoinsaturados  
Ncal - Dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial.  
pI - Ponto isoelétrico  
PSQHcol - Dieta com coacervado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes  
PTP - Proteínas totais plasmáticas  
PUFAs - Ácidos graxos polinsaturados  
PUFAs n-3 - Ácidos graxos polinsaturados ômega 3  
PUFAs n-6 - Ácidos graxos polinsaturados ômega 6  
RNAm - RNA mensageiro  
S6K1 - Proteína quinase ribossomal S6  
SFA - Ácidos graxos saturados  
TG - Triglicérides  
U/S - Proporção insaturado/saturado  
UI - Índice de insaturação  
VLDL - Very low density lipoprotein.



# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Soro de queijo</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Proteínas do soro do leite e seus benefícios</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Efeitos sobre o anabolismo muscular</b>	<b>21</b>
<b>1.4 Efeitos hipolipidemiante das proteínas do soro</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Recuperação das proteínas do soro por quitosana: novos alimentos funcionais.</b>	<b>24</b>
<b>1.6 Influência dos ácidos graxos saturados no metabolismo Lipídico</b>	<b>26</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Geral</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Específicos: fase 1</b>	<b>28</b>
<b>2.3 Específicos: fase 2</b>	<b>28</b>
<b>3. Método</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Heterocoagulação</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Escalamento do processo de Heterocoagulação</b>	<b>31</b>
<b>3.3 Animais</b>	<b>31</b>
<b>3.4 Dietas</b>	<b>32</b>
<b>3.5 Avaliações bioquímicas e coletas de amostras</b>	<b>33</b>
<b>3.6 Determinação do perfil de ácidos graxos dos tecidos</b>	<b>33</b>
<b>3.7 Protocolo de extração e determinação de lipídeos totais</b>	<b>34</b>
<b>3.8 Protocolo de cromatografia de coluna para separação dos lipídios neutros e polares</b>	<b>35</b>
<b>3.9 Protocolo para determinação do Perfil de ácidos graxos</b>	<b>35</b>
<b>3.10 Análise de proteínas totais dos tecidos</b>	<b>36</b>
<b>3.11 Análise estatística</b>	<b>36</b>

<b>3.12</b>	<b>Cálculos e atividades estimadas das dessaturases e alongase</b>	<b>36</b>
<b>I.</b>	<b>Separação das frações protéicas por heterocoagulação eletrostática em quitosana:</b>	
<b>Fase 1</b>		<b>37</b>
<b>4.</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Heterocoagulação</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Perfil eletroforético SDS-PAGE.</b>	<b>43</b>
<b>II.</b>	<b>Aplicação do heterocoagulado na nutrição de camundongos hipercolesterolêmicos: Fase 2</b>	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>Caracterização lipídica das dietas</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>Perfil alimentar e nutricional</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>Parâmetros bioquímicos</b>	<b>50</b>
<b>9.</b>	<b>Perfil de ácidos graxos neutros e polares</b>	<b>59</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusões e sugestões</b>	<b>71</b>
<b>11.</b>	<b>Referências</b>	<b>72</b>

# 1. Introdução

## 1.1 Soro de queijo

O leite é considerado um dos alimentos mais completos, sendo o mesmo direcionado às indústrias como matéria prima para formulação de inúmeros produtos derivados. Contudo, quando esse produto é direcionado à fabricação de queijos, para obtenção da caseína comercial, aproximadamente 85 a 95% de seu volume total é retirado sob forma de soro, ou seja, a cada 10 litros de leite são produzidos cerca de 1 quilograma de queijo e 9 litros de soro. Este volume é constituído por lipídios, compostos nitrogenados, lactose e de sais, sendo portanto, um subproduto valioso, pois possui um teor de proteínas solúveis de composição elevada em aminoácidos essenciais, principalmente os sulfurados, semelhante em composição as do leite humano (NEVES *et al.*, 2001; PACHECO *et al.*, 2002; CAPITANI, 2001; MONZÓN e OLANO, 1977 ).

Apesar de ser um subproduto nutricionalmente rico, este é minimamente aproveitado, e volumes consideravelmente grandes ainda são descartados ou direcionados para outros fins, como, por exemplo, direcionado a alimentação de suínos. Também são direcionados a sistemas de tratamento de efluentes com baixa eficiência permanecendo no remanescente do tratamento uma alta taxa orgânica, contaminando drasticamente corpos receptores; o que gera problemas ambientais com a demanda bioquímica de oxigênio entre 30.000 e 50.000 mg/L (HOSSEINI *et al.*, 2003).

Os componentes do soro são essencialmente lactose, proteínas e minerais e o conteúdo em gordura pode variar entre 0,5-4,4%, dependendo do tipo de leite empregado e do processo de fabricação do queijo. No entanto, esta gordura pode ser aproveitada, retornando ao processo de produção de queijo ou sendo processada em manteiga (JELEN *et al.*, 1992).

Embora o soro possua normalmente estas características em sua composição, esta pode variar com o tipo de tratamento a que o leite é submetido (aquecimento, centrifugação, homogeneização), com o processo de fabricação de queijo ou caseínas e com o tratamento que o soro sofre após estar separado do coalho (pasteurização, pré-concentração e remoção de partículas de caseína). A Tabela 1 mostra a composição básica do leite, queijo e soro.

Tabela 1: Distribuição (% p/v) dos componentes do leite no queijo e no soro (adaptado de KIRK e SAWYER, 1991 citado por RODRIGUES *et al.*, 2001).

<b>Componente</b>	<b>Leite (%)</b>	<b>Queijo (%)</b>	<b>Soro (%)</b>
Água	87,3	6,5	80,8
Gordura	3,7	3,5	0,2
Lactose	4,7	0,3	4,4
Caseínas	3	2,6	0,4
Proteínas do soro	0,4	Vestígios	0,4
Minerais	0,7	0,1	0,6

As caseínas são encontradas no leite sob a forma de grandes micelas. Estas são empregadas na produção de queijo, embora possam também ser incorporadas em diversos produtos industriais (ZYDNEY, 1998), podendo ainda ser usadas para a preparação de peptídeos biologicamente ativos, para aplicação em suplementos dietéticos ou como drogas naturais (por exemplo, a  $\beta$ -casomorfina) (RODRIGUES *et al.*, 2001).

Na coagulação ácida, o pH decresce quer por fermentação microbiana da lactose presente no leite em ácido láctico, quer por adição direta de ácidos minerais ou orgânicos (BANKS *et al.*, 1998). O soro resultante deste processo é designado por soro ácido (pH máximo 5,1). Em contraste, o soro doce obtido a partir do coágulo de leite formado por ação enzimática, a  $\text{pH} > 6,0$ , contém um teor de ácido láctico muito baixo. No entanto, o conteúdo deste ácido pode aumentar drasticamente se a fermentação bacteriana não for controlada rapidamente por pasteurização e/ou arrefecimento rápido.

Quando o coágulo tiver a consistência desejada, é cortado ou partido, para se proceder à remoção do soro, por um processo que envolve tratamento térmico e ajuste do pH (RODRIGUES *et al.*, 2001).

## 1.2 Proteínas do soro do leite e seus benefícios

Pessoas que possuem um estilo de vida fisicamente ativa, como esportistas, e também pessoas portadores de doenças, vêm buscando benefícios nessa fonte protéica. Evidências recentes sustentam o fato de que as proteínas do leite, incluindo as proteínas do soro, além de seu alto valor biológico, possuem peptídeos bioativos, que atuam como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, reguladores da função imune, assim como fatores de crescimento (HARAGUCHI *et al.*, 2006).

As proteínas do soro contêm pontes dissulfeto e apresentam característica globular conferindo às mesmas, estabilidade estrutural. As frações, ou peptídeos do soro, são constituídos de: beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glicomacropéptídeos (GMP). Essas frações variam em tamanho, massa molar e função, conferindo às proteínas do soro características especiais (HARAGUCHI *et al.*, 2006; BRINK *et al.*, 1998).

As proteínas de soro são de fácil digestão e seu perfil de aminoácidos essenciais atende ou supera todas as exigências qualitativas e quantitativas estabelecidas pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (Food and Agriculture Organization/World Health Organization FAO/WHO). Conhecidas como fontes protéicas de alta qualidade nutricional, as proteínas do soro do leite isoladas também se caracterizam pelo conjunto dos atributos funcionais e nutricionais. O desenvolvimento e o aperfeiçoamento das tecnologias de separação e purificação permitiram melhorar os conhecimentos sobre os efeitos imunomodulatórios das proteínas do soro. Animais alimentados com rações elaboradas com soro como fonte principal de proteína resistiram muito melhor ao câncer induzido por substâncias químicas do que animais alimentados com soja ou caseína. Existe uma relação direta entre as características funcionais e nutricionais das proteínas de soro e sua estrutura e funções biológicas. Cada tipo de proteína possui várias destas características (BOUNOUS *et al.*, 1991<sup>a</sup>; KENNEDY *et al.*, 1995).

A rápida digestão das frações protéicas do soro exerce uma elevação nos teores plasmáticos de aminoácidos essenciais de maneira rápida atingindo picos considerados altos, chegando a seu pico máximo em torno de 60 minutos após a ingestão. A elevação desses teores de aminoácidos essenciais, principalmente a leucina, é considerada um eficiente estímulo na síntese global de proteínas.

A BLG é o peptídeo de maior tamanho presente no soro (45,0%-57,0%), representando, no leite bovino, cerca de 3,2g/L. Apresenta média massa molar (18,4-36,8kDa), o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo, portanto, absorvida no intestino delgado. Dentre todos os peptídeos encontrados no soro esse é o que apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), com cerca de 25,1%.

Esta proteína liga íons importantes como cálcio e zinco que representam um importante papel no sistema nervoso central. A sua seqüência de aminoácidos apresenta homologia seqüencial parcial com determinadas proteínas capazes de ligar retinol (DE WIT, 1998). A cadeia de  $\beta$ -lactoglobulina possui vários pontos de ligação para minerais, vitaminas lipossolúveis e lipídios. Estes pontos de ligação podem ser usados para incorporar compostos lipofílicos desejáveis como tocoferol e vitamina A em produtos com baixo teor de gordura (DE WIT, 1998).

A ALA é o segundo peptídeo em maior quantidade presente no soro (15%-25%) e o principal do leite humano (SHANNON *et al.*, 2003). Por possuir massa molar de 14,2kDa, apresenta uma fácil e rápida digestão. Contêm o maior teor de triptofano (6%) entre todas as fontes protéicas alimentares, sendo, também, rica em lisina, leucina, treonina e cistina (KINSELLA *et al.*, 1989; MARKUS *et al.*, 2002).

Setenta por cento das proteínas presentes em leite humano possuem as mesmas características das proteínas do soro, e a ALA representa 41% dessas características. A suplementação de ALA tem sido ardorosamente defendida como forma de disponibilizá-la para o consumo humano e criar outros produtos para pessoas que consomem ou podem ingerir apenas quantidades limitadas de proteínas (HEINE *et al.*, 1991).

A BSA corresponde a cerca de 10% das proteínas do soro do leite. É um peptídeo de alta massa molar (66kD), rico em cistina (aproximadamente 6%), e relevante precursor da síntese de glutatona. Possui afinidade por ácidos graxos livres e outros lipídeos, favorecendo seu transporte na corrente sanguínea (SALZANO *et al.*, 2002; DE WIT, 1998).

A BSA e as Ig's são duas proteínas consideradas proteínas secundárias ou menores por estarem presentes em quantidades muito pequenas no soro. As Ig's são proteínas de elevada massa molar (150 -1.000kDa). Quatro das cinco classes das Ig's estão presentes no leite bovino (IgG, IgA, IgM e IgE), sendo a IgG a principal, constituindo cerca de 80% do total. No leite humano, a IgA constitui a principal imunoglobulina (>90%). Suas principais ações biológicas residem na imunidade passiva e atividade antioxidante (SALZANO, *et al.*, 2002; LÖNNERDAL *et al.*, 2003; DE WIT, *et al.*, 1998; HA E, *et al.*, 2003) e estas proteínas

reforçam a imunidade passiva de crianças e outros consumidores. As imunoglobulinas são encontradas no colostro em concentrações maiores do que em leite comum (BOUNOUS *et al.*, 1991).

O GMP (6,7kDa) é um peptídeo resistente ao calor, à digestão assim como a mudanças de pH. Esta proteína está presente em soro doce após a degradação da  $\alpha$ -caseína e a precipitação da caseína pela renina. Esta proteína não ocorre em soro ácido, pois quando as caseínas são precipitadas pela redução do pH a 4,6 esta se desnatura (YUN *et al.*, 1996). O GMP tem a bioatividade de suprimir o apetite estimulando as células I da mucosa duodenal a liberar o hormônio colecistocinina (CCK) (BEUCHER *et al.*, 1994; HALL *et al.*, 2003). Além disso, o GMP altera a produção de pigmentos pelos melanócitos, atuando como prebiótico com ação imunomoduladora. A atividade fisiológica depende do grau de glicolisação.

Curiosamente, muitos autores não descrevem o GMP como um peptídeo do soro. Essa fração está presente em um tipo de proteína do soro, conhecida como *why renne*. A mesma apresenta alta carga negativa, que favorece a absorção de minerais pelo epitélio intestinal, e, assim como a fração BLG, possui alto teor de aminoácidos essenciais (47%). As sub-frações ou peptídeos secundários das proteínas do soro são assim denominadas por se apresentarem em pequenas concentrações no leite, compreendendo as sub-frações: lactoferrina, beta-microglobulinas, gama-globulinas, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, relaxina, lactofano, fatores de crescimento IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) e IGF-2 (Insulin-like growth factor 2), proteoses-peptonas e aminoácidos livres. As subfrações lactoferrina, lisozima, lactoperoxidase, encontradas no leite humano, fornecem propriedades antimicrobianas importantes para o recém-nascido, assim como os fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2, que estão relacionados com o desenvolvimento do tubo digestivo.

A lactoferrina é uma proteína com bioatividade importante. Ela possui a capacidade de se ligar e transportar ferro promovendo a absorção do metal sem provocar constipação em crianças pequenas, como ocorre com os suplementos inorgânicos de ferro. A lactoferrina libera o ferro deixando-o disponível para ser absorvida pelo organismo (TOMITA *et al.*, 1998).

A lactoferrina já vem sendo amplamente usada no Japão, na Coreia e em outros países asiáticos em suplementos para crianças, jovens e adultos (WALZEM *et al.*, 1999). Esta proteína ainda possui outras propriedades, como efeitos antioxidantes, fortalecimento do sistema imunológico e efeitos anti-câncer (YHOO *at al.*, 1997). Esta capacidade de ligar o ferro permite a inibição e desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, com concomitante aumento da atividade microbiana desejável, mediante a inibição de

enterobactérias patogênicas (KUWATA *et al.*, 1998). A atividade bacteriostática da lactoferrina foi estudada visando o uso potencial da substância como conservante (TOMITA *et al.*, 1998).

A lactoferricina, um peptídeo básico derivado da lactoferrina, possui efeito antagonista frente à proliferação de microrganismos intestinais patogênicos. A lactoperoxidase é uma enzima que degrada o peróxido de hidrogênio. Este componente nutracêutico do leite e de produtos de soro é uma enzima com propriedades antibacterianas (HOOGENDOORN *et al.*, 1977). A lactoperoxidase tem sido objeto de vários estudos visando sua utilização como meio de controlar o desenvolvimento da acidez e mudanças de pH durante a estocagem refrigerada de iogurte. A lactoperoxidase também está sendo estudada quanto à possibilidade de ser utilizada como conservante natural. Em combinação com outros conservantes, a lactoperoxidase é usada como ingrediente em pasta de dente para combater cáries (YHOO *et al.*, 1997b).

Segundo Salzano *et al* (2002), 100g de concentrado protéico do soro do leite possui, em média, 414kcal, 80g de proteína, 7g de gordura e 8g de carboidratos.

Na Tabela 2 apresenta a composição média de aminoácidos presente no soro e caseína.

Tabela 2: Composição média de aminoácidos presente no soro e caseína concentrado.

Perfil de aminoácidos	Soro*	Caseína*
Alanina	48	31
Arginina	23	38
Ácido aspártico	102	73
Cisteína	12	4
Ácido glutâmico	172	223
Glicina	20	19
Histidina	16	32
<b>Isoleucina</b>	<b>84</b>	<b>58</b>
<b>Leucina</b>	<b>105</b>	<b>101</b>
Lisina	91	83
Metionina	16	30
Fenilalanina	31	54
Prolina	61	105
Serina	52	63
Treonina	62	46



Triptofano	21	14
Tirosina	24	58
<b>Valina</b>	<b>60</b>	<b>74</b>

---

BCAA: isoleucina, leucina e valina (negrito).

\*números de resíduos.

Os BCAA perfazem 21,2% e todos os aminoácidos essenciais constituem 42,7%. E esses teores se encontram em quantidades acima da média atribuída pela FAO quando comparados àqueles de outras fontes protéicas, conferindo às proteínas do soro propriedades funcionais e nutricionais importantes. Em relação aos micronutrientes, estão presentes em média, 1,2mg de ferro, 170mg de sódio e 600mg de cálcio por 100g de concentrado protéico.

Os primeiros a utilizarem o soro como fonte de muitos compostos com propriedades bioativas foram o Japão e a Europa (WALZEM, 1999). Várias funções ou atividades fisiológicas têm sido descobertas ou atribuídas às proteínas e aos peptídeos secundários do soro. Estes componentes podem aumentar a proteção passiva contra infecções; modular processos digestivos e metabólicos; e atuar como fatores de crescimento para diferentes tipos de células, tecidos e órgãos (ROGERS *et al.*, 1995; HOWARTH *et al.*, 1996).

Os principais componentes do soro com propriedades bioativas para serem agregadas em produtos comerciais incluem a alfa-lactoalbumina, a beta-lactoglobulina, a albumina sérica bovina, as imunoglobulinas, a lactoferrina e a lactoperoxidase. Essas proteínas possuem uma eficiente atividade biológica que pode ser aproveitadas empregando em produtos nutracêuticos ou antimicrobianas conferindo às mesmas grandes vantagens sobre a saúde humana. Além de tudo, substâncias resultantes da degradação ou digestão das proteínas do leite definidos como peptídeos bioativos, tais como as exorfina (casomorfina), os fosfopeptídeos e os imunopeptídeos são liberados. As seqüências dos peptídeos bioativos se encontram em estado inativo quando inseridas na cadeia polipeptídica da proteína de soro intacta. Estes peptídeos, formados após a quebra das proteínas de soro, podem estar envolvidos na regulação da entrada de nutrientes como também pode fornecer maior excursão de aminoácidos plasmáticos, suprimindo, desta forma, o apetite através da estimulação de hormônios peptídeos gastrointestinais (BOIRIE *et al* 1997).

São muitos os benefícios terapêuticos que as proteínas do soro conferem à saúde humana, incluindo desde um eficiente supressor de apetite (HALL *et al.*, 2003) até um eficiente estimulante de síntese muscular e redutor de gordura corporal (ANTHONY *et al.*, 2001; ZEMEL, 2004).

### 1.3 Efeitos sobre o anabolismo muscular

Existem diferentes vias pelas quais as propriedades bioativas das proteínas do soro beneficiam a hipertrofia muscular e o ganho de força corporal, auxiliando, dessa forma, no exercício e no desempenho físico. A quantidade e o tipo de proteína ou de aminoácido, fornecidos antes ou após o exercício, influenciam a síntese protéica nos tecidos musculares (WOLFE. 2002). Kinball (2002) demonstrou que somente os aminoácidos essenciais, principalmente a leucina, são necessários para estimular a síntese protéica (KIMBALL 2002, ANTHONY *et al.* 2001). van Loon *et al.* (2000) demonstraram que a ingestão de um concentrado protéico do soro e carboidratos aumenta significativamente as concentrações plasmáticas de sete aminoácidos essenciais, incluindo os de cadeias ramificadas (BCAA), em comparação à caseína. Anthony *et al.* (2001) propuseram que a leucina possui um papel importante no processo de ativação dos fatores de iniciação da síntese protéica. Segundo os autores, a leucina tem função fundamental no processo de fosforilação de proteínas envolvidas na formação do fator de iniciação eucariótico 4F (eIF4F - eukaryotic translation initiation factor 4F) que por sua vez, inicia a tradução do RNA mensageiro (RNAm) para a síntese global de proteínas. A leucina participa de uma maneira ainda não muito bem explicada da cascata de reações que promove a fosforilação da proteína S6 quinase ribossomal (S6K1), que ativa proteínas envolvidas na tradução dos aparatos de síntese protéica. Além disso, a leucina parece atuar na síntese protéica, por outros mecanismos diferentes e independentes dos citados acima (ZEMEL *et al.* 2004, KIMBALL *et al.* 2002, ANTHONY *et al.* 2001).

Desta forma, o perfil de aminoácidos encontrados nas proteínas do soro, principalmente aquelas ricas em leucina, pode favorecer o anabolismo muscular. Ha & Zamel (2003) destacam que o perfil de aminoácidos das proteínas do soro possui características muito similares ao das proteínas do músculo esquelético, contribuindo com quase todos os aminoácidos em proporção compatível às do mesmo, classificando-as como um eficaz suplemento anabólico. Burke *et al* (2001) notaram um significativo ganho de massa muscular em jovens e adultos suplementados com proteínas do soro após uma série de exercícios com peso. Esse experimento demonstrou que os grupos que tiveram a dieta contendo proteínas do soro tiveram um ganho de massa magra bem maior quando comparado ao grupo não

suplementado, reforçando a teoria do efeito das proteínas do soro sobre o ganho de massa muscular.

Muitos experimentos sobre as diferentes velocidades de absorção de proteínas estão sendo propostas por profissionais e cientistas que estudam desempenho físico. Dangin *et al* (2001) demonstraram que as proteínas do soro são absorvidas mais rapidamente que a caseína. Por esse motivo ocorre um aumento nas concentrações plasmáticas de aminoácidos provenientes dessas proteínas. Dessa forma, podemos sugerir que, se essa ingestão fosse realizada após uma sessão de exercícios, as proteínas do soro seriam mais eficientes no desencadeamento do processo de síntese protéica.

#### **1.4 Efeitos hipolipidemiante das proteínas do soro**

A obesidade é considerada um problema de saúde pública há muitos anos. Investigações populacionais vêm apontando que excesso de peso é um problema, tanto para países desenvolvidos como para países emergentes, sendo também considerado fator de risco para o surgimento de doenças que surgem em longo prazo (FONTAINE *et al.*, 1998).

Pessoas fisicamente ativas e atletas procuram, a todo custo, manter um percentual baixo de gordura corporal, seja com o objetivo de melhorar o desempenho físico ou apenas para o bem estar físico e mental (KAWASE *et al.*, 2000).

Muitas pesquisas têm demonstrado uma relação direta das proteínas do soro e o processo de redução corporal de gordura, por meio de mecanismos associados ao cálcio, e por proporcionar altos teores de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) (BOUTHEGOURD *at al.*, 2002).

Além das proteínas do soro possuir, como fundamental característica, altas concentrações de cálcio (aproximadamente 600 mg/100 g), diversos estudos epidemiológicos têm verificado uma relação inversa entre a ingestão de cálcio, proveniente do leite e seus derivados, e a gordura corporal (ZEMEL, 2004). Uma hipótese para tal teoria seria que o acréscimo no cálcio dietético restringe as concentrações dos hormônios calcitrópicos, principalmente o 1,25 hidroxicolecalciferol (1,25(OH)<sub>2</sub>D). Em concentrações elevadas, esse hormônio estimula a transferência de íon cálcio para os adipócitos. Nos adipócitos, altas concentrações de cálcio levam à formação de tecido adiposo e à redução da lipólise. Portanto,

a supressão dos hormônios calcitrópicos mediada pelo cálcio dietético, pode ajudar a diminuir a deposição de gordura nos tecidos adiposos (ZEMEL, 2004). Estudos mostram que o alto teor de BCAA das proteínas do soro afeta os processos metabólicos da regulação energética, favorecendo o controle e a redução da gordura corporal.

Para avaliar tais hipóteses, Layman (2003), submeteu mulheres obesas (>15% do peso ideal) a dois tipos de dietas isocalóricas. Um grupo (Protéico) recebeu dieta com  $1,5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$  de proteína, com 22,3g/dia de BCAA, sendo 9,9g/ dia de leucina, 40% das energias provenientes de carboidratos e 30% de lipídios. O outro grupo (Controle) recebeu dieta contendo  $0,8\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$  de proteína, com 12,3g/dia de BCAA, sendo 5,4g/ dia de leucina, 55% das energias provenientes de carboidratos e 30% de lipídios. Todos os voluntários foram precisamente controlados, quanto à ingestão das dietas e à realização de exercícios. Após 10 semanas, os autores observaram que o grupo Protéico apresentou valores estatisticamente maiores de glicemia em jejum e menores valores de glicemia pós-prandial. A dieta protéica gerou, também, melhor controle da insulina pós-prandial, com valores estatisticamente menores ( $p<0,05$ ). Em outro estudo, com o mesmo grupo de mulheres e aplicando os mesmos tipos de dietas, Layman (2003) citado por Haraguchi *et al.* (2006) observou que, após 16 semanas, a dieta protéica ocasionou uma perda significativa de peso, gordura corporal e resultou uma menor perda de massa magra ( $p<0,05$ ).

Muitos são os trabalhos demonstrando um efeito hipolipidêmico proporcionadas pelas proteínas do soro de leite diminuindo, desta forma, as concentrações plasmáticas do colesterol em ratos. Nagaoka *et al.*, (1992) observou uma inibição na absorção do colesterol influenciado pela BLG apresentando um efeito hipocolesterolêmico.

Morifugi *et al.*, (2005) realizaram o primeiro trabalho demonstrando o efeito que as proteínas do soro do leite possuem em diminuir as atividades das enzimas lipogênicas no fígado de ratos e a expressão de RNAm dessas enzimas, exceto a ácido graxo sintase, comparado com a caseína.

As enzimas lipogênicas hepáticas são reguladas pela composição calórica da dieta e por fatores hormonais. É de fato que a expressão dos genes das enzimas lipogênicas hepáticas aumenta por meio de ácidos graxos livres, dietas ricas em carboidratos, particularmente monossacarídeos tais como, glicose e frutose, que por sua vez, induzem a lipogênese (MASASHI *et al.*, 2005).

## 1.5 Recuperação das proteínas do soro por quitosana: novos alimentos funcionais.

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante depois da celulose, e pode ser extraída de carapaças e exoesqueletos de crustáceos, cutículas de muitos invertebrados, parede celular de fungos e algumas algas e é um homopolímero linear composto por ligações  $\beta(1-4)$ -*N*-acetil-D-glucosamina (CRAVEIRO *et al.*, 1999).

Podemos observar na Figuras 1 que, dos três biopolímeros (quitina, quitosana e celulose) que ocorrem em maior quantidade na natureza, estes se diferem somente pelo grupo funcional.

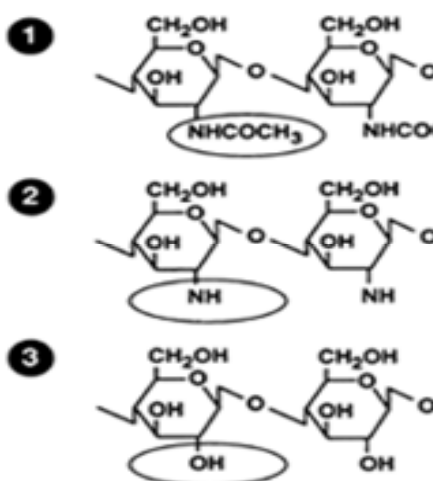


Figura 1: Estrutura química dos biopolímeros de maior ocorrência na natureza. Grupo funcional (ilustrado no círculo). Em (1) Quitina; (2) quitosana e (3) Celulose. (THARANATHAN *et al.*, 2003)

A quitosana tem sido largamente aplicada em áreas farmacêuticas e biomédicas. As suas características apelativas como biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade, propriedades de adsorção, capacidade de formar membranas, bioadesividade, atividade antimicrobiana, atividade contra fungos, bactérias e vírus e o seu poder hemostático contribuem obviamente para esse fato.

A maioria das características da quitosana pode ser relacionada com a sua natureza catiônica. A pH ácido é um polieletrólito com elevada densidade de carga com uma carga positiva por resíduo de glucosamina e como tal, irá interagir com moléculas carregadas negativamente como, proteínas, polissacarídeos aniônicos, e ácidos nucleicos. A quitosana é

um dos polímeros naturais mais utilizados na preparação de hidrogéis, nomeadamente para substituinte da pele humana em pacientes queimados (THARANATHAN & KITTUR, 2003).

Além das aplicações já citadas, a quitosana também pode ser utilizada no tratamento de resíduos da indústria de alimentos, inclusive permitindo a recuperação de proteínas que podem ser destinadas à alimentação animal (THARANATHAN E KITTUR, 2003). Mukhopadhyay *et al.*,(2003) avaliou o uso de um gel de quitosana na remoção de proteínas, sólidos em suspensão e minerais do soro de leite, permitindo, desta forma, que o mesmo seja processado para a obtenção de lactose com alto grau de pureza (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2003). Os resultados demonstraram que a concentração de lactose do soro antes e após o tratamento com quitosana (300mg de quitosana por litro de soro de queijo) foi praticamente o mesmo, entretanto houve uma redução significativa no teor de proteína (62-85%), cinzas (50-75%) e gorduras (70-80%). Desta forma, ocorre uma interação eletrostática entre as proteínas e a quitosana, causando a formação de um coágulo. Outra vantagem do uso de gel de quitosana é que o mesmo pode ser facilmente separado do soro usando técnicas de decantação ou centrifugação.

Hidalgo & Hansen (1971) exploraram a técnica de fracionamento seletivo de proteínas do soro utilizando carboximetilcelulose. Contudo, somente Capitani (2003) realizou um estudo do processo em escala piloto e sua viabilização. O desenvolvimento desta tecnologia em maior escala utilizando quitosana pode servir como oportunidade de negócio para o setor de laticínio, podendo contribuir com a diversificação de produtos e agregação de valor econômico ao resíduo da produção de queijo, tendo um custo benefício abaixo das expectativas. Além do mais, esse complexo pode ser associado com um principal ingrediente para o desenvolvimento de um alimento funcional.

Bough e Landes (1976) foram uns pioneiros em utilizar a quitosana como um polímero para separação das proteínas do soro, além do mais, foi o primeiro trabalho em demonstrar que pequenas quantidades de agentes poliméricos coagulantes não influenciam no valor nutricional das proteínas recuperadas do soro. Entretanto, não há evidências de estudos no qual se avalia o potencial fisiológico desse complexo, tais como, o metabolismo lipídico e o perfil de ácidos graxos neutros e polares.

A cada dia cresce o interesse frente à composição e funcionalidade dos alimentos, já que os mesmos têm uma ligação direta sobre a saúde, o desempenho físico e o bem-estar. Já é entendido que alguns alimentos e/ou ingredientes podem auxiliar no controle do peso, na redução e/ou controle de doenças crônicas relacionadas à dieta, como doenças coronárias, aterosclerose, hipertensão, câncer, osteoporose e obesidade (ANVISA, 2007).

O complexo quitosana/proteína se enquadraria na definição de alimento funcional, pois o mesmo possui propriedade hipolipidemiante, pelo fato de, além das proteínas do soro, a administração de quitosana em animais hipercolesterolêmicos também reduz significativamente os teores de colesterol no plasma. Muitos estudos comprovaram que quitosana contendo seis ou mais unidades de oligossacarídeos em sua cadeia e um moderado grau de desacetilação por resíduo de glicosamina, se torna um eficiente bloqueio de absorção de colesterol pelo trato intestinal. Esse processo se dá, pelo fato de que a quitosana tem propriedade de formar gel, o qual interage com lipídios e colesterol no trato intestinal diminuindo, então, a concentração dos mesmos no organismo (DEUCHI *et al.*, 1995; SUGANO *et al.*, 1980; MAEZAKI *et al.*, 1993).

## **1.6 Influência dos ácidos graxos saturados no metabolismo Lipídico**

Os ácidos graxos saturados (SFA) podem ser classificadas como de cadeia curta (C:2 – C:4), média (C:6 – C:12) e longa (>12C). Esses compostos possuem um importante papel como fonte energética para o organismo, além de fornecerem esqueleto carbônico para síntese de outros compostos celulares incluindo o colesterol (ROS, 2000). Muitos trabalhos comprovam que os ácidos graxos saturados e colesterol são considerados determinantes primários frente à concentração plasmática do colesterol em humanos. Individualmente, os ácidos graxos exibem diferentes efeitos hipercolesterolêmicos. Os ácidos laurico (C12:0) e mirístico (C14:0), por exemplo, são considerados mais hipercolesteromiantes do que o palmítico (C16:0), o qual é relativamente mais hipercolesterolêmico quando comparado ao ácido esteárico (C18:0). Todavia, somente 50% das moléculas de ácido esteárico (C18:0) são absorvidas no intestino, destas, 50% são convertidas em ácidos oléico (C18:1n9) que possui o potencial hipocolesterolemiante. Contudo, ácido graxo esteárico é considerado neutro quanto aos efeitos colesterolemiantes.

O potencial aterogênico das gorduras está relacionado à composição e a posição dos ácidos graxos nas moléculas de triacilgliceróis. Entretanto, os ácidos graxos de cadeia curta não regulam o *pool* de colesterol celular sendo os mesmos direcionados para serem metabolizados a acetil-CoA e empregados para a síntese de uma grande variedade de metabólitos. Os ácidos graxos láurico, mirístico e palmítico são considerados como

substratos de pouca afinidade pela enzima acil-CoA: colesterol aciltransferase (ACAT), uma enzima integrada a membranas do retículo endoplasmático rugoso dos enterócitos e hepatócitos, e que está relacionada a regulação da homeostase do colesterol a partir do colesterol intracelular. Essa pouca afinidade por esses ácidos graxos desencadeia a síntese endógena de colesterol e a diminuição da endocitose das LDL circulantes. Os principais substratos da ACAT são os ácidos graxos insaturados de cadeia longa, em especial o linoléico, que potencializa a captação de colesterol pelo fígado via LDL e diminuição das frações LDL no plasma.

Os fosfolipídios são os principais componentes estruturais que constituem as membranas biológicas como também possuem um papel significativo em sua propriedade física estrutural. Alterações na composição de fosfolipídios na membrana são conhecidas por influenciar em diversas extensões a funcionalidade celular e proporcionar uma alteração nas atividades de enzimas ligadas à membrana, influenciando no crescimento celular (SPECTOR & YOREK, 1985; HULBERT & ELSE, 1999). Além do mais, alteração na composição de fosfolipídios no músculo esquelético está ligada à desordem metabólica tal como a obesidade (PAN *et al.*, 1994; STORLIEN *et al.*, 1998). No aspecto geral, ácidos graxos saturados estão associados ao processo de condicionamento da célula a obter resistência à insulina. Já os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), particularmente os PUFAs n-3, promovem o estímulo de captação de glicose no músculo esquelético via insulina (BORKMAN *et al.*, 1997; CLAUDININ *et al.*, 1993; SCOHAL *et al.*, 1992; STORLIEN *et al.*, 1998).

A composição dos ácidos graxos dos fosfolipídios dos tecidos é alterada a partir das frações contidas nas dietas e pelo estilo de vida da pessoa, se é sedentária ou ativa. Portanto, manter uma vida saudável tem-se tornado uma tarefa cada vez mais difícil, tendo em vista que não se trata apenas do aspecto dietético como pré-requisito para se obter tal meta, mas também é crucial o conhecimento sobre a quantidade e a qualidade nutricional dos alimentos ingeridos e atividade física.



## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Estudo da otimização do processo de recuperação das proteínas do soro de leite bovino pela técnica de heterocoagulação eletrostática insolúvel de proteínas em quitosana.

Avaliação da qualidade biológica, nutricional e funcional desse complexo sobre o metabolismo lipídico em camundongos adultos hipercolesterolêmicos.

### **2.2 Específicos: fase 1**

- Estudar o efeito do pH e concentração entre proteínas e quitosana para otimização do processo de separação das frações protéicas do soro de leite;
- Avaliar técnicas de precipitação e caracterização quanto ao perfil eletroforético das frações protéicas totais do soro de leite;

### **2.3 Específicos: fase 2**

Em animais adultos, submetidos à dieta hipercolesterolemiantes, os objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito do heterocoagulado quitosana/proteínas do soro do leite quanto às propriedades hipolipidêmiantes.
- Investigar os parâmetros bioquímicos: colesterol total plasmático (CTP), colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidade), LDL (lipoproteína de baixa densidade), triglicérides (TG), lipídios totais plasmáticos (LTP) e teciduais (fígado, músculo gastrocnêmio), proteínas teciduais (fígado, músculo gastrocnêmio) e glicose.

- Avaliar possíveis diferenças no acúmulo de lipídios quanto ao perfil de ácidos graxos no fígado, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo epididimal.
- Comparar o perfil dos ácidos graxos dos fosfolípidios no fígado, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo epididimal.

### 3. Método

#### 3.1 Heterocoagulação

Neste estudo foi utilizado soro de leite doce liofilizado livre de gordura fornecido gentilmente pela Empresa Alibra-PR. Para dissolução do pó foi adicionado 10g do concentrado em 100 mL de água destilada e solubilizado a temperatura ambiente em um homogeneizador a 2000 rpm por 1h.

A quitosana empregada para heterocoagulação foi de média massa molar com 75-85 % de grau de desacetilação e viscosidade de 200-800 cPs (Sigma-Aldrich 44.887-7).

A quitosana foi solubilizada em homogeneizador de hélice a velocidade de 2000 rpm. O polissacarídeo juntamente com ácido cítrico P.A (0,4 mg.mL<sup>-1</sup>) foram adicionados em água destilada a temperatura ambiente sob agitação por 24 horas. Após esta etapa a solução de quitosana foi adicionada ao soro de leite previamente diluído (25±1°C) numa proporção de 1:1 com o objetivo de obter os complexos protéicos.

Para precipitação das frações protéicas do soro de leite, foram utilizados valores de pH na faixa de 3,0 a 6,0 respectivamente, ajustando os valores de pH com soluções de ácido cítrico e NaOH a 50%.

Testes preliminares com diferentes concentrações da quitosana foram realizados com o objetivo de se obter uma melhor precipitação de proteínas totais provenientes do soro de leite. Utilizou-se a solução de quitosana numa faixa de concentração variando de 0,25; 0,75; 1,5 e 2,25mg/mL. A melhor concentração foi selecionada utilizando os precipitados das respectivas concentrações e analisadas pelo método de Bradford (1976). Para determinar o perfil eletroforético das frações protéicas existentes nos complexos, as amostras foram dissolvidas em tampão redutor contendo 62,5 mM Tris-HCl, 20% de glicerol, 2% SDS (10%), 5% de β-mercaptoetanol e azul de bromofenol a pH 6,8. A solubilização foi feita de modo a conseguir aproximadamente 0,5 mg/mL de concentração protéica final. No gel separador foi utilizada uma concentração de 12,5% de poli(acrilamida). Como padrões para determinar as massas moleculares dos distintos polipeptídios foram usados beta-lactoglobulina – Sigma L4756, e alfa-lactoalbumina - Sigma L. 6385 e albumina bovina (BSA).

No processo de otimização, optou-se em utilizar a concentração de 0,75mg/mL em pH 4,5 por ser mais eficiente.

### **3.2 Escalamento do processo de Heterocoagulação**

Neste processo utilizou-se um volume de 50 L de soro de leite e 50 L de solução de quitosana a 0,75 mg/mL, a temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , que tiveram os valores de pH ajustados, uma vez unidos, com ácido cítrico e NaOH 50% para o valor de pH desejado (4,5). Após essa etapa, a solução 1:1 de soro/quitosana foi submetida à agitação por 1h.

Após esse período, a solução soro/quitosana foi centrifugada para separação dos complexos proteínas/quitosana, em centrífuga de cesto GEDR-Heinel (modelo 2250, no. de série 48586) a velocidade de 808 g.

O fluxo de alimentação na centrífuga da solução 1:1 de soro/quitosana foi controlado utilizando uma bomba peristáltica de fluxo contínuo (Masterflex L/S, modelo 77250-62 – Cole-Parmer Instrument Company) nas vazões de  $208 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  com o tempo de residência de 5' para obtenção do precipitado.

O processo de centrifugação em escala piloto foi realizado na planta piloto do Grupo Especial de Engenharia do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL (Campinas - SP).

### **3.3 Animais**

Para os objetivos propostos, foram utilizados 18 camundongos adultos da linhagem Swiss machos com peso médio de 35g. Os animais foram fornecidos pelo biotério da UMC. Todos os animais foram mantidos em caixa individuais de polipropileno com ciclo de claro e escuro controlado (12h-12h) em temperatura de  $22\pm 1^\circ\text{C}$ . Os animais tiveram livre acesso a ração e água (*ad libitum*). Esses procedimentos foram minuciosamente desenvolvidos seguindo as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 3.4 Dietas

Na Tabela 3 está apresentada a composição nutricional das dietas experimentais Hcol e PSQHcol. As rações dos experimentos foram produzidas de acordo com Reeves *et al.*, (1993) seguindo o modelo AIN-93M. As rações experimentais diferiram entre si pela presença de quitosana formando um complexo protéico com proteínas do soro de leite (heterocoagulado), pela fonte protéica adicionada (caseína como controle e complexo proteínas/quitosana), convencional como dieta normocalórica e a presença de banha de porco Sadia® na dieta hipercolesterolêmica.

A fonte protéica experimental utilizada foi proveniente do processo de heterocoagulação, no qual era constituído de quitosana e proteínas do soro.

Tabela 3: Composição nutricional (g.kg-1) das dietas fornecidas aos camundongos jovens.  
Composição nutricional (g.kg-1) das dietas fornecidas aos camundongos jovens.

<b>Ingredientes</b>	<b>PSQHcol</b>	<b>Hcol</b>
Caseína	-	140,0
Proteína do soro	140,0	-
Quitosana	2,2	-
Mix mineral	35,0	35,0
Mix vitamínico	10,0	10,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha de porco**	280,0	280,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5
Fibra	50,0	50,0
Amido de milho	726,0	726,0
L-cistina	1,8	1,8

Dietas: PSQHcol - proteínas do soro de leite/quitosana hipercolesterolêmica; Hcol – caseína controle hipercolesterolêmica.

\*\* Contém 20g de colesterol

Os animais adultos foram divididos 3 grupos com 6 animais cada, subdivididos em dieta normocalórica (Ncal - Nuvital CR1) e dietas hipercalóricas/hipercolesterolêmicas (Hcol e PSQHcol). Esses grupos foram alimentados por um período de 4 semanas de tratamento.

### 3.5 Avaliações bioquímicas e coletas de amostras

Após o período experimental, todos os animais foram mantidos em jejum por 16 horas e posteriormente anestesiados com pentobarbital. A eutanásia foi realizada por meio da coleta de sangue via punção cardíaca. O sangue foi acondicionado em tubos heparinizados e posteriormente centrifugado a 3000g por 10 minutos para obtenção do soro que foi armazenado a -20°C. Foram coletados o tecido adiposo branco epididimal (EPI), músculo gastrocnêmio (GAST) e o fígado. Estas amostras foram pesadas e estocadas a -20°C.

Todas as dosagens bioquímicas, colesterol total, colesterol HDL, triglicérides, lipídios totais no plasma, proteínas totais e glicose foram realizados utilizando-se os *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica).

### 3.6 Determinação do perfil de ácidos graxos dos tecidos

Os extratos lipídicos foram submetidos a uma atmosfera de N<sub>2</sub> para evaporação do solvente sem oxidação dos ácidos graxos. A partir destes extratos, foi realizada uma separação das frações neutras e polares dos lipídios (com exceção do plasma) por cromatografia de coluna (COPEMAN *et al.*, 2002). As frações polares (fosfolipídios) e neutras (triglicérides) foram metiladas (para a formação dos metil ésteres) pelo método ácido, proposto por Kitson *et al.*, (1996) utilizando cloreto de acetila e metanol como catalisadores da reação.

Os metil ésteres foram analisados por cromatografia gasosa (GC), acoplada a um ionizador de chama (FID) (VARIAN GC 3900) e o perfil de ácidos graxos foi determinado com o cálculo de tempo de retenção, utilizando-se um padrão de ácidos graxos com tempo de retenção conhecido (Supelco, 37 Componentes).

Para a análise dos ácidos graxos foi utilizada uma programação no cromatógrafo com as características descritas a seguir. A leitura foi iniciada a uma temperatura de 170°C mantida por 1 minuto e em seguida por uma rampa de 2,5°C/minuto, até atingir a temperatura final de 220°C, que foi mantida por 5 minutos. O injetor e o detector foram mantidos a 250°C. Uma coluna CP wax 52 CB, com espessura de 0,25 mm, diâmetro interno de 0,25 µm e 30 m de comprimento foi utilizada, tendo o hidrogênio como o gás de arraste.

Estas análises foram realizadas no laboratório de Fisiologia de Reprodução de Peixes no IB-USP sob supervisão da professora Dra. Renata Guimarães Moreira.

### **3.7 Protocolo de extração e determinação de lipídeos totais**

As amostras foram homogeneizadas em microprocessador Sentry™ modelo Tempest I.Q.<sup>2</sup>, a 25.000 rpm, por 45 segundos. Após a homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio com tampa de teflon, e os frascos utilizados na extração, lavados com 1 mL de clorofórmio, para evitar perda de lipídios que ficariam retidos nas paredes do frasco. Estes tubos foram centrifugados a 655,1g por 5 minutos. Após a centrifugação, a camada orgânica (inferior) foi removida pela técnica das 2 pipetas. Esta técnica consiste em colocar uma pipeta Pasteur longa dentro de outra curta. Com esta pipeta curta, a camada inferior é retirada e transferida para outro frasco. A pipeta curta foi lavada com clorofórmio, e o processo, repetido por 3 vezes para extração total dos lipídios teciduais. Os extratos finais foram transferidos para frascos menores e as amostras, evaporadas em nitrogênio. Após a evaporação, as amostras foram resuspendidas em 1 mL de clorofórmio e agitadas em Vórtex por 30 segundos, para resuspensão completa e posterior dosagem.

Para a determinação foram pipetados 100µL das amostras provenientes do processo anterior e acrescentados mais 200 µl de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram levados a um banho fervente por 10 minutos e em seguida, adicionado 5 mL do reagente de fosfovanilina (35 mL de vanilina 0,6% + 60 mL de ácido fosfórico + 5mL de H<sub>2</sub>O destilada). Os tubos foram novamente levados para o banho, agora a 37°C, por 15 minutos para em seguida fazer a leitura da absorbância em espectrofotômetro, a 540nm. A quantidade de lipídios totais foi calculada a partir de uma curva padrão.

### 3.8 Protocolo de cromatografia de coluna para separação dos lipídios neutros e polares

Esta técnica utiliza sílica gel para separação dos lipídeos neutros e polares. A sílica deve ser previamente seca em estufa a 100°C por 1 hora para que não haja interferência da umidade na eficiência do método. A uma pipeta Pasteur foi colocada uma pequena quantidade de lã de vidro e em seguida a sílica gel até preencher a pipeta. Esta pipeta foi lavada com 4 mL de metanol e depois com 4mL de clorofórmio e após este procedimento a amostra de lipídios totais, acrescentada. O vidro que continha a amostra foi lavado com 1 mL de clorofórmio e este também adicionado a pipeta, em seguida adicionou-se 3 mL de mistura de clorofórmio, metanol e ácido fórmico(1:1:1), a solução empregada na separação dos lipídeos neutros. Após o término desta solução, 1 mL de metanol foi acrescentado para obter a separação dos lipídios polares. As amostras foram secas em nitrogênio para posterior análise.

### 3.9 Protocolo para determinação do Perfil de ácidos graxos

Para a determinação do perfil de ácidos graxos foi utilizado como padrão interno ácido decanóico (10:0), 0,5mg em 1mL de heptano, adicionou-se valores diferentes para as frações de lipídeos sendo, 500 µL para lipídios neutros e 300 µL para lipídeos polares, depois acrescenta-se 2 mL de tolueno e 3mL da mistura cloreto de acetila (8mL) em metanol (80 mL) 1:10, às amostras foram adicionados nitrogênio para retirada de oxigênio e a tampa dos tubos será vedada com *parafilm*. As amostras foram levadas a banho-maria 70°C por 2 horas, em seguida adicionado 5 mL de carbonato de potássio 6% para separação das fases. A fase superior foi retirada com auxílio de uma pipeta e transferida para outro tubo com sulfato de sódio para certificar-se da retirada de qualquer resíduo de água que pudesse ter ficado do processo. As amostras, assim preparadas, foram acondicionadas em tubos para serem injetadas no cromatógrafo.



### 3.10 Análise de proteínas totais dos tecidos

Para a determinação do teor protéico total dos tecidos, foi utilizado o método de Lowry *et al.*, (1951) cujo princípio é enzimático-colorimétrico e as proteínas determinadas contra uma curva padrão de albumina bovina (Bovine serum albumine, Sigma). Esta determinação era empregada após precipitação e solubilização das proteínas totais segundo metodologia empregada por Milligan e Girard (1993).

### 3.11 Análise estatística

Os valores de cada parâmetro e grupo avaliados foram comparados usando-se teste de análise de variância (One way- ANOVA), sendo possível estabelecer a mínima diferença significativa, ou seja, a menor diferença de média de amostras que deve ser tomada como estatisticamente significativa para os dados que, no cálculo de ANOVA revelaram-se com diferenças estatísticas significantes. Para realização das análises foi utilizado o programa estatístico BioStat 3.0.

Para obtenção dos gráficos de correlação os dados foram plotados no programa Excel. As correlações serão consideradas significativas quando o valor de P foi inferior a 0,05.

### 3.12 Cálculos e atividades estimadas das dessaturases e alongase

Os índices dos ácidos graxos foram calculados como se segue: monoinsaturado (MUFA), Polinsaturado (PUFAs) n6 e n3 e total, proporção de insaturado/saturado (U/S) e o índice de insaturação (UI; a média do número de dupla ligação por ácido graxo multiplicado por 100). Adicionalmente foram calculadas as atividades das enzimas Alongase, (AL),  $\Delta 5$ -dessaturase (D5),  $\Delta 6$ -dessaturase (D6),  $\Delta 9$ -dessaturase-C16 (D9-C16),  $\Delta 9$ -dessaturase-C18 (D9-C18) através de adequadas proporções produto/precursor como segue: AL = 18:0/16:0; D5 = 20:4n6/20:3n6; D6 = 18:3n6/18:2n6; D9-C16 = 16:1/16:0 e D9-C18 = 18:1n9/18:0. (PETRIDOU *et al.*, 2005).

# I. Separação das frações protéicas por heterocoagulação eletrostática em quitosana: Fase 1

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Heterocoagulação

Para se estudar as propriedades coacervativas da quitosana avaliou-se as seguintes concentrações 0,25, 0,75, 1,50 e 2,25 mg/mL. Foi observado maiores interações em relação à formação de complexo proteínas/quitosana em pHs a partir de 4,5 (figuras 2, 3, 5 e 6). As formações dos complexos eletrostáticos entre proteínas e quitosana se devem as cargas iônicas formadas nos diferentes pHs estudados (De VRIES, 2004). O  $pK_a$  da quitosana é aproximadamente 6,5, desta forma, em  $pH$  abaixo desse valor a quitosana apresenta-se positivamente carregada ao longo de sua cadeia estrutural linear. Com o objetivo principal de recuperar as principais proteínas insolúveis do soro de leite tais como: alfa-lactoalbumina (15% do total presente no soro), beta-lactoglobulina (75%), albumina bovina (5%) e caseinopeptídeo (4%) todas as condições aplicadas foram realizadas em  $pH$  abaixo do  $pK_a$  da quitosana, usando ácido cítrico como solvente para protonação dos amino-grupos.

A figura 2, mostra a porcentagem de proteínas totais recuperadas do complexo de quitosana a 0,25 mg/mL nos pHs 3,0 a 6,0, obtidas em 100 mL de soro de leite. Observa-se uma alta recuperação em pH 4,5 (74,4%). Casal *et al.*, (2005) e Montilla *et al.*, (2007) obtiveram uma maior concentração em pH de 5,7 a 6,2 para recuperação de beta-lactoglobulina (70%), utilizando uma concentração similar. Esses resultados, por sua vez, contrariam os encontrados nesse experimento onde obtivemos melhores concentrações em pH entre 4,5 e 5,0.

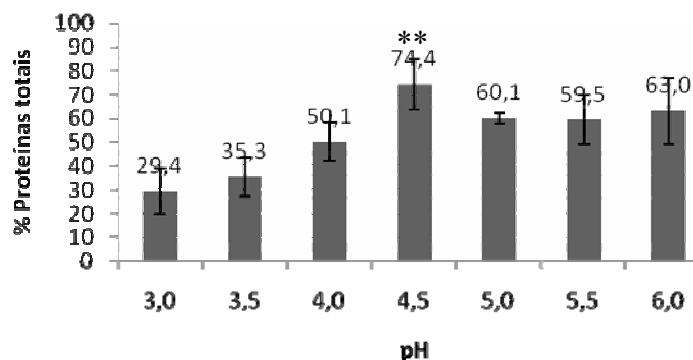


Figura 2: Efeito do pH na precipitação de proteínas totais do soro de leite por adição de 0,25mg/mL de quitosana. Desvio padrão dos valores (n=15). (\*) Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Na concentração de 0,75 mg/mL de quitosana os resultados foram similares aqueles observados na concentração de 0,25mg/mL, sendo possível recuperar as proteínas totais em 100 mL de soro de leite, em todos os *pH*s utilizados. Entretanto, em *pH* 4,5 houve uma maior relação precipitado/sobrenadante (81,2%) (figura 3), mostrando diferença significativa comparado aos demais *pH*s avaliados na relação precipitado/sobrenadante para todas as concentrações de quitosana utilizadas.

Dentre as concentrações empregadas nesse experimento optou-se pela concentração 0,75mg/mL de quitosana por apresentar melhor facilidade no manuseio do precipitado após centrifugação (melhor consistência), melhor relação proteínas/quitosana frente as concentrações 1,5mg/mL e 2,25mg/mL havendo diferença significativa. Quando comparado com a concentração de 0,25mg/mL, não houve diferença significativa entre essas duas concentrações ( $p < 0,05$ ) (figura 7). Deste modo empregou-se essa concentração para determinar a turbidez e o perfil eletroforético das amostras.

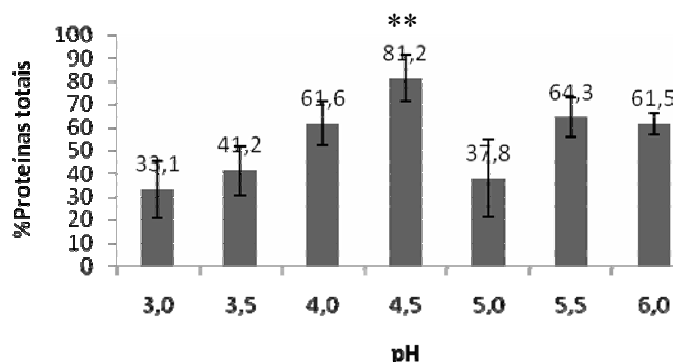


Figura 3: Efeito do pH na precipitação de proteínas totais do soro de leite por adição de 75mg/mL de quitosana. Desvio padrão dos valores (n=15). (\*) Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0.05).

Em *pH* 4,5 ou próximo de 5,0 ocorre um máximo de interação entre proteínas totais em quitosana. Entre *pH* 4,5 e 5,0, coincide com o ponto isoelétrico da alfa-lactoalbumina (*pI* = 4,7), da Albumina Bovina (*pI* = 4,75) e aproxima-se do *pI* da beta-Lactoglobulina (5,1). Segundo Guzey e McClements(2006) a beta-Lactoglobulina em *pH* 6,0 possui 28 ácidos carboxílicos carregados negativamente onde os mesmos podem alternar as suas propriedades de ionização dependendo do *pH*. Esses ácidos carboxílicos estão divididos em 16 ácidos glutâmicos (*pKa*= 4,3) e 10 ácidos aspártico (*pKa*= 3,7) por molécula de proteína.

Em *pH* 6,0 a solução de quitosana apresenta aproximadamente 65% dos amino-grupos carregados positivamente com referencia ao grau de desacetilação (GD) que está por volta de 85%, nessa porcentagem, os amino-grupos apresentam *pKa* por volta de 6,5.

Em *pH* 4,5 a solução de quitosana (85% GD) apresenta alta densidade de carga positiva que se aproxima, sugestivamente a 80% na concentração de 0,75mg/mL, enquanto que a maioria das proteínas de interesse, no soro de leite, apresentam formas catiônicas e zwitteriônicas iguais, o que, possivelmente, poderia diminuir sua solubilidade e favorecer a adsorção em quitosana (VOET *et al.*, 2004). Entretanto, também podemos inferir que em *pH* entre 4,5 e 5,0 a porcentagem de cargas aniônicas dos grupos carboxilas terminais e catiônicas dos grupos amins das proteínas, se encontram similares, de modo que as formas catiônicas e zwitteriônicas não permitem que os aminoácidos assumam, em meio aquoso a forma neutra, contribuindo, desta forma, com a interação entre proteínas e quitosana.

Contudo, quando os grupos ionizáveis das proteínas se aproximam do seu ponto isoelétrico estas cargas interagem com as cargas da quitosana formando um sistema de duas fases (figura 4). Nesse sistema os dois componentes se encontram concentrados em uma mesma fase. Essa reação se deve à formação de um complexo eletrostático insolúvel de proteínas e polissacarídeos catiônico, que geralmente é obtido em *pH* < *pI*, permitindo que

esse complexo seja separado por decantação ou por força centrífuga, da qual se obtém o complexo precipitado.

A interação entre proteínas e polissacarídeos e de complexo formado está relacionado à natureza do polissacarídeo, como: massa molar; grau de desacetilação e ou substituição (GD/GS); acidez ou neutralidade, proporção entre polissacarídeos e proteína, e temperatura do meio (GLICKSMAN, 1982, 1983; SAMMANT *et al.*, 1993;).

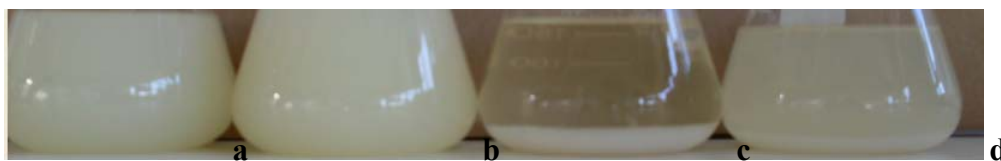


Figura 4: Efeito do pH na formação do sistema de duas fases em solução de quitosana 0,75mg/mL e soro de leite (1:1). Em a (pH 3,5), b (pH 4,0) e d (pH 5,0) podemos observar uma possível interação homogênea estável, em que às proteínas e a quitosana apresentam co-solúveis. Em c (pH 4,5), os componentes (proteínas/quitosana) encontram-se em uma mesma fase.

Em relação às concentrações de 1,50mg/mL e 2,25mg/mL, houve uma pequena interação eletrostática entre proteínas e quitosana (figuras 5 e 6) respectivamente. Nessas concentrações ocorre uma interação homogênea estável, em que as proteínas e a quitosana apresentam-se co-solúveis, podendo ocorrer ou não a interação entre elas, ou seja, não interagem na solução ou apresentam-se como um complexo solúvel em função do *pH*. Nesta fase estão envolvidas interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio. Além do mais, Bough & Landes (1976) demonstraram que nessas concentrações ocorre uma reestabilização da solução de quitosana que os autores tratam como um fenômeno comum, devido à sobre dose de polímero.

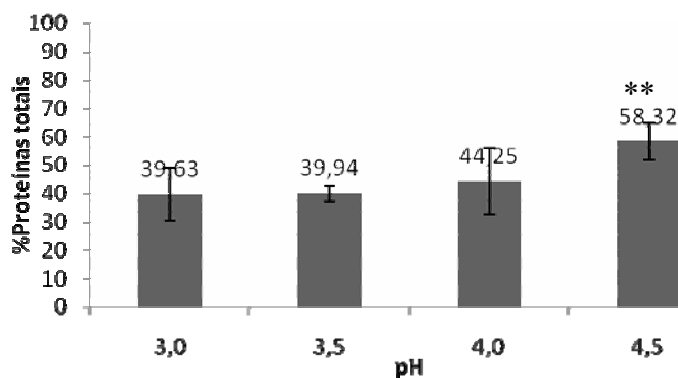


Figura 5: Efeito do pH na precipitação de proteínas totais do soro de leite por adição de 1,50mg/mL de quitosana. Desvio padrão dos valores (n=15). (\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05).

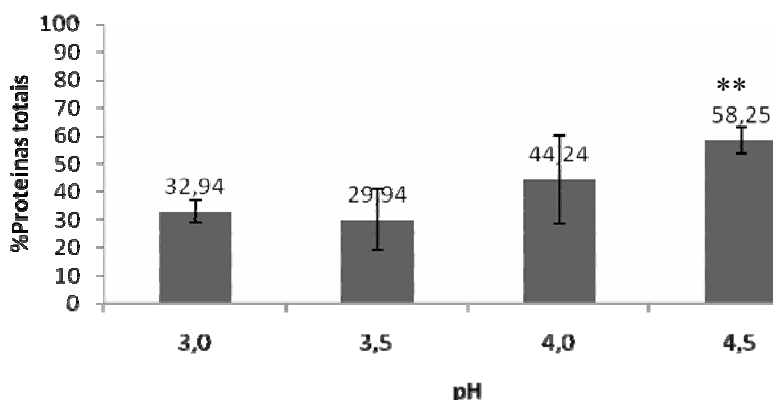


Figura 6: Efeito do pH na precipitação de proteínas totais do soro de leite por adição de 2,25mg/mL de quitosana. Desvio padrão dos valores (n=15). (\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05).

Na concentração de 0,75mg/mL de quitosana em *pH* 4,5 comparado com as concentrações de quitosana 1,5mg/mL e 2,25mg/mL houve diferença entre os grupos (P<0,05) (figura 6). Em relação à concentração 0,25mg/mL, não houve diferença significativa (P<0,05), contudo, optou-se por essa concentração de quitosana por apresentar melhor facilidade do manuseio do precipitado após a centrifugação (melhor consistência) para etapa seguinte do experimento.

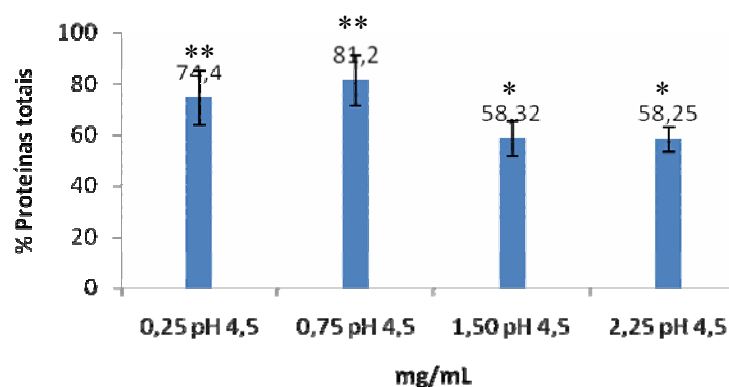


Figura 7: Efeito do pH na precipitação de proteínas totais do soro de leite comparando todas as concentrações em função do pH 4,5. Desvio padrão dos valores (n=15). (\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

A turbidez presente no soro de leite está relacionada com a presença de altas concentrações de proteínas e outras moléculas eletricamente carregadas (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2003). Desta forma, podemos relacionar a redução da turbidez do meio ao fato de haver uma interação dessas moléculas com a concentração de quitosana influenciadas pelo pH do meio (GUZEY, 2006; BOUGH e LANDES, 1976; CASAL, 2005).

Foi observado um decréscimo de partículas em suspensão a partir do *pH* 4,0 (87%) e uma alta redução da turbidez em *pH* 4,5 (95%) (figura 7), utilizando o tratamento contendo 0,75mg/mL de quitosana. Essa redução se deve a um fenômeno descrito por O'Melia (1972) que propõe que esse processo está relacionado à diminuição do equilíbrio de cargas, ou seja, as cargas negativas dos colóides em suspensão desestabilizam por influencia da neutralização provocada pelas cargas positivas da quitosana. Esse fenômeno também se deve, minimamente, a formação de pontes de hidrogênio formada entre os componentes.

É muito importante salientar que, dependendo dos tipos de reagentes adicionados no produto final, não se devem considerar apenas as propriedades do biopolímero como um todo, mas todas as propriedades, possivelmente formadas, na junção de todos os colóides, como a natureza e a força de interação que existe na mistura dos dois.

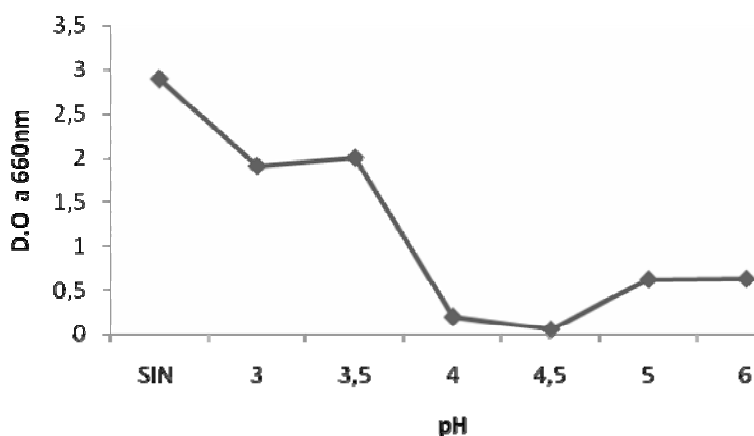


Figura 8: Efeito do pH na redução de turbidez do soro in natura em adição de 0,75mg/mL de quitosana. SIN representa soro in natura com densidade ótica (D.O) < 3,0.

A quitosana é utilizada por muitos pesquisadores como um eficiente coagulante de diferentes tipos de moléculas, sejam elas de interesse econômico como algumas proteínas, na purificação de água, onde a mesma pode servir como um potente ligante de metais pesados tais como,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Cd^{2+}$ , ou destinada à diminuição de BQO ou DBO de um determinado efluente orgânico. Mulhopadhyay *et al.*, (2003) utilizaram diversas concentrações de quitosana para desproteínizar o soro de leite com o objetivo de isolar a lactose. Os autores obtiveram 99,89% da lactose, com alto grau de pureza, presente no soro de leite que foi retida no sobrenadante após tratamento com 0,30 mg/mL quitosana previamente dissolvidas em ácido acético. Em nosso experimento obtivemos um valor aproximado (99% n= 4) empregando 0,75 mg/mL de quitosana.

## 4.2 Perfil eletroforético SDS-PAGE.

O perfil eletroforético do complexo obtido a partir da concentração 0,75 mg/mL em pH 4,5 está demonstrada na figura 8. Observa-se que as proteínas de maior interesse nutricional, tais como alfa-lactoalbumina (14Kd), beta-lactoglobulina (18Kd) e albumina bovina (66Kd), como também caseinopeptídeos ( $\beta$ -caseína 25Kd) foram precipitadas empregando um único perfil de pH e concentração de quitosana.



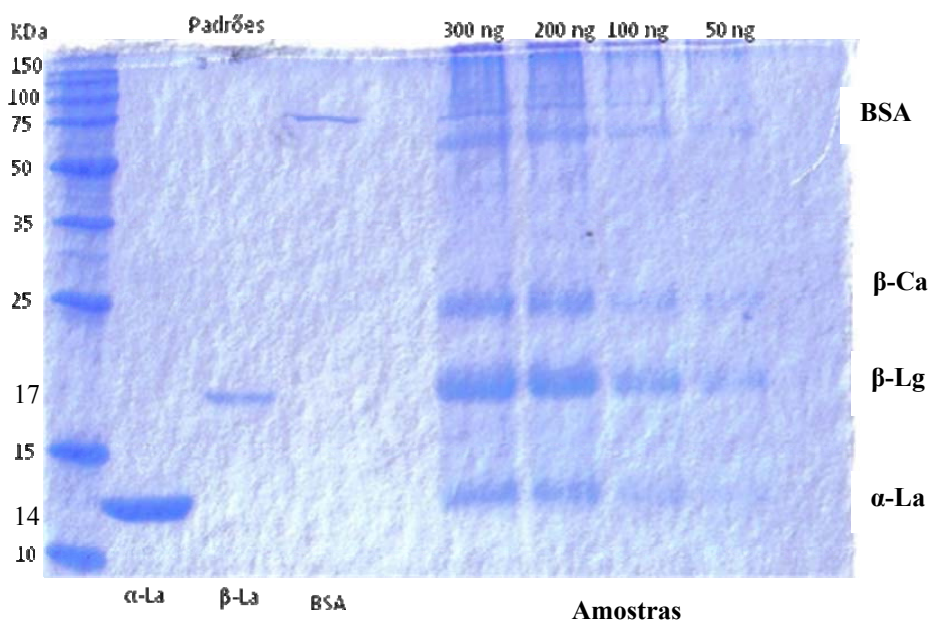


Figura 9: Perfil eletroforético da concentração 0,75mg/mL em pH4,5. SDS-Page, em gel 12,5% de poliacrilamida nas concentrações 300, 200, 100 e 50ng de heterocoagulado (quitosana/proteínas). Padrões:  $\alpha$ -la= alfa-lactoalbumina (14Kd),  $\beta$ -Lg= beta-Lactoglobulina (18Kd),  $\beta$ -ca= beta-caseína e BSA= Albumina bovina (66Kd).

A estrutura da beta-lactoglobulina possui um grupo tiol livre, onde esta permite a interação associativa com proteínas hidrofóbicas, e duas pontes de enxofre em seu centro. A conformação da beta-lactoglobulina depende do pH do meio. Para valores de *pH* entre 5,2 e 6,7 (ponto isoelétrico) e à temperatura ambiente, a beta-lactoglobulina encontra-se em forma de um dímero estável, com peso molecular de 36,7 kDa. Entre pH na faixa de 3,5 e 5,2, a interação associativa entre os dímeros ocorre, formando um octmero de 147 kDa. Em *pH* inferior a 3,5 as estruturas quaternárias dessa proteína sofrem uma repulsão eletrostática muito intensa, ocorrendo desta forma, uma dissociação reversível formando monômeros a partir dos dímeros (figura 9) (GROSCH, 1987; DUMAY e CHEFTEL, 1989).

A beta-lactoglobulina não sofre alteração em sua estrutura nativa quando a mesma é influenciada por esse efeito de carga, mesmo em temperaturas igual ou superior a 80°C (DE Wit, 1989), até pH 8,6. Para valores de *pHs* acima de 8,6, a proteína sofre desnaturação irreversível (GROSCH, 1987; DUMAY e CHEFTEL, 1989), devido a alterações importantes nas propriedades físico-químicas e a uma alteração conformacional nessa proteínas em pH próximo de 7,5.

Existem diferentes tipos de beta-lactoglobulina (A e B). A beta-lactoglobulina A difere da variante B, por conter dois aminoácidos: aspartato-64 e valina-118. Estes aminoácidos são substituídos na beta-lactoglobulina B, pela glicina e pela alanina. Ambas possuem resíduos de cisteínas.

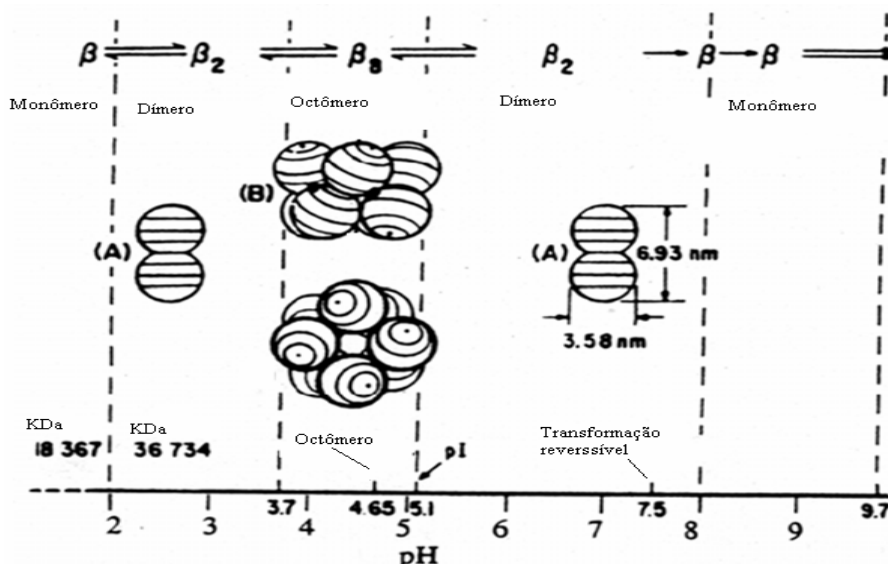


Figura 10: Variação da conformação da beta-lactoglobulina em função do pH. Adaptado de Rodrigues (1997).

A alfa-lactalbumina contém 8 grupos de cisteína, todos envolvidos em pontes S-S internas e 4 resíduos de triptofano. Tem uma estrutura secundária ordenada e uma estrutura terciária esférica e compacta (GROSCH, citado por RODRIGUES, 1987).

A alfa-lactalbumina é considerada uma metalo-proteína possuindo um átomo de cálcio que lhe permite a interação com outras proteínas, tendo por isso tendência a polimerizar. Se, por exemplo, existir um grupo -SH livre em outra molécula (como por exemplo na beta-lactoglobulina), este reage com uma das pontes S-S presente na alfa-lactalbumina, originando assim uma associação de proteínas (CHEFTEL e LORIENT, 1982; MULVIHILL, 1994).

Em pH inferiores a 5,0 ocorre uma alteração na estrutura da proteína, onde o meio conduz à libertação do íon  $\text{Ca}^{2+}$  (ANDREWS e VALEY, 1994; MULVIHILL, 1994), promovendo uma desnaturação reversível e a um processo de agregação (DEWIT, 1989).

Com esses resultados podemos utilizar alguns conhecimentos técnicos e científicos previamente adquiridos e direcionar o projeto a uma escala industrial, sugerindo um estudo de viabilidade econômica do método, que por sua vez, possui baixo custo agregado comparado aos métodos convencionais.

## **II. Aplicação do heterocoagulado na nutrição de camundongos hipercolesterolêmicos: Fase 2**

### **5. Objetivos**

Formular dietas hipercolesterolemiantes, com fontes protéicas constituídas de heterocoagulado (quitosana/proteínas de soro de leite) e avaliar o efeito do heterocoagulado quanto às propriedades hipolipidemiante.

### **6. Caracterização lipídica das dietas**

Uma dieta hipercalórica caracteriza-se pelo alto teor de gordura nela contida. É de fundamental importância investigar as características lipídicas das dietas bem como seu comportamento frente ao perfil metabólico.

Determinar a razão das concentrações dos ácidos graxos polinsaturado e monoinsaturado/saturado (PUFA, MUFA/SFA) nas dietas se faz necessário, pois se o valor desta razão for alto, esta é considerada benéfica à saúde humana, uma vez que os (PUFAs) possuem propriedades de estimular a redução nos níveis de colesterol plasmáticos. Aguila e col. (2002) relatam que os (MUFAs) também possuem propriedades de reduzir os teores de lipídios séricos. Assim sendo, a razão (PUFA/MUFA)/SFA é considerada indicadora potencial da relação dos lipídios dietário frente aos séricos proporcionando benefícios à saúde dos organismos.

Muitos estudos indicam que, separadamente, tanto dietas contendo quitosana como as proteínas do soro, possuem mecanismos de reduzir e regular a absorção e o controle da síntese lipídica, proporcionando uma grande contribuição na diminuição no perfil dos componentes lipídicos aterogênicos presentes na dieta.

Na Tabela 4 encontra-se a composição dos ácidos graxos das dietas Hcol, PSQHcol e Ncal.

Podemos observar uma porcentagem relativamente maior de (SFA) nas dietas Hcol e PSQHcol quando comparado a Ncal.

Nas análises da composição dos ácidos graxos das dietas, podemos observar maiores concentrações dos ácidos graxos palmítico (C16:0), oléico (C18:1) e ácido linoléico (18:2n6). Dietas das quais as maiores frações são os ácidos graxos saturados, deixam os quilomícrons mais rígidos, podendo inibir a ligação da apo E o que conseqüentemente irá comprometer o seu reconhecimento pelos receptores hepáticos, levando a um comprometimento do mecanismo lipolítico via lipase lipoprotéica devido a essa rigidez. Contudo, esse comprometimento eleva os produtos de influencia primários para o favorecimento do aumento nos níveis plasmáticos do colesterol em animais e humanos (JANSEN, *et al.*, 1998).

Dos ácidos graxos considerados hipercolesterolêmicos, somente o C14:0, C15:0, C16:0 e o C17:0 ocorrem nas três dietas.

**Tabela 4:** Composição de ácidos graxos das dietas (%) formuladas.

Ácidos graxos	Hcol	PSQHcol	Ncal.
C14:0	1,205	1,44	0,048
C15:0	0,06	0,079	0,028
C15:1	-	-	0,019
C16:0	23,524	26,12	9,736
C16:1	2,21	2,234	0,116
C17:0	0,318	0,262	0,031
C17:1	0,268	0,24	0,043
C18:0	1,376	1,367	3,164
C18:1	20,807	20,931	24,999
C18:2n6	48,686	46,123	54,683
C18:3n6	0,068	0,073	0,084
C18:3n3	0,502	-	4,524
C20:0	0,441	-	0,559
C20:1	0,07	0,439	0,446
C20:2n6	0,198	0,355	0,072
C20:3n6	-	0,065	0,025
C20:4n6	-	0,144	0,038
C20:4n3	0,053	-	0,011
C22:0	0,04	0,055	0,656
C22:1			0,198
C22:2n6	0,028	0,009	0,042
C22:4n6	0,074	0,003	0,096
C22:4n3	-	-	0,02
C22:5n3	0,032	-	0,031
C24:0	0,001	0,003	0,027
C22:6n3	0,021	0,057	0,303
<b>SFA</b>	<b>26,965</b>	<b>29,326</b>	<b>14,249</b>
<b>MUFA</b>	<b>23,355</b>	<b>23,844</b>	<b>25,821</b>
<b>PUFA</b>	<b>49,662</b>	<b>46,829</b>	<b>59,929</b>
<b>PUFA n3</b>	<b>0,576</b>	<b>0,057</b>	<b>4,858</b>
<b>PUFA n6</b>	<b>49,054</b>	<b>46,772</b>	<b>55,04</b>

(-) ácidos graxos não detectados pelo cromatógrafo.

Dietas: PSQHcol - proteínas do soro de leite/quitosana hipercolesterolêmica; Hcol – caseína controle hipercolesterolêmica; Ncal – Normocalórica convencional (Nuvotal CR-1).

O perfil de ácidos graxos das dietas contendo a banha de porco não está de acordo com os resultados reportados por Suzuki *et al.*, (1985), Chen *et al.*, (1995) Neilsen *et al.* (1995) e Takeuchi *et al.*, (1995), no qual os autores encontraram proporções de ((PUFA/MUFA)/SFA) correspondendo (14,68/40,08)/45,05%, valores diferentes aos encontrados nesse experimento,

correspondendo a (49,66/23,35)/26,96% para Hcol e (46,82/23,84)/29,32% para PSQHcol. Uma explicação para tal fato é que os autores determinaram o perfil desses ácidos graxos diretamente da fonte lipídica, antes da junção dos outros componentes da dieta, podendo os mesmo, acredito, ter tido interpretações errôneas. Podemos sugerir isso, pois no processo em si, há perda significativa de ácidos graxos por decorrência da temperatura que a dieta é submetida à secagem.

Além do mais, a composição em ácidos graxos de uma gordura depende essencialmente da fonte utilizada, como também de variações que a mesma é submetida. Devido a fatores climáticos, dietários, variedades e técnica de processamento, a dieta pode apresentar perdas significativas em suas frações lipídicas alterando, desta forma, a composição final na ração.

## **7. Perfil alimentar e nutricional**

No período de quatro semanas foram monitorados o consumo alimentar e o ganho de peso entre os grupos (tabela 5). Dos grupos que foram administrados dietas hipercolesterolemiantes, somente Hcol apresentou evolução corpórea significativa, ou seja, maior ganho de peso ( $\Delta$  13,8%) seguido do Ncal ( $\Delta$  4,61%). Os animais dos grupos Hcol e Ncal apresentaram estatisticamente maiores valores em relação à evolução corpórea quando comparados aos animais PSQHcol que tiveram perda de peso significativo ( $\Delta$  -20%  $p < 0,05$ ).

Em relação ao consumo alimentar, não houve diferença significativa entre os grupos apesar de o grupo PSQHcol apresentar maior consumo bruto da dieta, contudo não houve uma redução no consumo alimentar dos grupos Hcol e PSQHcol, fato contraditório do esperado, pois é habitual ocorrer, em camundongos normais, uma redução no consumo alimentar com administração de dietas hipercalóricas, sugerindo desta forma, um aumento da saciedade, ocasionada pela elevação nos níveis de metabólicos plasmáticos como glicose, triacilglicerol e colesterol, provenientes das dietas.

Tabela 5: Peso inicial (PI), peso final (PF), delta da massa corporal e ingestão protéica (IP)<sup>1</sup> para grupos de camundongos alimentados com caseína hipercolesterolemiantes (Hcol), heterocoagulada (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes (PSQHcol) e normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial.

Grupos	Consumo alimentar (g)	PI (g)	PF (g)	$\Delta$ % <sup>*</sup>	IP (g)
Hcol	601,21 ± 4,23 <sup>a</sup>	34,72 ± 3,32 <sup>a</sup>	39,96 ± 2,49 <sup>a</sup>	13,8 ± 10,65 <sup>a</sup>	84,16±0,59 <sup>a</sup>
PSQHcol	644,73 ± 4,37 <sup>a</sup>	33,6 ± 1,15 <sup>a</sup>	27,65 ± 1,00 <sup>b</sup>	-20,42 ± 4,62 <sup>b</sup>	90,26±0,61 <sup>a</sup>
Ncal	623,44 ± 4,12 <sup>a</sup>	35,97 ± 4,35 <sup>a</sup>	38,85 ± 3,31 <sup>a</sup>	4,61 ± 17,18 <sup>a</sup>	87,28±0,57 <sup>a</sup>

Valores médios de 6 animais por grupo ± desvio padrão.

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

<sup>\*</sup>(Delta ( $\Delta$ %) = [(PF - PI) / PI] x 100)

## 8. Parâmetros bioquímicos

Neste trabalho foram estabelecidos alguns parâmetros fisiológicos e bioquímicos de camundongos normais. A análise dos dados aponta pequenas variações individuais. Contudo, as maiores partes dos dados obtidos corroboram com os dados da literatura (DANTAS *et al.*, 2007), enquanto outros apresentaram diferenças significativas. No entanto, alguns dados foram comparados apenas entre os grupos avaliados neste trabalho por apresentar valores abaixo dos encontrados na literatura.

É importante salientar que a quantidade da fonte lipídica (banha de porco) oferecida para os grupos Hcol e PSQHcol foi crucial quanto à determinação plasmática e tecidual de todos os parâmetros e avaliação dos perfis lipídicos.

A Figura 11 apresenta os teores lipídicos plasmáticos dos animais. O perfil lipídico total plasmático (LTP) de Hcol apresentou a maior concentração (385mg/dL), ou seja, 63% a mais comparado a Ncal, enquanto que PSQHcol apresentou um aumento de somente 7% da LTP.

As frações triglicérides (TG) de todos os animais mostraram teores abaixo de 30mg/dL. Houve hipertrigliceridemia no grupo Hcol se comparado a PSQHcol e Ncal apresentando um teor equivalente a 153% a mais frente à Ncal contra a somente 49% em PSQHcol.

Como estão representadas na Tabela 4, somente as dietas Hcol e PSQHcol apresentaram altas porcentagens de (SFA) (>26%). Entretanto, elevadas porcentagens de (SFA) promovem aumentos significativos nos níveis de colesterol e triglicérides plasmáticos podem ser acentuados pela presença do ácido palmítico (C16:0) e por ácidos graxos com cadeia carbônica menor que C16.

Em relação ao colesterol total plasmático (CTP), foi observado nos camundongos alimentados com Hcol, um teor de 218%, ou seja, 3 vezes maior se comparado com Ncal, sugerindo que houve hipercolesterolemia. Em contrapartida, não foi observado um aumento significativo nos níveis de CTP nos camundongos alimentados com PSQHcol. Os teores se mantiveram próximos dos níveis considerados normais.

A dieta PSQHcol apresentou importantes propriedades anticolesterolemiantes, proporcionando um controle nos níveis de colesterol total. Dantas *et al.*, (2007) determinaram como referência para ratos normais, uma concentração de CTP de 87 mg/dL, Haraguchi *et al.*, (2007) de 81mg/dL e Almeida *et al.*, (2002), 84mg/dL.

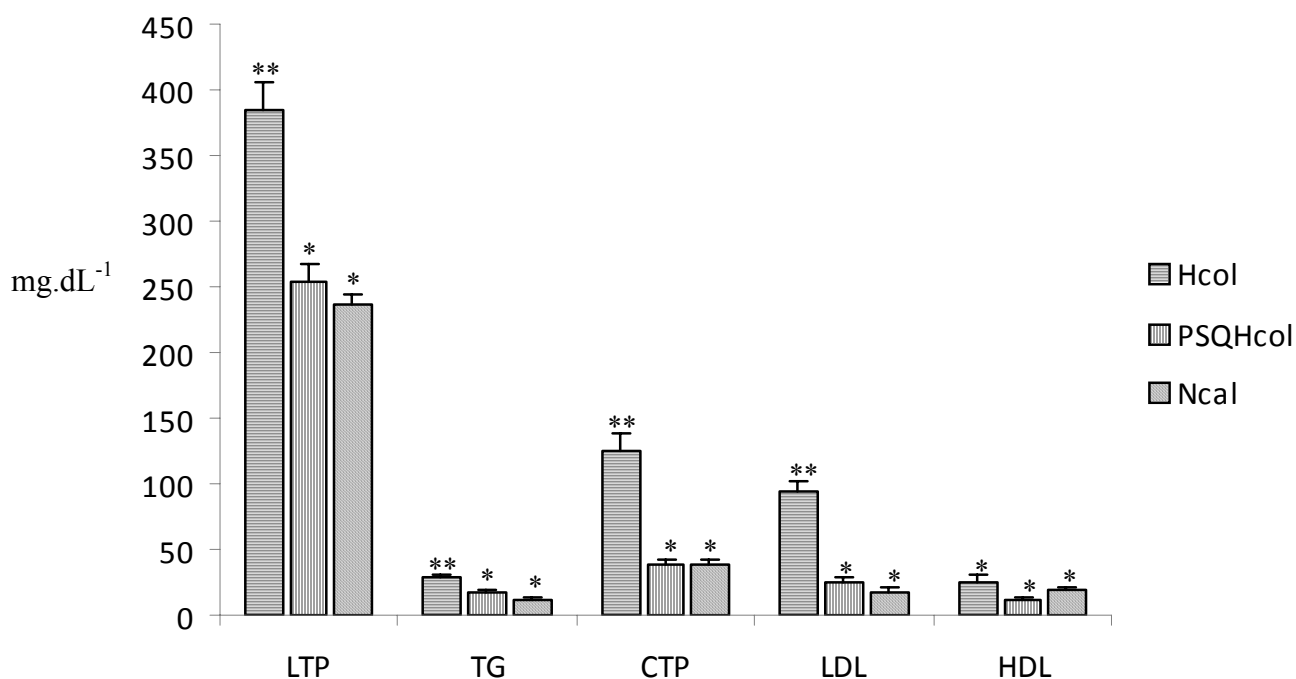


Figura 11: Média  $\pm$  desvio padrão N=6. Efeito da dieta no perfil lipídico plasmático em camundongos (mg/dL). Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiante; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiante e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. LTP – lipídios totais plasmático; TG – triglicérides; CTP – colesterol total plasmático; LDL – lipoproteínas de baixa densidade; HDL – lipoproteína de alta densidade. (\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Conforme mostrado anteriormente, houve um aumento significativo do CTP do grupo alimentado com dieta Hcol. Deste modo, ao analisarmos o perfil sérico dos componentes



aterogênicos plasmáticos, podemos observar que este aumento está relacionado aos níveis elevados das frações de LDL (Figura 10). Possivelmente o principal motivo seja um desequilíbrio na relação da taxa de produção e remoção dessas frações provocada pela dieta hipercolesterolêmica levando o grupo Hcol atingir elevados índices de valores plasmáticos dessa fração (124,62mg/dL), seguido de PSQHcol que obteve 38,89 e Ncal 39,14mg/dL.

Haraguchi (2006) observou que dietas hipercolesterolêmicas contendo concentrados de proteínas do soro (14 %) não foram capazes de reduzir o colesterol endógeno em ratos, corroborando com os resultados obtidos por Zhang & Beynen, (1993), quando estes utilizaram uma concentração de proteínas do soro similar (15 %). Entretanto, se essa concentração for aumentada (30 %), há um efeito significativo na redução do colesterol plasmático (Zhang & Beynen, 1993). Haraguchi *et al* (2006) obteve somente uma redução de 27% da concentração total de colesterol, por outro lado, a mesma dieta, de alguma maneira aumentou em 75% os níveis de triglicérides plasmáticos no grupo experimental.

Nagaoka *et al* (2001) empregaram 20% de proteína beta-lactoglobulina hidrolisada, como única fonte protéica, em dietas hipercolesterolêmicas e obtiveram uma redução de 19 % do colesterol plasmático e 24% da fração LDL.

Tabela 6: Comparação entre as dietas hipercolesterolêmicas contendo quitosana (Q) v. proteínas do soro (W) de diferentes autores.

Autores (% em 100g de dieta)	Redução (%)		
	CTP	LDL	TG
<i>De Souza (2009) (2,2% Q e 14% W)</i>	71%	97%	112%
Haraguchi <i>et al</i> (2007) (14% W)	27%	-	0%
Hossain <i>et al</i> (2007) (2% Q)	24%	35%	13%
Nagaoka <i>et al</i> (2001) (20% LH)	19%	24%	-
Zhang & Beynen (1992) (30% W)	47%	8%	43%
Sugano <i>et al</i> (1980) (5% Q)	30%	-	0%
Sugano <i>et al</i> (1980) (10% Q)	60%	-	0%

(-) análise não realizada pelos autores  
(0 %) representa um aumento da concentração

Sugano *et al.*, (1980) avaliaram o papel da quitosana em dietas hipercolesterolêmicas administradas em ratos machos e, demonstraram que a adição de 5% de quitosana resulta

numa redução de 30% do colesterol plasmático sem influenciar o consumo alimentar e o crescimento. Se o teor de quitosana for aumentado para 10 %, o colesterol é reduzido em 60 %, porém há um efeito negativo sobre o crescimento dos animais. Koid *et al.*, (1998) determinam que dietas contendo quitosana devem conter de 2 a 5% deste biopolímero.

Hossain *et al* (2007) adicionaram 2 % de quitosana em sua dieta hipercolesterolêmica e observaram uma redução de 24 % do colesterol plasmático, 35% LDL e 13% nas triglicérides.

O presente estudo avaliou o efeito da associação da quitosana, empregada como método de separação, e do heterocoagulado para adição em dietas hipercolesterolêmicas. A administração de 14 % do heterocoagulado em dietas de camundongos Swiss resultou na redução de 71 % do colesterol plasmático, 97 % do LDL e 112% de triglicérides. Aparentemente há um efeito somatório da quitosana e das proteínas do soro sobre essas frações lipídicas conferindo a esse heterocoagulado uma eficiência de 2 vezes mais quando comparados aos dados até agora foram encontrados na literatura.

A dieta PSQHcol não afetou significativamente nas frações de HDL (11,84mg/dL) quando comparado a Ncal (19,48mg/dL). Sautier *et al.*, (1983) demonstraram que dietas com proteínas do soro promovem redução no colesterol total que, por sua vez, também reduz as frações de HDL. Em relação à dieta Hcol, esta mostrou uma tendência de aumentar sua fração de HDL (24,99mg/dL), em função, possivelmente, de um elevado nível de colesterol nos tecidos.

Os teores lipídicos do fígado, músculo e tecido adiposo são sensíveis ao tipo de lipídio da dieta (Figura 12). Entretanto, essa sensibilidade só foi observada no EPI de Hcol, havendo um aumento significativo na concentração desse tecido (81%) quando comparado ao Ncal. Contudo, percebe-se uma tendência inversa das concentrações lipídicas plasmáticas em relação às hepáticas. Uma vez que as proteínas do soro aceleram a metabolização dos ácidos graxos no fígado ao mesmo tempo diminuí os níveis das frações aterogênicas, levando a idéia de que havia, naquele momento, altas taxas de oxidação lipídica.

Não houve diferença significativa entre os grupos amostrados quanto às concentrações lipídicas hepáticas e musculares.

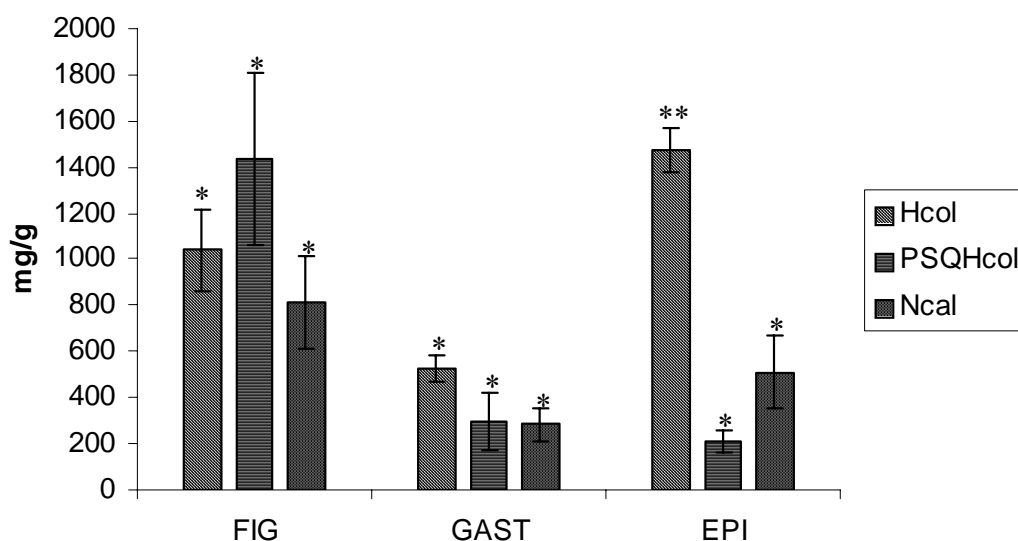


Figura 12: Média  $\pm$  desvio padrão N=6. Efeito da dieta no perfil lipídico tecidual em camundongos. Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. Lipídios totais do fígado (FIG), músculo gastrocnêmio (GAST) e tecido adiposo branco epididimal (EPI). (\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Os resultados demonstrados acima indicam que a dieta contendo o heterocoagulado (quitosana/proteínas) presente na dieta hipercolesterolêmica, amenizou significativamente o perfil dos lipídios aterogênicos. Observamos um efeito positivo quando se trata perda de massa corporal, que por sua vez foi mais proeminente no grupo PSQHcol. Animais adultos têm maior tendência a um descontrole no ganho de massa gorda quando os mesmos são submetidos a dietas hipercolesterolêmicas. Entretanto, dietas contendo quitosana e proteínas do soro isoladas da lactose e outros componentes presentes no soro do leite, contribuem para a manutenção do peso.

Muitos estudos têm demonstrado que dietas contendo quitosana como agente redutor de sobrepeso (HOSSAIN *et al.*, 2006), ainda permanece inconsistente. Por exemplo, Ho *et al.*, (2001) relataram que dietas contendo quitosana não possuem efeitos sobre a redução de sobrepeso, bem como na diminuição significativa da obesidade. Entretanto, os resultados obtidos nesse experimento indicam que dietas contendo, não somente quitosana, mas esse biopolímero quimicamente ligado às proteínas do soro, mostra um efeito significativo frente à redução de massa corpórea mesmo em dietas hipercolesterolêmicas.

A adição de 2% de colesterol na dieta basal dos camundongos mostrou hipercolesterolemia somente nos grupos com dieta Hcol. Na dieta contendo o heterocoagulado, podemos sugerir que este foi crucial na redução nos níveis do colesterol plasmático em PSQHcol. Nunthanid *et al.*, (2004) descreve essa atividade de modo que, a quitosana, em pH ácido do estômago induz a protonação dos seus grupos aminas, deste modo, uma vez no intestino, essa característica policatiônica sofre uma interação eletrostática e se liga fortemente a moléculas negativamente carregadas, dita colesterol e ácidos biliares. Contudo essas moléculas são secretadas nas fezes.

Muitos trabalhos apontam resultados consistentes frente à redução nos níveis de colesterol plasmático após a ingestão de quitosana. Esses resultados foram sustentados por Deuchi *et al.*, (1994) aplicados em ratos, por Ormrod *et al.*, (1998) aplicados em camundongos e por Bokura *et al.*, (2003) aplicados em humanos.

Em adição a esse potencial hipocolesterolêmico da quitosana, as proteínas do soro, podem oferecer uma vantagem desejável na composição corporal além de promoverem um decréscimo de massa magra corporal. As proteínas do soro possuem diferentes vias pelas quais demonstram exercer um significativo decréscimo nas atividades das enzimas lipogênicas hepáticas, além de reduzirem a expressão dessas enzimas com exceção do ácido graxo sintase (MORIFUJI *et al.*, 2005). Estudos recentes mostram que, dietas contendo minerais e  $Ca^{++}$ , promovem uma significativa diminuição nos depósitos de gordura e acelera a perda lipídica. Vários trabalhos têm mostrado que as proteínas do soro favorecem esse processo por mecanismos associados ao cálcio, presente nas proteínas do soro de leite, e pela interação de seus BCAA que constituem essas proteínas (ZEMEL *et al.*, 2000).

Um mecanismo proposto por Zemel *et al.*, (2000) está demonstrado na figura 13.

O mecanismo fisiológico, em consequência do alto consumo de  $Ca^{++}$  da dieta, diminui os estoques de lipídios nos adipócitos e ratos obesos e humanos. Esses dados demonstram que os hormônios calcitrópicos (Ex: hormônios da paratireóide e  $1,25-(OH)^2 - D$ ) os quais respondem à baixa concentração de  $Ca^{++}$  dietético, promovem o depósito de lipídios nos tecidos adiposos. A supressão desses hormônios ocorre via altas concentrações de  $Ca^{++}$  da dieta inibindo a lipogênese.

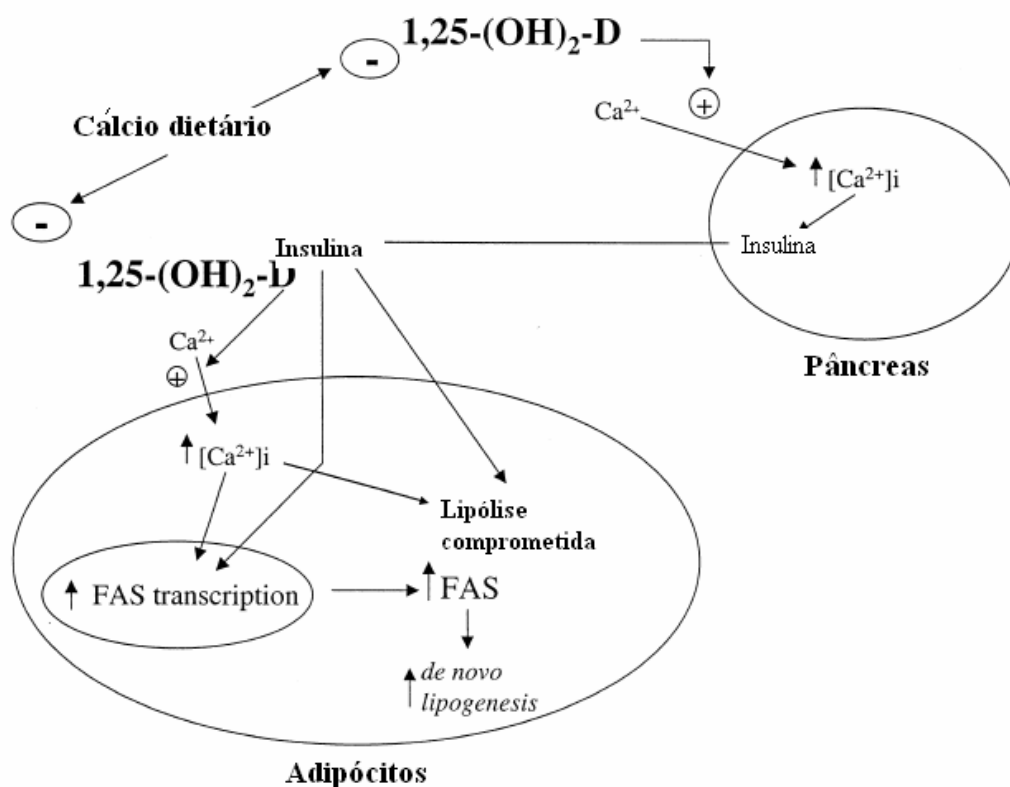


Figura 13: Inibição da lipogênese nos adipócitos por Cálcio. Modificado de Zemel *et al.*, (2000)

Os hormônios calcitrópicos estimulam o influxo e, conseqüentemente desencadeia um aumento intracelular da lipogênese mediada pelo  $\text{Ca}^{++}$ . O cálcio foi recentemente identificado como um regular chave no metabolismo lipídicos nos adipócitos, com o aumento intracelular de cálcio ocorre um aumento na expressão do gene lipogênico acarretando a lipogênese e a diminuição da lipólise. A supressão desses hormônios calcitrópicos pelo aumento do  $\text{Ca}^{++}$  dietário, resulta na inibição da lipogêneses, contudo, ocorre a lipólise e a mobilização dos lipídios.

Uma outra suposição seria que a proteína de maior fração (beta-lactoglobulina), quando é quebrada, libera peptídeos bioativos. Nagaoka *et al.*, (2001) identificou pela primeira vez os peptídeos provenientes da quebra da beta-lactoglobulina que está envolvida no processo de redução do colesterol endógeno. Neste trabalho o autor observou uma alta secreção de esteróides total nas fezes dos ratos alimentados com beta-lactoglobulina hidrolizada, no qual sustenta a hipótese de que esses peptídeos possuem uma alta capacidade de ligação nos ácidos biliares impedindo sua reabsorção no ílio, e, desta forma, reduzir o colesterol plasmático. Podemos sugerir, então que a eliminação do colesterol e ácido biliar nas

fezes desses animais forçaria o fígado a converter mais colesterol plasmático em ácidos biliares. Conseqüentemente a diminuição sérica de colesterol induz a síntese de receptores de LDL.

A Figura 14 mostra que a composição da dieta não influencia significativamente as massas do fígado e tecido muscular dos animais. No entanto, a massa do tecido adiposo epididimal (EPI) apresentou diferença significativa para o grupo Hcol, no qual houve uma imobilização de 1,50g, ou seja, quatro vezes mais comparado a média dos grupos PSQHcol e Ncal (0,36g).

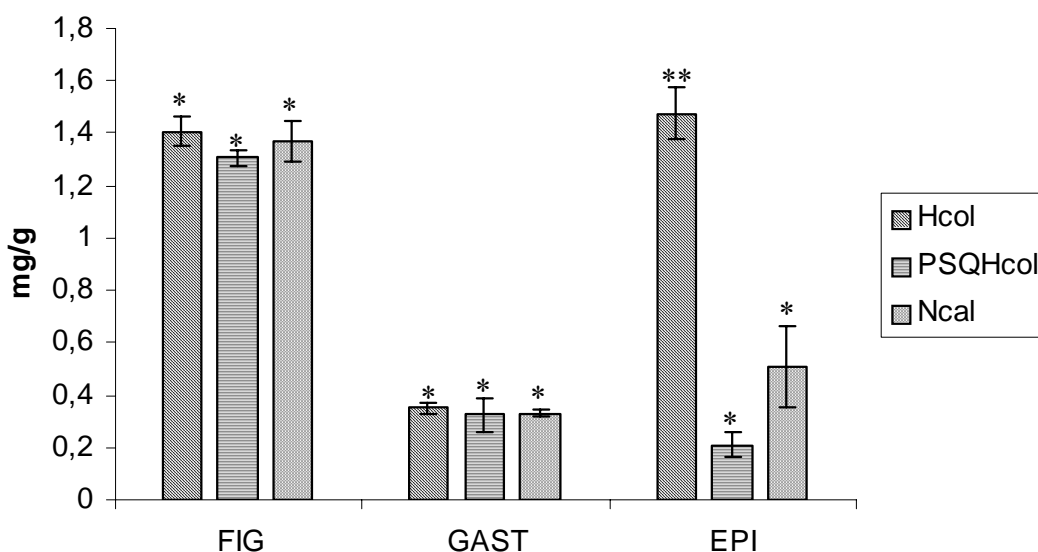


Figura 14: Média  $\pm$  desvio padrão N=3. Efeito da dieta no peso relativo tecidual em camundongos. Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com coservado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. Fígado (FIG), músculo gastrocnêmio(GAST) e tecido adiposo branco epididimal (EPI).  
(\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

As concentrações de proteínas totais do FIG e GAST estão apresentadas na Tabela 7. Pode-se observar uma diferença significativa em relação às concentrações protéicas do GAST de PSQHcol, o qual apresentou um aumento de 33% maior frente a média dos grupos controle. Enquanto que a concentração protéica no FIG proporcionou, significativamente, menores valores de proteínas totais mobilizadas.

Essas diferenças encontradas entre as concentrações de proteínas hepáticas e musculares em PSQHcol, sugere que o FIG não exerce um eficiente mobilizador das proteínas sintetizadas a partir dos aminoácidos provenientes das proteínas do soro, enquanto que o GAST armazena boa parte dos produtos provenientes do fígado. Esse comportamento

metabólico gira em torno do conceito proposto por Boire *et al.*, (1997), no qual descreve sobre proteínas de alta e de baixa absorção intestinal tais como proteínas do soro e a caseína respectivamente. Hall *et al.*, (2002) corroborou tal conceito confirmando que a caseína, como proteína coagulante, uma vez no intestino, exerce menor esvaziamento intestinal proporcionando uma baixa concentração plasmática na excursão pos-prandial de aminoácidos. As proteínas do soro comparadas à caseína, possuem comportamento não coagulante no intestino, resultando em uma alta concentração plasmática de aminoácidos que a disponibiliza como um eficiente substrato anabólico muscular.

Tal fato também se deve as BCAA, presentes no soro em concentrações significativamente altas, nas quais possuem importante papel na síntese global de proteínas (ANTHONY *et al.*, 2001). Entretanto, tudo indica que as proteínas sintetizadas no FIG são imediatamente translocadas para os músculos e outros tecidos no grupo PSQHcol.

Tabela 7: Média  $\pm$  desvio padrão N=3. Efeito da dieta na concentração protéica do fígado e músculo gastrocnêmio (mg/g), em camundongos. Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. Fígado (FIG), músculo gastrocnêmio(GAST).

	Hcol	PSQHcol	Ncal
<b>FIG</b>	103,99 $\pm$ 7,44*	65,92 $\pm$ 1,99**	106,92 $\pm$ 9,08*
<b>GAST</b>	89,45 $\pm$ 8,30*	107,76 $\pm$ 6,43**	74,39 $\pm$ 5,42*

(\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05).

As proteínas do soro exercem um importante papel por influenciar o anabolismo muscular. Bos *et al.*, (2000) e Dillar *et al.*, (2002), sugeriram um mecanismo associado às BCAA, principalmente devido ao papel da leucina, que se encontra em abundância nas proteínas do soro, e estimula o metabolismo protéico. Esses autores determinaram que a leucina age como um importante sinalizador na rota de iniciação traducional na síntese de proteínas no músculo esquelético.

Na Figura 15 podemos observar que não houve diferença significativa entre os grupos para a concentração de glicose, levando a crer que a dieta contendo o heterocoagulado não exerceu influência sobre esse parâmetro. Este resultado refuta os resultados da literatura, pois as proteínas do soro são conhecidas por induzir um aumento nos níveis de glicose plasmática e também aumentar a eficiência da gliconeogênese. Este aumento se deve a composição dos

aminoácidos nas frações protéicas que são constituídas principalmente dos aminoácidos sulfurados, metionina e cistina, assim como os BCAA (BLASUBRAMANYAM *et al.*, 1999).

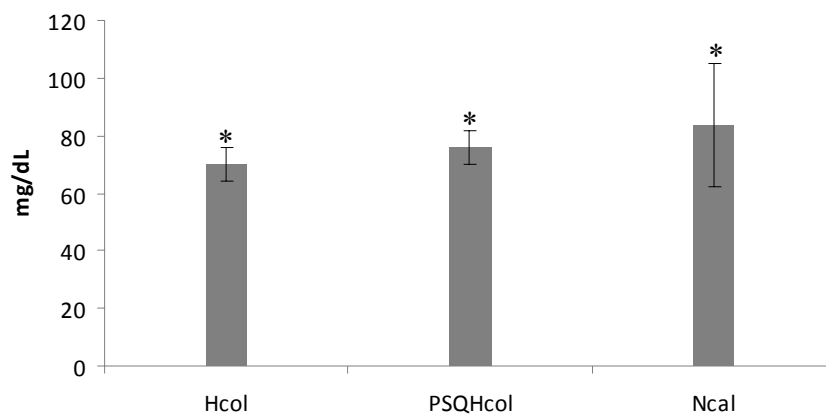


Figura 15: Média  $\pm$  desvio padrão N=3. Efeito da dieta sobre a glicemia após 16h de jejum em camundongos. Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial. Fígado (FIG), músculo gastrocnêmio(GAST) e tecido adiposo branco epididimal (EPI). (\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

O aumento das frações de BCAA nas células musculares favorece sua transaminação, com consequente síntese dos aminoácidos alanina e glutamina. Nas células hepáticas, esses aminoácidos são empregados como fontes de carbono para a gliconeogênese hepática via ciclo alanina-glicose (AHLBORG *et al.*, 1974; BLASUBRAMANYAM *et al.*, 1999). Considerando que a concentração de glicose mensurada reflete uma condição de jejum prolongado (16 h), os dados sugerem que todas as dietas forneceram substratos suficientes para manter a homeostase glicêmica desses animais durante o jejum prolongado.

## 9. Perfil de ácidos graxos neutros e polares

A determinação do perfil de ácidos graxos dos tecidos adiposo, muscular e fígado, permitiu investigar a porcentagem de ácido graxo e consequentemente avaliar os principais agrupamentos tais como, ácidos graxos saturado (SFA), monoinsaturados (MUFA), polinsaturados das famílias n3 (PUFA/n3) e n6 (PUFA/n6), das porções neutras (triglicérides)



e polares dos grupos experimentais. Em adição a essas análises empregaram-se dois parâmetros para se mensurar o grau de insaturação, a razão insaturado e saturado (U/S) e o índice de insaturação (UI). Este último é uma forma de avaliar igualmente o perfil de ácidos graxos insaturados considerando o grau de insaturação de cada um. Esses dois parâmetros indicam diferentes imagens de insaturação sintetizados em alguns casos.

Os lipídios polares, principalmente os fosfolipídios, atuam basicamente como componentes estruturais, responsáveis pela manutenção da fluidez das membranas celulares atuando como um eficiente componente associado a vários fenômenos regulatórios celulares, enquanto os neutros atuam como fornecedores de energia.

O perfil de ácidos graxos do tecido adiposo epididimal (EPI), do músculo gastrocnêmio (GAST) e do fígado (FIG), como também a razão ácidos graxos insaturados/saturados (U/S) e o índice de insaturação (UI) estão representados nas Tabelas 8, 9 e 10 respectivamente.

Na fração neutra (triglicérides) dos ácidos graxos presente no EPI (Tabela 8), observa-se uma concentração relativamente maior de (SFA) em Hcol. Destes, o ácido palmítico (C16:0) aparece em maior quantidade em todos os grupos. Entretanto, houve uma maior deposição desse (SFA) em Hcol (14,83%) frente aos outros grupos.

Para o grupo dos (MUFAs) foram encontrados, significativamente, maiores concentrações em PSQHcol (50,84%), desses, somente o ácido graxo oléico (C18:1) apareceu em maior concentração em todos os grupos. Contudo, essa concentração foi significativa somente para PSQHcol (50,84%).

Na família dos (PUFAs), somente o ácido linoléico (C18:2n6) atingiu altas concentrações em todos os grupos, sendo este significativo em Ncal (41,25%) frente a 29,55% Hcol e 28,68% PSQHcol. Com base nessas informações, podemos inferir que no grupo PSQHcol apresenta tendência em diminuir a razão (saturado/MUFAs), levando o mesmo a uma razão U/S a 12% maior frente aos grupos controles. Analisando o UI, podemos observar uma porcentagem significativamente maior em Ncal (128,97%), seguido de PSQHcol que possui uma tendência em aumentar esse valor.

Em relação à fração trigliceridêmica do músculo gastrocnêmio (Tabela 9), e fígado (Tabela 10) apresentaram um mesmo aspecto tendencioso encontrado no tecido adiposo, no qual as concentrações foram relativamente maiores de (SFA) em Hcol e menores em PSQHcol e Ncal. Tendo em vista o (SFA) em maior concentração destaca-se C16:0 em todos os grupos, não havendo diferença significativa no GAST, apesar de haver menor concentração desse ácido graxo em PSQHcol e Ncal. Entretanto, no fígado, houve uma porcentagem

significativamente maior na deposição de (SFA) nos grupos Hcol (18%) frente aos outros grupos. Destaca-se o fato de que o ácido palmítico se manteve nas mesmas proporções em todos os tecidos do grupo alimentado com a dieta PSQHcol.

Dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), também destaca-se o oléico (C18:1), o qual foi encontrado em concentrações significativamente maiores nos grupos PSQHcol (52,44% GAST e 43,03% FIG).

Quanto aos (PUFAs), conforme esperado, se destaca somente o ácido linoléico (C18:2n6), o qual, alcançou altos teores em todos os grupos em ambos os tecidos (GAST e FIG) mostrando significância somente para os grupos Ncal (34,87 e 37,65) respectivamente.

Podemos observar nos tecidos GAST e FIG uma razão U/S relativamente maior em PSQHcol em relação aos grupos controle. O índice de insaturação, no grupo Ncal apresentou-se significativamente maiores em função das altas taxas de (PUFAs).

Neste estudo, utilizamos dois métodos para se determinar o grau de insaturação de todos os grupos de ácidos graxos identificados, o índice de insaturação (UI) e a proporção de insaturados/saturados. Esses dois índices produzem diferentes imagens de insaturação nos mesmos casos. Por exemplo, o IU, das triglicérides do GAST e EPI foram aproximadamente semelhantes nos grupos Hcol e PSQHcol, sendo este último relativamente maior em Ncal (126%).

Enquanto a U/S, PSQHcol apresentou uma maior relação, entretanto, podemos inferir que esse grupo possui em seu perfil um maior grau de insaturados constituindo sua reserva de triglicérides. Diferentemente do que ocorre no tecido hepático, onde é possível observar que Hcol e Ncal apresentam UI parecidos, mas quando se trata de U/S, PSQHcol apresenta uma razão de 23% maior que a média dos grupos controles em seu perfil.

Tabela 8: Tabela 8: Distribuição das concentrações percentual de ácidos graxos neutros individuais, como também o índice de insaturação no tecido adiposo epididimal (EPI) nos grupos Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol -dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal - dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial.

<b>EPI</b>	<b>Hcol</b>		<b>PSQHcol</b>		<b>Ncal</b>	
C14:0	0,54	±0,03	0,37	±0,04	0,48	±0,05
C16:0	14,83	±1,37	10,87	±1,07	13,49	±1,03
C16:1	4,19	±0,21	1,85	±0,08	3,55	±0,54
C17:0	0,16	±0,02	0,17	±0,01	0,13	±0,01
C17:1	0,26	±0,03	0,17	±0,01	0,17	±0,00
C18:0	1,99	±0,03	3,43	±0,38	1,96	±0,36
C18:1	46,35*	±1,17	50,84**	±1,52	35,20*	±0,82
C18:2n6t	29,55*	±1,56	28,68*	±1,35	41,25**	±0,91
C18:3n6	0,11	±0,01	0,10	±0,01	-	-
C18:3n3	1,19	±0,03	0,72	±0,09	1,52	±0,18
C18:4n3	-	-	0,12	±0,01	-	-
C20:0	-	-	0,15	±0,01	0,22	±0,06
C20:1	0,80	±0,02	1,58	±0,08	1,37	±0,21
C20:2n6	0,37	±0,03	0,61	±0,01	0,22	±0,04
C20:3n6	0,13	±0,01	0,14	±0,01	0,16	±0,01
C20:4n6	0,23	±0,02	0,22	±0,02	0,17	±0,02
C20:5n3	0,12	±0,01	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>100</b>		<b>100</b>		<b>100</b>	
<b>SFA</b>	<b>16,86</b>	<b>±0,82</b>	<b>14,98</b>	<b>±1,17</b>	<b>16,28</b>	<b>±0,66</b>
<b>MUFA</b>	<b>51,61</b>	<b>±1,07</b>	<b>54,44</b>	<b>±1,49</b>	<b>40,29</b>	<b>±0,94</b>
<b>PUFA</b>	<b>31,54*</b>	<b>±1,60</b>	<b>30,52*</b>	<b>±1,24</b>	<b>43,33**</b>	<b>±0,85</b>
<b>PUFA/n6</b>	<b>30,31*</b>	<b>±1,57</b>	<b>29,68*</b>	<b>±1,30</b>	<b>41,81**</b>	<b>±0,95</b>
<b>PUFA/n3</b>	<b>1,23</b>	<b>±0,07</b>	<b>0,84</b>	<b>±0,09</b>	<b>1,52</b>	<b>±0,18</b>
<b>U/S</b>	<b>4,96</b>	<b>±0,573</b>	<b>5,76</b>	<b>±0,295</b>	<b>5,16</b>	<b>±0,261</b>
<b>UI</b>	<b>116,62*</b>	<b>±2,454</b>	<b>117,06*</b>	<b>±1,865</b>	<b>128,97**</b>	<b>±1,114</b>

Média ± desvio padrão N=3.

(\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05).

SFA - ácidos graxos saturados; MUFA - ácidos graxos monoinsaturados; PUFA - ácidos graxos polinsaturado.

U/S - insaturado/saturado; UI - índice de insaturação (a média do número de dupla ligação por ácido graxo x 100).

(-) - não detectado.

Tabela 9: Distribuição das concentrações percentual de ácidos graxos neutros individuais, como também o índice de insaturação músculo gastrocnêmio (GAST) nos grupos Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial.

<b>GAST</b>	<b>Hcol</b>		<b>PSQHcol</b>		<b>Ncal</b>	
C14:0	0,65	±0,01	0,47	±0,09	0,94	±0,06
C14:1	-	-	0,47	±0,1	0,22	±0,08
C16:0	12,60	±0,59	10,53	±0,80	12,54	±0,44
C16:1	5,59	±1,08	2,65	±0,37	10,50	±2,47
C17:0	0,13	±0,01	0,17	±0,01	0,11	±0,01
C17:1	0,24	±0,01	0,17	±0,01	0,23	±0,04
C18:0	2,19	±0,19	3,35	±0,64	1,44	±0,12
C18:1	49,28*	±0,06	52,44**	±0,80	33,95*	±1,28
C18:2n6t	26,95*	±0,90	25,05*	±0,10	34,87**	±1,45
C18:3n3	0,80	±0,06	0,72	±0,07	1,34	±0,01
C18:4n3	-	-	0,16	±0,02	-	-
C20:0	-	-	0,13	±0,00	0,13	±0,01
C20:1	0,95	±0,14	1,05	±0,14	0,84	±0,26
C20:2n6	0,41	±0,04	0,49	±0,04	0,14	±0,01
C20:3n6	0,09	±0,01	0,13	±0,01	0,15	±0,08
C20:4n6	0,18	±0,03	0,27	±0,07	0,50	±0,23
C20:5n3	0,13	±0,02	0,15	±0,02	-	-
C22:2n6	0,14	±0,01	0,12	±0,04	0,34	±0,16
C22:4n6	-	-	-	-	0,56	±0,02
C22:5n3	-	-	-	-	0,34	±0,13
C22:6n3	-	-	0,64	±0,05	0,12	±0,02
<b>Total</b>	<b>100</b>		<b>100</b>		<b>100</b>	
<b>SFA</b>	<b>15,44</b>	<b>±0,68</b>	<b>14,44</b>	<b>±1,45</b>	<b>15,19</b>	<b>±0,48</b>
<b>MUFA</b>	<b>56,06**</b>	<b>±0,94</b>	<b>56,41**</b>	<b>±0,49</b>	<b>45,84*</b>	<b>±1,11</b>
<b>PUFA</b>	<b>28,35*</b>	<b>±1,00</b>	<b>27,04*</b>	<b>±0,27</b>	<b>38,00**</b>	<b>±0,76</b>
<b>PUFAn6</b>	<b>27,51*</b>	<b>±1,03</b>	<b>25,95*</b>	<b>±0,10</b>	<b>36,20**</b>	<b>±0,90</b>
<b>PUFAn3</b>	<b>0,84</b>	<b>±0,04</b>	<b>1,09</b>	<b>±0,16</b>	<b>1,80</b>	<b>±0,14</b>
<b>U/S</b>	<b>5,49</b>	<b>±0,29</b>	<b>5,91</b>	<b>±0,65</b>	<b>5,53</b>	<b>±0,14</b>
<b>UI</b>	<b>114,10</b>	<b>±1,71</b>	<b>113,47</b>	<b>±1,70</b>	<b>126,32**</b>	<b>±1,1</b>

Média ± desvio padrão N=3.

(\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05).

SFA – ácidos graxos saturados; MUFA – ácidos graxos monoinsaturados; PUFA – ácidos graxos polinsaturados.

U/S – insaturado/saturado; UI – índice de insaturação (a média do número de dupla ligação por ácido graxo x 100).

(-) – não detectado.

Tabela 10: Distribuição das concentrações percentual de ácidos graxos neutros individuais, como também o índice de insaturação no fígado (FIG) nos grupos Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol - dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal - dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial.

<b>FIG</b>	<b>Hcol</b>		<b>PSQHcol</b>		<b>Ncal</b>	
C14:0	0,28	±0,04	0,27	±0,06	0,50	±0,14
C14:1	-	-	0,15	±0,05	0,36	±0,05
C15:0	-	-	0,21	±0,08	0,27	±0,12
C15:1	-	-	0,12	±0,01	0,25	±0,09
C16:0	18,00*	±1,23	10,32**	±0,32	15,94*	±0,83
C16:1	2,10	±0,15	1,40	±0,25	2,98	±0,06
C16:2	0,14	±0,02	0,44	±0,02	0,33	±0,07
C17:0	0,14	±0,01	0,36	±0,22	0,39	±0,28
C17:1	0,17	±0,00	0,24	±0,08	0,24	±0,11
C18:0	2,66	±0,22	6,36	±1,28	3,23	±1,47
C18:1	33,73*	±1,34	43,03**	±1,43	25,97*	±1,54
C18:2n6t	33,35*	±0,62	25,96*	±2,48	37,65**	±5,34
C18:3n6	0,70	±0,06	0,64	±0,11	0,69	±0,23
C18:4n6	-	-	-	-	2,42	±0,89
C18:3n3	1,09	±0,06	1,14	±0,35	1,32	±0,58
C18:4n3	0,18	±0,02	0,30	±0,09	0,26	±0,02
C20:0	0,09	±0,01	0,29	±0,13	0,28	±0,07
C20:1	0,43	±0,03	1,40	±0,07	0,87	±0,36
C20:2n6	0,21	±0,01	1,33	±0,06	0,59	±0,25
C20:3n6	0,27	±0,05	0,93	±0,12	0,45	±0,13
C20:4n6	2,60	±0,10	2,48	±0,09	3,42	±0,09
C20:3n3	-	-	0,23	±0,08	0,29	±0,08
C20:5n3	0,38	±0,06	0,30	±0,06	0,39	±0,05
C22:2n6	0,67	±0,01	0,30	±0,02	0,32	±0,06
C22:4n6	0,23	±0,01	0,66	±0,10	0,52	±0,16
C22:5n6	0,13	±0,01	0,44	±0,07	0,37	±0,15
C22:5n3	0,73	±0,26	0,61	±0,20	0,60	±0,08
C22:6n3	1,89	±0,01	0,81	±0,25	2,12	±0,11
<b>Total</b>	<b>100</b>		<b>100</b>		<b>100</b>	
<b>SFA</b>	<b>21,14</b>	<b>±1,53</b>	<b>17,57</b>	<b>±1,73</b>	<b>20,51</b>	<b>±2,66</b>
<b>MUFA</b>	<b>36,42*</b>	<b>±1,49</b>	<b>**46,16</b>	<b>±1,16</b>	<b>30,17*</b>	<b>±2,10</b>
<b>PUFA</b>	<b>41,98*</b>	<b>±0,07</b>	<b>35,78*</b>	<b>±1,58</b>	<b>48,90**</b>	<b>±4,59</b>
<b>PUFAn6</b>	<b>37,71</b>	<b>±0,30</b>	<b>32,55</b>	<b>±2,38</b>	<b>44,42</b>	<b>±4,06</b>
<b>PUFAn3</b>	<b>4,27</b>	<b>±0,33</b>	<b>3,23</b>	<b>±1,00</b>	<b>4,48</b>	<b>±0,60</b>
<b>U/S</b>	<b>3,76</b>	<b>±0,354</b>	<b>4,77</b>	<b>±0,527</b>	<b>4,01</b>	<b>±0,613</b>
<b>UI</b>	<b>143,03</b>	<b>±1,077</b>	<b>139,13</b>	<b>±2,973</b>	<b>155,86**</b>	<b>±5,704</b>

Média ± desvio padrão N=3.

(\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05).

SFA - ácidos graxos saturados; MUFA - ácidos graxos monoinsaturados; PUFA - ácidos graxos polinsaturado.

U/S - insaturado/saturado; UI - índice de insaturação (a média do número de dupla ligação por ácido graxo x 100).

(-) - não detectado.

Nas Tabelas 11, 12 e 13 estão representados as composições dos ácidos graxos das frações fosfolipídicas dos três tecidos (EPI, GAST e FIG) respectivamente e as atividades estimadas das enzimas alongase (AL),  $\Delta^5$ -dessaturase (D5),  $\Delta^6$ -dessaturase (D6),  $\Delta^9$ -dessaturase-C16 (D9-C16),  $\Delta^9$ -dessaturase-C18 (D9-C18); como também a proporção dos ácidos graxos insaturados/saturados (U/S) e o índice de insaturação (UI).

Na tabela 11 encontra-se o perfil dos ácidos graxos dos fosfolipídios do EPI. Observa-se uma concentração relativamente similar de (SFA) entre os grupos. Dentre os (SFA), destacam-se os ácidos palmítico (C16:0) e o esteárico (C18:0), que aparecem em maior quantidade em todos os grupos. Entretanto, não houve diferença significativa entre eles.

Em relação aos ácidos graxos monoinsaturados, PSQHcol apresentou significativamente maior concentração, ou seja, 12% a mais frente a Ncal. Destes, destaca-se somente o ácido graxo oléico (C18:1), no qual aprece em maior concentração em todos os grupos. Contudo, essa concentração foi significativa somente para PSQHcol (40,50%). Em contraste a essa concentração podemos observar que também houve um aumento na atividade estimada da AL no mesmo grupo.

Comparando a família dos (PUFAs), somente o ácido linoléico (C18:2n6) foi mais frequente nos fosfolipídios, alcançando concentrações elevadas em todos os grupos. Este foi significativo somente para os grupos Ncal (33,77%) frente a 24,91% Hcol e 22,27% PSQHcol. Nesse tecido, PSQHcol revelou um aumento estimado da D5 e um pequeno decréscimo na D9-C16 e D9-C18. Enquanto a D6, revelou ser similar em todos os grupos. Analisando o UI, podemos observar maiores valores em Hcol (124,64%), seguido de Ncal (119,18%) e, finalmente, PSQHcol (113,72%), entretanto, esses valores não foram significativos entre eles.

O perfil dos ácidos graxos polares no músculo gastrocnêmio (Tabela 11), mostra que nos grupos Hcol ocorrem menores concentrações de (SFA) (21,07%) e maiores de (MUFA) (38,69%). Também se destacam, entre a família dos (SFA), o ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), ocorrendo maiores concentrações em PSQHcol (dado não significativo). Para os (MUFAs), como esperado, ocorre em maior concentração o oléico (C18:1) sendo este significativo em Hcol.

No caso dos ácidos graxos polinsaturados, observa-se em PSQHcol e Ncal um valor significativamente alto (50,72 e 60,09%) respectivamente. Dentre estes, se destacam os da família n6 (21,52 e 24,77%) e n3 (29,21 e 35,32%). Contudo, ocorre a presença de uma alta concentração do ácido docosaenóico DHA em PSQHcol (21,80%), ou seja, 33% a mais que a média dos grupos controles. Apesar da razão U/S apresentar-se baixa nos grupos

PSQHcol, o UI foi significativamente alto quando comparado ao grupo Hcol. Em adição, podemos estimar uma maior atividade das enzimas AL e D5 em PSQHcol, D9-C16 e D9-C18 foram mais ativas em Hcol.

O perfil dos ácidos graxos no fígado está representado na Tabela 11. Podemos observar em todos os grupos uma concentração similar de SFA. Os grupos PSQHcol apresentam índices significativamente maiores de (MUFA) (21,879%). Como esperado, ocorre em maior concentração o oléico (C18:1) sendo este significativo PSQHcol.

Dentre os PUFA, observam-se maiores valores em Ncal e Hcol (58,27 e 56,44%) respectivamente. Dentre este, também se destacam os da família n3. Contudo, foi encontrada uma relação inversa da observada em GAST, ou seja, foram encontrados maiores valores da fração DHA nos grupos Hcol e Ncal. Não houve diferença significativa na razão U/S e no UI entre os grupos. Avaliando esses parâmetros é importante a realização de uma contraprova do experimento devido ao percentual alto de erro apresentado nos grupos.

Em adição, podemos estimar em PSQHcol, uma maior atividade de todas as enzimas analisadas, exceto para D6 que permaneceu similar entre os grupos.

Tabela 11: Distribuição das concentrações percentual de ácidos graxos polares individuais, como também o índice de insaturação e atividade estimada das enzimas desaturases e alongase do tecido adiposo epididimal (EPI) nos grupos Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/ proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial.

<b>EPI</b>	<b>Hcol</b>		<b>PSQHcol</b>		<b>Ncal</b>	
C14:0	0,55	±0,15	1,03	±0,35	0,76	±0,15
C15:0	0,20	±0,02	0,34	±0,19	0,26	±0,08
Plasm16:0	2,78	±1,97	0,43	±0,11	0,18	±0,07
C16:0	13,82	±0,46	12,32	±4,49	15,26	±0,95
C16:1	3,48	±0,65	2,90	±0,70	3,40	±0,39
C17:0	0,26	±0,04	0,59	±0,02	0,39	±0,19
plasm 18:0	0,78	±0,33	0,45	±0,12	0,12	±0,07
C18:0	5,27	±0,66	7,04	±0,69	5,46	±1,73
C18:1	37,94*	±0,35	40,50**	±2,33	32,83*	±1,18
C18:2n6	24,9*1	±0,42	22,27*	±1,74	33,77**	±3,21
C18:3n6	0,59	±0,42	0,21	±0,05	0,26	±0,13
C18:4n6	0,92	±0,07	0,80	±0,40	1,31	±0,03
C18:3n3	0,71	±0,52	0,09	±0,03	0,38	±0,15
C18:4n3	-	-	0,18	±0,02	0,25	±0,16
C20:0	0,91	±0,29	0,89	±0,26	1,06	±0,17
C20:1	0,15	±0,02	0,33	±0,19	0,22	±0,08
C20:3n6	1,08	±0,62	0,36	±0,06	0,35	±0,04
C20:4n6	2,16	±0,57	2,81	±0,99	1,48	±0,55
C20:3n3	0,62	±0,20	0,14	±0,03	0,52	±0,36
C20:4n3	-	-	0,17	±0,03	-	-
C20:5n3	-	-	0,07	±0,00	0,21	±0,16
C22:0	-	-	0,21	±0,03	0,14	±0,01
C22:2n6	0,97	±0,50	0,17	±0,00	0,35	±0,23
C23:0	0,22	±0,06	0,25	±0,02	0,09	±0,02
C22:4n6	0,40	±0,15	0,14	±0,01	0,13	±0,06
C22:5n6	0,62	±0,38	-	-	-	-
C22:4n3	0,27	±0,02	0,23	0, ±07	0,22	±0,07
C22:5n3	0,97	±0,35	0,09	0,0±2	0,19	±0,14
C22:6n3	0,48	±0,21	0,94	0,3±0	0,64	±0,25
C24:0	-	-	0,08	0,0±2	0,35	±0,29
<b>Total</b>	<b>100</b>		<b>100</b>		<b>100</b>	
<b>SFA</b>	<b>21,15</b>	<b>±0,42</b>	<b>22,28</b>	<b>±4,27</b>	<b>23,74</b>	<b>±2,47</b>
<b>MUFA</b>	<b>41,56</b>	<b>±0,91</b>	<b>43,73</b>	<b>±1,56</b>	<b>36,52</b>	<b>±1,21</b>
<b>PUFA</b>	<b>34,16</b>	<b>±2,30</b>	<b>28,37</b>	<b>±2,57</b>	<b>39,26</b>	<b>±1,72</b>
<b>PUFAn6</b>	<b>31,52</b>	<b>±1,65</b>	<b>26,66</b>	<b>±2,03</b>	<b>37,10</b>	<b>±2,79</b>
<b>PUFAn3</b>	<b>2,64</b>	<b>±0,65</b>	<b>1,71</b>	<b>±0,56</b>	<b>2,16</b>	<b>±1,07</b>
<b>U/S</b>	<b>3,59</b>	<b>±0,185</b>	<b>2,82</b>	<b>±0,589</b>	<b>3,21</b>	<b>±0,468</b>
<b>UI</b>	<b>124,64</b>	<b>±5,67</b>	<b>113,72</b>	<b>±9,014</b>	<b>119,18</b>	<b>±1,495</b>
Alongase	0,38	±0,0424	0,48	±0,012	0,43	±0,119
Δ5-Dessaturase	5,18*	±0,351	9,31**	±1,65	7,25*	±0,725
Δ6-Dessaturase	0,01	±0,00369	0,01	±0,00281	0,01	±0,00507
Δ9-Dessaturase-16	0,23	±0,02	0,17	±0,01	0,20	±0,02
Δ9-Dessaturase-18	6,57	±1,005	5,63	±0,571	6,10	±2,294

Média ± desvio padrão N=3.

(\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05).

SFA – ácidos graxos saturados; MUFA – ácidos graxos monoinsaturados; PUFA – ácidos graxos polinsaturado.

U/S – insaturado/saturado; UI – índice de insaturação (a média do número de dupla ligação por ácido graxo x 100).

(-) – não detectado.



Tabela 12: Distribuição das concentrações percentual de ácidos graxos polares individuais, como também o índice de insaturação e atividade estimada das enzimas desaturases e alongase do músculo gastrocnêmio (GAST) nos grupos Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol –dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal – dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial.

<b>GAST</b>	<b>Hcol</b>		<b>PSQHcol</b>		<b>Ncal</b>	
C14:0	0,47	±0,01	0,60	±0,06	0,54	±0,16
C15:0	0,11	±0,00	0,15	±0,02	0,17	±0,02
Plasm16:0	0,88	±0,11	1,59	±0,16	1,33	±0,20
C16:0	8,68	±1,23	11,51	±2,06	6,25	±0,72
C16:1	2,72	±0,44	0,96	±0,03	0,83	±0,22
C17:0	0,38	±0,05	0,32	±0,03	0,69	±0,49
plasm 18:0	0,63	±0,08	1,23	±0,23	1,02	±0,30
C18:0	9,96	±1,45	15,85	±0,67	12,36	±1,47
C18:1	35,72**	±9,37	14,20*	±1,05	6,76*	±2,02
C18:2n6	9,55	±1,94	9,39	±0,68	7,78	±1,89
C18:3n6	0,47	±0,09	0,67	±0,30	2,51	±2,12
C18:4n6	0,17	±0,04	0,47	±0,03	0,21	±0,05
C18:3n3	-	-	0,19	±0,13	0,09	±0,03
C18:4n3	0,45	±0,01	0,61	±0,44	6,58	±2,95
C20:0	0,18	±0,08	0,26	±0,06	2,26	±1,54
C20:1	0,25	±0,01	0,78	±0,39	2,78	±2,57
C20:2n6	0,80	±0,10	0,65	±0,16	1,02	±0,30
C20:4n6	4,68	±1,17	5,81	±2,16	7,09	±2,07
C20:3n3	2,18	±0,00	0,28	±0,09	0,75	±0,58
C20:4n3	0,38	±0,16	2,36	±1,42	5,06	±3,01
C20:5n3	-	-	0,20	±0,01	0,46	±0,10
C22:0	0,41	±0,20	0,08	±0,01	0,21	±0,10
C22:2n6	0,62	±0,05	1,64	±0,80	3,73	±3,17
C23:0	0,88	±0,45	0,64	±0,46	5,31	±3,90
C22:4n6	0,97	±0,90	1,48	±0,61	2,77	±0,69
C22:5n6	1,03	±0,00	2,36	±0,47	-	-
C22:4n3	1,94	±0,19	2,18	±0,14	4,11	±2,08
C22:5n3	1,66	±0,62	1,58	±1,08	2,13	±1,58
C22:6n3	14,76*	±3,86	21,80**	±1,63	16,30*	±6,34
C24:0	0,09	±0,03	0,91	±0,68	0,24	±0,01
<b>Total</b>	<b>100</b>		<b>100</b>		<b>100</b>	
<b>SFA</b>	<b>21,07</b>	<b>±2,97</b>	<b>29,39</b>	<b>±2,49</b>	<b>27,02</b>	<b>±4,99</b>
<b>MUFA</b>	<b>38,69**</b>	<b>±9,80</b>	<b>15,93*</b>	<b>±0,91</b>	<b>10,37*</b>	<b>±3,56</b>
<b>PUFA</b>	<b>38,59*</b>	<b>±6,62</b>	<b>50,72*</b>	<b>±1,33</b>	<b>60,09**</b>	<b>±8,83</b>
<b>PUFAn6</b>	<b>17,95*</b>	<b>±3,77</b>	<b>21,52*</b>	<b>±2,64</b>	<b>24,77**</b>	<b>±5,92</b>
<b>PUFAn3</b>	<b>20,64*</b>	<b>±2,85</b>	<b>29,21**</b>	<b>±3,32</b>	<b>35,32**</b>	<b>±3,01</b>
<b>U/S</b>	<b>3,84</b>	<b>±0,607</b>	<b>2,31</b>	<b>±0,235</b>	<b>2,88</b>	<b>±0,747</b>
<b>UI</b>	<b>201,05*</b>	<b>±20,07</b>	<b>241,30**</b>	<b>±10,85</b>	<b>258,10**</b>	<b>±22,00</b>
Alongase	1,11	±0,00317	1,37	±0,244	1,77	±0,0874
Δ5-Dessaturase	5,68	±0,505	8,23	±0,186	5,28	±0,891
Δ6-Dessaturase	0,06	±0,0029	0,08	±0,0016	0,48	±0,0022
Δ9-Dessaturase-C16	0,31	±0,078	0,08	±0,00838	0,11	±0,0188
Δ9-Dessaturase-C18	3,73	±0,03	0,84	±0,02	0,49	±0,05

Média ± desvio padrão N=3.

(\*). Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05).

SFA – ácidos graxos saturados; MUFA – ácidos graxos monoinsaturados; PUFA – ácidos graxos polinsaturado.

U/S – insaturado/saturado; UI – índice de insaturação (a média do número de dupla ligação por ácido graxo x 100).

(-) – não detectado.

Tabela 13: Distribuição das concentrações percentual de ácidos graxos polares individuais, como também o índice de insaturação e atividade estimada das enzimas desaturases e alongase do fígado (FIG) nos grupos Hcol - dieta com caseína hipercolesterolemiantes; PSQHcol - dieta com heterocoagulado (quitosana/proteínas do soro) hipercolesterolemiantes e Ncal - dieta normocalórica (Nuvilab CR-1) comercial.

FIG	Hcol		PSQHcol		Ncal	
C14:0	0,17	±0,01	0,28	±0,05	0,13	±0,02
C15:0	0,44	±0,05	0,11	±0,03	0,07	±0,01
Plasm16:0	0,22	±0,05	1,33	±1,02	0,23	±0,01
C16:0	13,25	±0,74	11,03	±1,75	13,08	±0,12
C16:1	0,56	±0,06	0,93	±0,19	-	-
C17:0	0,40	±0,01	0,30	±0,04	0,28	±0,03
plasm18:0	0,28	±0,01	0,19	±0,06	0,21	±0,01
C18:0	16,66	±0,82	15,68	±3,24	15,86	±0,83
C18:1	10,65*	±0,40	20,72**	±3,86	10,10*	±1,06
C18:2n6	14,95*	±0,55	15,22*	±1,14	20,12**	±1,33
C18:3n6	0,69	±0,04	0,83	±0,28	0,35	±0,05
C18:4n6	0,20	±0,03	0,20	±0,06	0,19	±0,07
C18:3n3	0,06	±0,01	0,30	±0,10	0,33	±0,04
C18:4n3	0,81	±0,05	0,82	±0,34	0,28	±0,04
C20:0	0,22	±0,01	0,56	±0,19	0,32	±0,04
C20:1	0,05	±0,01	0,11	±0,01	0,07	±0,01
C20:2n6	1,21	±0,55	1,67	±0,27	0,86	±0,19
C20:4n6	18,48	±0,48	14,44	±3,10	18,60	±0,33
C20:3n3	0,05	±0,00	0,06	±0,01	0,07	±0,01
C20:4n3	1,25	±0,59	1,16	±0,37	0,60	±0,04
C20:5n3	0,42	±0,13	0,63	±0,39	0,30	±0,03
C22:0	0,03	±0,01	0,08	±0,03	0,03	±0,01
C22:2n6	0,81	±0,47	0,35	±0,15	0,26	±0,10
C23:0	0,45	±0,05	0,89	±0,16	0,46	±0,01
C22:4n6	0,32	±0,04	0,82	±0,16	0,48	±0,04
C22:4n3	1,02	±0,26	1,43	±0,06	0,89	±0,08
C22:5n3	0,13	±0,03	0,17	±0,02	0,24	±0,03
C22:6n3	16,05	±1,96	9,06	±0,99	14,70	±0,52
C24:0	0,11	±0,02	0,19	±0,03	0,19	±0,00
Total	100		100		100	
SFA	31,72	±1,75	29,13	±3,89	30,42	±0,98
MUFA	11,24*	±0,48	21,87**	±4,08	10,82*	±1,18
PUFA	56,44	±1,43	47,07	±1,48	58,27	±0,26
PUFAn6	36,66*	±1,11	33,46*	±2,07	40,86**	±0,61
PUFAn3	19,79	±1,04	13,61	±1,18	17,41	±0,68
U/S	2,15	±0,207	2,50	±0,235	2,28	±0,747
UI	234,94	±35,07	205,04	±13,85	230,60	±25,00
Alongase	1,25	±0,0038	1,34	±0,144	1,21	±0,054
Δ5-Dessaturase	21,76	±4,505	23,41	±3,086	23,38	±6,658
Δ6-Dessaturase	0,05	±0,0019	0,05	±0,0013	0,02	±0,0083
Δ9-Dessaturase-16	0,04	±0,01	0,08	±0,00642	0,05	±0,0154
Δ9-Dessaturase-18	0,64	±0,06	1,58	±0,02	0,64	±0,05

Média ± desvio padrão N=3.

(\*) Símbolos diferentes correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05).

SFA – ácidos graxos saturados; MUFA – ácidos graxos monoinsaturados; PUFA – ácidos graxos polinsaturado.

U/S – insaturado/saturado; UI – índice de insaturação (a média do número de dupla ligação por ácido graxo x 100).

(-) – não detectado.

Três ácidos graxos insaturados de cadeia longa foram característicos de fosfolipídios (C18:1; C18:2n6; C20:4n6 e C22:6n3) nos tecidos GAST e FIG. Essas frações no GAST, somaram nos grupos Hcol, PSQHcol e Ncal um total de 67,72; 51,2 e 36,76 do total de ácidos graxos respectivamente. Essas frações no FIG alcançaram uma concentração de 59,7; 60,72 e 63,1%. Por outro lado, as composições dos fosfolipídios no tecido adiposo epididimal, apresentaram como principais ácidos graxos, C18:1; C18:2n6 e C20:4n6, perfazendo um total de 65,44; 67,5 e 67,83% nos grupos Hcol, PSQHcol e Ncal do total de ácidos graxos, respectivamente.

Nas frações de triglicérides, foi detectado dois principais ácidos graxos insaturados de cadeia longa (C18:1 e C18:2n6), os quais foram mais expressivos em EPI totalizando 75,9; 79,55 e 76,45% do total em Hcol, PSQHcol e Ncal, respectivamente. No GAST, foram detectados em Hcol (76,23%) em PSQHcol (77,49%) e em Ncal (68,82%). No FIG, também foram encontrados maiores valores desses ácidos graxos em todos os grupos, dos quais totalizaram, em Hcol (67,07%), PQHcol (68,99%) e Ncal (63,62%) do total de ácidos graxos presente como reserva metabólica.

Um ponto que merece atenção é o fato de haver uma concentração relativamente alta do ácido graxo C18:1n9, na fração triglicérides, em todos os tecidos de PSQHcol, o que torna a sua medição necessária para uma boa avaliação do seu perfil de ácidos graxos (NIKOLAIDIS *et al.*, 2005).

A alta proporção de MUFA em triglicérides comparado aos fosfolipídios é consistentemente encontrada em todos os tecidos, como também esta concentração é conservada em várias espécies animais, como colibri, cascavel (INFANTE *et al.*, 2001), cachorros (van der VUSSE and ROEMEN, 1995), porcos (ANDRÉS *et al.*, 2001) e humanos (ANDERSON *et al.*, 1998).

## 10. Conclusões e sugestões

Em conclusão, o presente estudo sugere que o heterocoagulado, de quitosana e proteínas do soro de leite pode ser um ótimo componente nutricional podendo agir como um eficiente agente hipocolesterolêmico e/ou como um minimizante de outras complicações relacionadas a obesidade. Entretanto, mais estudos serão necessários para se avaliar as propriedades do heterocoagulado.

O reaproveitamento de resíduos agroindustriais é fundamental nos dias de hoje e a preocupação com tais técnicas se faz necessário em todos os seguimentos das indústrias alimentícias. Muitos são os resíduos de baixo valor nutricional que são descartados no ambiente e conseqüentemente provocam um aumento nas cargas orgânicas, provocando, desta forma, um desequilíbrio ambiental gravíssimo. Como exemplo, podemos citar as cascas de frutas, cascas de crustáceos, resíduos de frigorífico e até mesmo proteínas dissolvidas em água remanescente de processos industriais, etc. Estes, se direcionados a um tratamento biotecnológico, podem ser transformados e enriquecidos, adicionando valores nutricionais e/ou nutracêuticos, podem ser direcionados à sociedade como produto com valores econômicos baixo.

Esse trabalho é o primeiro a explorar as propriedades bioativas de ambos (quitosana/soro) como um único complexo, onde se aplica o produto formado pela técnica de recuperação das frações protéicas do soro do leite. Esta foi direcionada às dietas para camundongos obesos/hipercolesterolêmicos, como também foi o primeiro a investigar a influencia do complexo em modificar positivamente o perfil das triglicérides e fosfolípides desses animais. Entretanto,

Estando com o pensamento direcionado à obesidade, que antes de tudo se enquadra como uma doença muito complexa, que tem como causa um componente genético poligênico e outro ambiental. O presente estudo sugere que dietas contendo o heterocoagulado pode ser uma ótima fonte nutricional, no qual poderia agir com um profilático contra hipercolesterolemia e outras complicações relacionadas como, por exemplo, a redução das frações LDL que está relacionada à resistência a diabetes do tipo 2.

Um das perspectivas serão formular um alimento com propriedades funcionais com o intuito de investigar mais detalhadamente os mecanismos que este exerce sobre o

metabolismo lipídicos de camundongos e futuramente adaptar esta dieta à pessoas consideradas obesas hipercolesterolêmica.

## 11. Referências

AGUILA, M. B; Loureiro, C. C; Pinheiro, A. R; Mandarim-de-Lacerda, C. A. Metabolismo lipídico de ratos alimentados com diferentes tipos de lipídios. **Arq. Bras. Cardiol**, São Paulo, Brasil, v. 78, p. 25-31, 2002.

**AOAC - Association Of Official Analytical Chemists**. Official methods of analysis, 12th ed. Washington association of analytical chemists. 1975.

ANDRÉS, A. I; Cava R; Mayoral, A. I; Tejada, J. F; Morcuende, D; Ruiz J. Oxidative stability and fatty acid composition of pig muscles as affected by rearing system, crossbreeding and metabolic type of muscle fibre. **Meat Sci**, Espanha, v. 59, n. 1. p. 39-47, 2001.

ANDERSSON, A; Sjödin A; Olsson, R; Vessby, B. Effects of physical exercise on phospholipid fatty acid composition in skeletal muscle. **Am J Physiol**, Scandinavia, v. 274, n. 3, p. E432-E438, 1998

ANDREWS, A.T; Alichanidis, E. Proteolysis of caseins and the proteose peptone fraction of bovine milk. **J Dairy Res**, Bruxelas, v. 50 n. 3, p. 275-290, 1983.

ANTHONY, J. C; Anthony, T. G; Kimball, S. R; Jefferson, L. S. Signaling pathways involved in translation control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **J Nutr**, Pensilvânia, v. 131, p. 856s-860s. 2001.

ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Ministério da Fazenda. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm> Acesso em: 01 maio 2009, 15:48.

ASKEW, E. W; Barakat, H; Kuhl, G. L; Dohm, G. L. Response of lipogenesis and fatty acid synthetase to physical training and exhausting exercise in rats. **Lipids**. Berlin, v. 10, n. 8, p. 491-496. 1975.

BANKS, J. M. Cheese. In: EARLY, R. **The Technology of Dairy Products**, 2<sup>a</sup> ed, Londres, p. 446, 1998.

BEUCHER, S; Levenez, F; Yvon, M; Corring, T. Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rat. **J. Nutr Biochem**, Nova Iorque, v.5, n.12, 578–584. 1994.

BOIRIE, Y; Dangin, M; Gachon, P; Vasson, M. P; Maubois, J. L; Beaufrere, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. França, v. 94, n. 26, p.14930–14935. 1997.

BOUNOUS, G; Gold, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clin. Invest. Med.** Quebec, v.14, n. 4, p. 296-309. 1991.

BOUTHEGOURD, J. C. J; Roseau, S. M; Makarios-Lahhan, L; Leruyet, P. M; Tomé, D. G; Even, P. C. A preeexercise alpha-lactalbumin-enriched whey protein meal preserves lipid oxidation and decreases adiposity in rats. **Am J. Physiol. Endocrinol. Metab**, França, v. 283, n. 3, p.E565-E572. 2002.

BOUGH, W. A; Landes, D. R. Recovery and nutritional evaluation of proteinaceous solids separated from whey by coagulation with chitosan. **J. Dairy. Sci**, Georgia, v. 59, n. 11, p.1874–1880. 1976.

BORKMAN, M; Storlien, L. H; Pan, D. A; Jenkins, A. B; Chisolm, D. J; Campbell, L. V. The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. **N. Engl. J. Med**, Sydney, v. 328, n. 4, p. 238–244, 1993.

BOKURA, H; Kobayashi, S. Chitosan decreases total cholesterol in women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Eur. J. Clin. Nutr**, Japão, v. 57, n. 5, 721-725. 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein Dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248-251, 1976.

BURKE, D. G; Chilibeck, P. D; Davison, K. S; Candow, D. G; Farthing, J; Smith-Palmer, T. The effect of whey protein supplementation with and without creatine monohydrate combined with resistance training on lean tissue mass and muscle strength. **Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab**, Canadá, v. 11, n. 3, p. 349-64. 2001.

CAPITANI, C. D; Pacheco, M. T. B; Gumerato, H. F; Vitali, A; Schmidt, F. L. Milk whey protein recuperation by coacervation with polysaccharide. **Pesq. Agropec. bras**, Campinas, v.40, n. 11, p. 1123-1128. 2004.

CHEFTEL, J. C; Lorient, D. Les propriétés fonctionelles des protéines laitières et leur amélioration. **Diary Sci. Tech**, França, v. 62, p. 435-483. 1982.

CLANDININ, M. T; Cheema, S; Field, C. J; Baracos, V. E. Dietary lipids influence insulin action. **Ann. NY Acad. Sci**, Canadá, v. 683, p.151–163. 1993.

CASAL, E; Montilla, A; Moreno, F. J; Olano, A; Corzo, N. Use of chitosan for selective removal of b-lactoglobulin from whey. **J. Dairy Sci**, Espanha, v. 89, p. 1384–1389. 2006.

CHEN, H. W; Lii, C. K; Ou, C. C; Wang, M. L. Dietary fat and vitamin E have differential effects on serum lipid levels. **Nutrition Res**. New York, v. 15, n. 19, p. 1367-1376. 1995.

CRAVEIRO, A. A; Craveiro, A. C; Queiroz, D. C. **Quitosana, a Fibra do Futuro**. In: PADETEC. 2<sup>a</sup>ed, Fortaleza, p. 218. 2004.

COPEMAN, L. A; Parrish, C. C; Brown, J. A; Harel, M. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 210, n. 1-4, p. 285-304. 2002.

DANGIN, M; Boirie, Y; Garcia-Rodenas, C; Gachon, P; Fauquant, J; Callier, P. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**. França, v. 280, n. 2, p. E340-E348. 2001.

DANTAS, J. A; Baroni, S; Cuman, R. K. N; Célia, R. A. S; Amado, C. A. B. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. **Acta sci. Health Sci**, Maringa, v. 28, p. 165-170, 2007.

DE VRIES, R. Monte Carlo simulations of flexible polyanions complexing with whey proteins at their isoelectric point. **J. Phys, Chem**, Nova Iorque, v. 120, n. 7, p. 3475–3481. 2004.

DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics if whey proteins in foods products. **J Dairy Sci**. Illinois, v. 81, n. 3, p. 597-608. 1998.

DEUCHI, K; Kanauchi, O; Shizukuishi, M; Kobayashi, E. Continuous and massive intake of chitosan affects mineral and fat-soluble vitamin status in rats fed on a high-fat diet. **Biosci Biotechnol. Biochem**, Japão, v. 59, n. 7, p. 1211-1216. 1995.

DEUCHI, K; Kanauchi, O; Imasato, Y; Kobayashi, E. Effect of the viscosity or deacetylation degree of chitosan on fecal fat excreted from rats fed on a high-fat diet. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, Japão, v. 59, n. 5, p. 781-785. 1995.

**Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation. Bethesda; 1990.

FONTAINE, K. R; Faith, M. S; Allison, D. B; Cheskin, L. J. Body weight and health care among woman in the general population. **Arch. Farm. Med**, New York, n. 7, v. 4, p. 381-384. 1998.

GRIFFITHS, M. A; Fiebig, R; Gore, M. T; Baker, D. H; Esser, K; Oscai, L. Exercices dwn-regulates hepatic lipogenic enzymes in food-deprived and refed rats. **J. Nutri**, Chicago, v. 126, p. 1959-1971. 1996.

GLICKSMAN, M. **Food Hydrocolloids**. In: GLICKSMAN, M. Boca Raton: RC Press, v. 1, p. 219. 1982.

GLICKSMAN, M. **Food Hydrocolloids**. In: GLICKSMAN, M. Boca Raton: RC Press, v. 2, p. 199. 1983.

GROSCH, W. Belitz, H.D. **Edible fats and oils**. In: *FOOD CHEMISTRY*. 4<sup>th</sup> revised. And extended edition. Springer-Verlag, Berlin, pp. 472–493. 1987.

GUZEY, D; D. McClements, J. Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocoll**, Amherst, v. 20, p. 124–131. 2006.

HA, E; Zemel, M. B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. **J Nutr Biochem**. New York, v. 14, n. 5, p.251-258. 2003.



HALL, W. L; Millward, D. J; Long, S. J; Morgan, L. M. Casein and whey exert different effects on plasma amino acids profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. **Brit J Nutr**, v. 89, n. 2, p. 239-48. 2003.

HARAGUCHI, F. K; Abreu, W. C; Paula, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. Revisão. **Rev. Nutr**, v. 19, n. 4, p. 479-488. 2006.

HEINE, W. E; Klein, P.D. Reeds, P. J. The importance of alpha-lactoglobulin in infant nutrition. **J. Nutr**, v. 121, n. 3, p. 277–283. 1991.

HIDALGO, J; HANSEN, M. T. Selective precipitation of whey proteins with carboxymethylcellulose. **J. of Dairy Sci**, v. 54, n. 9, p.1270-1274. 1971.

HO, S. C; Tai, E. S; Eng, P. H; Tan, C. E; Fok, A. C. In the absence of dietary surveillance, chitosan does not reduce plasma lipids or obesity in hypercholesterolemic obese Asian subjects. **Singapore Med. J**, v. 42, n. 1, p. 6-10. 2001.

HOOGENDOORN, H; Piessens, J. P; Scholtes, W; Stoddard, L. A. Hypothiocyanite ion: the inhibitor formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate hydrogen peroxide. **Caries Res**, v. 11, n. 2, p. 77–84. 1977.

HOSSEINI, M; Shojaosadati, S. A; Towfighi, J. Application of a bubble-column reactor for the production of a single-cell protein from cheese whey. **Ind. Eng. Chem. Res**, v. 42, n. 4, p. 764-766. 2003.

HOWARTH, G. S; Francis, G. L; Cool, J.C; Xu, X; Byard, R. W; Read, L. C. Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats. **J. Nutr**, v. 126, n. 10, p. 2519–2530. 1996.

HULBERT, A; J; Else, P. L. Membranes as possible pacemakers of metabolism. **J Theor Biol**, v. 199, n. 3, p. 257–274, 1999.

KAWASE, M; Hashimota, H; Hosoda, M; Morita, H; Hosono A. Effects of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. **J Dairy Sci**, v. 83 n. 2, p. 255-63. 2000.

KENNEDY, R. S; Konok, G. P; Bounous, G; Baruchel, S; Lee, T. D. The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-II clinical study. **Anticancer Res**. v. 15, n. 6B, p, 2643- 2649. 1995.

KIMBALL, S. C. Regulation of global and specific mRNA translation by amino acids. **J Nutr**, v. 132, n. 5, p. 883-6. 2002.

KINSELLA, J. E; Whitehead, D. M. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. **Adv Foods Nutr Res**. v. 33, p. 343-438. 1989.

KITSON, F. G; Larsen, B. S; McEwen, C. N. **Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide**. In: BRACE & COMPANY, San Diego, California, 1996.

KIRK, R. S; Sawyer, R. **Pearson's composition and analysis of foods**. 9th Ed, In: Longman Scientific & Technical, UK, 1991.

KUWATA, H; Yip, T. T; Yamauchi, K; Teraguchi, S; Hayasawa, H; Tomita, M; Hutchens, T.W. The survival of ingested lactoferrin in the gastrointestinal tract of adult mice. **Biochem J**. v. 334, p. 321-323. 1998.

IKEDA, S; Miyazaki, H; Nakatani, T; Kai, Y; Kamei, Y; Kai, Y; Miura, S. Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. **Biochem biophys Res Commun**. v. 296, p. 395- 400. 2002

INFANTE, J. P; Kirwan, R. C; Brenna, T. High levels of docosahexaenoic acid (22:6n-3)-containing phospholipids in high-frequency contraction muscles of hummingbirds and rattlesnakes. **Comp Biochem Physiol**. v. B 130, p. 291- 298, 2001.

JANSEN, H. B; Breedveld, Schoonderwoerd, K. Role of lipoprotein lipases in postprandial lipid metabolism, **Atherosclerosis**. v. 141, (Suppl. 1), p. S31-S34. 1998.

JELLEN, P. **Whey cheeses and beverages. Whey and Lactose Processing**, Zadow eds. In: Elsevier Applied Science, 1992.

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

LAYMAN, D. K. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. **J Nutr**. v. 133, n. 1, p. 261-267. 2003.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **Am J Clin Nutr**. v. 77, n. 6, p. 1537-1543. 2003.

LOWRY, O. H; Rosebrough, N. J; Farr, A. L; Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193: 265 - 275, 1951.

MANCHADO, F. B; Gobatto, C. A. Máxima fase estável de lactato e ergômetro- dependente em modelo experimental utilizando ratos. **Rev. Brás. Méd. Esporte**, v. 12, n. 5, p. 259- 262. 2006.

MARANGON, L; Gobatto, C. A; Mello, M. A. R; Kokubun, E. Utilization of an hyperbolic model for the determination of the critical load in swimming rats. **Med Sci. Sports Exerc.** (Suppl.), v. 34, p. 149. 2002.

MARKUS, C; Oliver, B, D. E; Haan, E. H. F. Whey Protein rich in alfa-lactoalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. **Am J Clin Nutr.** v. 75, n. 6, p. 1051-6. 2002.

MAEZAKI, Y; Tsuji, K; Nakagawa, Y; Kawai, Y; Akimoto, M; Tsugita, T; Takekawa, W; Terada, A; Hara, H; Mitsuoka, T. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. **Biosci Biotech Biochem.** v. 57, p. 1439-1444. 1993.

MONZÓN, C; Olano, A. Produccion de bebidas alcoholicas a partir del suero de queserias. **Alimentaria**, v. p. 83: 41, 1977.

MONTILLA, A; Casal, E; Moreno, F. J; Olano, A; Corzo, N. Isolation of bovine b-lactoglobulin from complexes with chitosan. **Dairy J.** v. 17, n. 5, p. 459-464. 2007.

MORIFUJI. M; Aoyama, Y; Dietary orotic acid affects antioxidant enzyme mRNA levels and oxidative damage to lipids and proteins in rat liver, **J Nutr Biochem**, v. 13, pp. 403–410. 2002.

MUKHOPADHYAY, R; D. Talukdar, B. P; Chatterjee, B. P; Guha. A, K. Whey processing with chitosan an isolation of lactose. **Process Biochem.** v. 39, p. 381–385. 2003.

NAGAOKA, S; Futamura, Y; Miwa, K; Awano, T; Yamauchi, K, Kanamaru, Y. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk  $\beta$ -lactoglobulin, **Biochem Biophys Res Commun**, v. 281, p. 11–17. 2001.

NAGAOKA, S; Kanamaru, Y; Kuzuya, Y; Kojima, T; Kuwata, T. Comparative studies on the serum cholesterol lowering action of whey protein and soybean protein in rats. **Biosci. Biotechnol Biochem.** v. 56, p.1484-1485. 1992.

NEVES, B.S. **Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios.** In: Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Embrapa, p. 97-108. 2001.

NIKOLAIDIS, M. G; Petridou, A; Mougios, V. Comparison of the phospholipid and triacylglycerol fatty acid profile of rat serum, skeletal muscle and heart. **Physiol Res.** v. 55, n. 3, p. 259-265 2006.

NIELSEN, L. B; Leth-Espensen, P; Nordestgaard, B. G; Foged, E; Kjeldsen, K; Stender, S. Replacement of dietary saturated fat with monounsaturated fat: effect on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits clamped at the same plasma cholesterol level. **Br J Nutr,** v. 74, n. 4, p. 509-21 1995.

NUNTHANID, J; Laungtana-anan, M; Sriamornsak, P. Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets. **J Control Release.** v. 99, p. 15-26. 2004.

ORMROD, D. J; Holmes, C. C; Miller, T. E. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolaemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis. **Atherosclerosis,** v. 138, n. 2, p. 329-334 1998.

O'MELIA, C. R; **Coagulation and flocculation. Pages 61–110.** In Physicochemical Processes for Water Quality Control. W. J. Weber Jr., ed. Wiley-Interscience, New York, NY. 1972.

PACHECO, M. T. B; Amaya-Farfan, J; Sgarbieri, V. C. **Obtenção de hidrolisados de concentrados protéicos de soro de leite por diferentes enzimas.** In: PILOSOFF, A.M.R; AÑON, M.C. (EGS.). Proteínas y Polisacaridos como Ingredientes Funcionales. 1a. ed. La Plata, , v. 1, p. 121-127. 2002.

PAN, D. A; Hulbert, A. J; Storlien, L. H. Dietary fats, membrane phospholipids and obesity. **J Nutr,** v. 124, p. 1555–1565, 1994.

PELLET, P. L; Young, V. R. **Evaluation of Protein quality in experimental animals.** In: Nutritional evaluation of protein foods. Tokio: The united nations University. 41-57. 1980

REEVES, P. G. P. G; Nielsen, F. H; Fahey, G. N. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the formulation of the AIN-76. **Rodent diet. Nutrition.** v. 23, n. 11, 467-472. 1993.

RODRIGUES, L. R. **Valorização da fração protéica do soro de queijo**. Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, Portugal. Registro: 2001.

ROGERS, M.L.; Belford, D. A; Francis, G. L; Ballard, F. J. Identification of fibroblast growth factors in bovine cheese whey. **J Dairy Res.** v. 62, p. 501-507. 1995.

SAMANT, S. K; Singhal, P. R; Kulkarni, P. R; Rege, D. V. Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulations. **Int J Food SciTechnol**, v. 28, n. 6, p. 547-562, 1993.

SHANNON, L. K, Chatterton. D; Nielsen, K; Lönnerdal, B. Glycomacropeptide and alfa-lactoalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. **Am J Clin Nutr.** v. 77, n. 5, p. 1261-1268. 2003.

SOHAL, P. S; Baracos, V. E, Clandinin, M. T. Dietary omega 3 fatty acid alters prostaglandin synthesis, glucose transport and protein turnover in skeletal muscle of healthy and diabetic rats. **Biochem J.** v. 286, p. 405-411, 1992.

SALZANO, Jr. I. Nutritional supplements: practical applications in sports, human performance and life extension. **Symposium series 007**; São Paulo. p.75-202. 1996-2002.

SERPA, L. **Concentração de proteínas de soro de queijo por evaporação a vácuo e ultrafiltração**. Dissertação de mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-URI, Erechim, RS. p. 95. 2005.

SGARBIERI, V.C., V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. In: Sgarbieri (Ed.). São Paulo: Livraria Varela. 517 p. 1996.

SPECTOR, A. A; Yorek, M. A. Membrane lipid composition and cellular function. **J Lipid Res.** v. 26, p. 1015-1035, 1985.

STORLIEN, L. H, Hulbert, A. J, Else, P. L. Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** v. 1, p. 559-563, 1998.

SUGANO, M; Fujikawa, T; Hiratsuji, Y; Nakashima, K; Fukuda, N; Hasegawa, Y. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. **Am J Clin Nutri.** v. 33, p. 787-793. 1980.

SUZUKI, H; Hayakawa, S; Tamura, S; Wada, S; Wada, O. Effect of age on the modification of rat plasma lipids by fish and soybean oil diets. **Biochim. Biophys. Acta** 836, p. 390-393 1985.

VAN LOON, L. J. C; Saris, W. H. M; Verhagen, H; Wagenmakers, J. M. Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. **Am J Clin Nutr.** v. 72, n. 1, p. 96-105 2000.

VAN DER VUSSE, G. J; Roemen, T. H. M. Gradient of fatty acids from blood plasma to skeletal muscle in dogs. **J Appl Physiol**, v. 78, p. 1839-1843 1995.

TAKEUCHI, H; Matsuo, T; Tokuyama, K; Suzuki, M. Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than rats fed a high oleic safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. **J Nutr**; v. 125, p. 920–925 1995.

THARANATHAN, R. N; Kittur, F. S. Chitin-the undisputed biomolecule of great potential. Critical Reviews. **Food Sci and Nutri**, v. 43, n. 1, p. 61-87 2003.

TOMITA, S; Shirasaki, N; Hayashizaki, H; Matsuyama, J; Benno, Y; Kiyosawa, I. Binding characteristics of bovine lactoferrin to the cell surface of Clostridium species and identification of the lactoferrin-binding protein. **Biosci. Biotech. Biochem.** v. 62, p. 1476–1482 1998.

VOET, Donald; Pratt, Charlotte W; Voet, Judith G. **Fundamentals of Biochemistry**, Take Note!, 2nd Edition. 400 pp. 2004.

WALZEN, R. L. Propriedades Benéficas À Saúde das Proteínas de Soro E Frações de Soro. Produtos e Bebidas Nutricionais. p 1-8 1999.

WONG, C.W; Watson, D.L. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. **J. Dairy Res.** v. 62, p. 359–368 1995.

WOLFE, R. R. Protein supplements and exercise. **Am J Clin Nutr.** v. 72, n. 2, p. 551s-557s. 2002.

YHOO, Y. C; Watanabe, S; Watanabe, R; Hata, K; Shimazaki, K. I; Azuma, I. Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice. **J. Cancer Res.** v. 88, p. 184–190 1997.

YOO, Y. C; Watanabe, R; Koike, Y; Mitobe, M; Shimazaki, K. I; Watanabe, S; Azuma, I. Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: Involvement of reactive oxygen species. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 237, p, 624–628 1997.

YUN, S. S; Sugita-Konishi, Y; Kumagai, S; Yamauchi, K. Glycomacropeptide from cheese whey protein concentrate enhances IgA production by lipopolysaccharide- stimulated murine spleen cells. **Ann. Sci. Tech.** v. 67, p. 458–462 1996.

ZEMEL, M. A. Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. **Am J Clin Nutr.** v. 79, n. 5, p. 907s-12s 2004.

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

**COMITÊ DE ÉTICA EM MANIPULAÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
CEMEA/UMC**

Ao Acadêmico

**GABRIEL INÁCIO DE MORAIS HONORATO DA SILVA**

Consideramos o projeto intitulado “AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES BIOATIVOS E MECANISMOS DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO ENCAPSULADO EM MATRIZ DE QUITOSANAS SOBRE A HIPERTROFIA MUSCULAR E REDUÇÃO DA GORDURA CORPORAL” (prot. 030/07), de autoria do acadêmico GABRIEL INÁCIO DE MORAIS HONORATO DA SILVA, sob orientação da Prof. Dra. ELISA ESPÓSITO, **APROVADO**.

Mogi das Cruzes, 02 de dezembro de 2007





# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)