



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**Obtenção de concentrado proteico do soro do leite
adoçado com rebaudiosídeo A e avaliação de suas
propriedades funcionais**

PAULA GIMENEZ MILANI

Maringá

2014

PAULA GIMENEZ MILANI

**Obtenção de concentrado proteico do soro do leite adoçado
com rebaudiosídeo A e avaliação de suas propriedades
funcionais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Silvio Cláudio da Costa

Co-orientadora: Cecília E. Mareze da Costa

Maringá

2014

ORIENTADOR

Silvio Cláudio da Costa

CO-ORIENTADORA

Cecília E. Mareze da Costa

BIOGRAFIA

Paula Gimenez Milani nasceu em 30 de julho de 1988 na cidade Martinópolis, no estado de São Paulo, Brasil. Concluiu o Ensino Médio, no ano 2005, na cidade de Tupã, estado de São Paulo, no Colégio Seletivo. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá, concluída em 2011. Tem experiência, participando de projetos de iniciação científica, nas áreas de bioquímica e fisiologia de microrganismos, bioquímica e fisiologia vegetal, biologia celular, fisiologia animal e humana e bioquímica de alimentos, com ênfase no desenvolvimento de suplementos proteicos com propriedades nutricionais e funcionais para grupos específicos, como diabéticos.

DEDICO

Aos meus queridos pais, Paulo e Lúcia, ao meu marido Willian, aos meus irmãos Fernanda e Matheus, que compartilho os meus momentos de alegria e de dificuldade.

Obrigado pelo carinho, confiança, paciência, compreensão e apoio nesta fase.

A vocês meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus, pela vida, e enorme força para nunca desistir dos meus sonhos. A Universidade Estadual de Maringá, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela oportunidade.

Agradeço aos meus pais, Paulo e Lúcia por todos os momentos em que me ouviram, me acalmaram e me orientaram. Obrigada pela paciência, por acreditarem e por se orgulharem de mim. Mãe, você foi muito compreensiva e amiga; soube ter “jogo de cintura” comigo todas as vezes que precisei de você. Nossas longas conversas e seus conselhos permitiram que esse estudo se realizasse. Pai, obrigada pelos conselhos, por me ouvir e principalmente pela paciência que você teve nos momentos em que me senti estressada e desmotivada. Obrigada pela ajuda em todos os dias que acordou cedo e foi me ajudar nos experimentos. Especialmente nos finais de semana. Sem você tudo teria sido muitíssimo complicado.

Agradeço ao meu marido, Willian, por toda compreensão, paciência e apoio. Obrigada por saber me ouvir e por entender minhas decisões. Agradeço por todos os dias em que me ajudou nos experimentos, mesmo sem entender o que estava fazendo e em quais resultados teríamos. Você foi fundamental.

Aos meus irmãos Matheus e Fernanda, pelo apoio, compreensão e por toda ajuda que puderam dar. Vocês deixaram tudo mais leve e divertido.

Ao professor e orientador Dr. Silvio Claudio da Costa, pela orientação, conhecimento, dedicação, amizade e paciência, em todos os momentos. Sempre com atenção e compreensão. Aprendi muito profissionalmente e pessoalmente com o senhor.

À co-orientadora Profa. Dra Cecília E. Mareze da Costa pelo conhecimento, apoio, dedicação e compreensão; sua disciplina e perfeccionismo foram essenciais para o trabalho e sua amizade acima de tudo foi muito importante. Agradeço também pelos desafios que você e o Silvio me propuseram. Eles me fizeram crescer como profissional e mostraram habilidades que nem eu mesma conhecia.

Ao técnico do laboratório do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NEPRON), Sérgio, por todos os momentos de auxílio e dedicação nos experimentos, pela paciência, pelo conhecimento e amizade prestados. Nossas conversas diárias, sobre os mais diversos assuntos me ajudaram muito profissionalmente e pessoalmente. Seu apoio foi essencial. Agradeço também as técnicas Márcia, Valéria e Elizete pelo apoio, dedicação e pelas conversas que sempre deixaram ótimo o ambiente de trabalho. Agradeço ainda ao auxiliar técnico Cícero pelo apoio nos experimentos sempre que houve necessidade.

Agradeço ao colega de trabalho e amigo Emerson por me auxiliar nos experimentos e pela sua amizade. Agradeço à aluna de iniciação científica Cássia pelo auxílio na execução dos experimentos que, mesmo com pouco tempo disponível, me ajudou nas horas em que mais precisei.

Agradeço minhas amigas e colegas de mestrado Lívia, Aline, Pedro e Cândia por todos os momentos que me ajudaram nas pesquisas e experimentos. Cândia obrigada por me ajudar até na área da fisiologia a qual você nunca havia tido qualquer contato. Você foi fundamental nos momentos de sucesso, nos momentos mais difíceis e naqueles em que achei que não iria conseguir seguir em frente; sua amizade foi um presente que eu agradeço a Deus todos os dias.

Dizem por aí que não há solidão maior que a do homem sem amizades e ainda, que ter muitos amigos é ter nenhum. Bom, tenho poucos amigos e, esses poucos, são os melhores; se cheguei até aqui, devo muito aos meus poucos e bons amigos. Aos amigos de longa data, aos familiares, pais, irmãos e marido, que são acima de tudo amigos, e aqueles novos que a vida me deu o presente de conhecer, conquistar e fazer parte de suas vidas. A amizade, o carinho e a paciência que dedicaram a mim foram essenciais. Acreditaram em mim, em todos os momentos difíceis, mesmo entendendo absolutamente nada dos meus experimentos, se orgulharam e acreditaram no meu potencial. Não citarei nomes, pois eles sempre saberão quem são pela minha eterna gratidão e amizade; muito obrigada mesmo.

Sinceros agradecimentos a todos aqueles que participaram direta ou indiretamente da realização deste estudo.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de artigo científico, que será submetido para a revista *Journal of Medicinal Food*, com extrato qualis B1, referente à avaliação trienal 2013, e com fator de impacto 1,642 para o mesmo ano.

MILANI, P.G., NALESSO, C.C.F.L., DACOME, A.S., MAREZE-COSTA, C.E, COSTA, S.C. **Obtenção de concentrado proteico do soro do leite adoçado com rebaudiosídeo A e avaliação de suas propriedades funcionais.** Revista *Journal of Medicinal Food*

Autores:

Paula Gimenez Milani^{1,2} (paulinhauem@gmail.com);

Cândyce Camile Nalesso Fortuna Leão^{1,2} (candyce.nalesso@hotmail.com);

Antonio Sergio Dacome^{1,3} (asdacome@uem.br);

Cecília Edina Mareze da Costa^{1,4} (cemcosta@uem.br);

Silvio Claudio da Costa^{1,2,3} (sccosta@uem.br).

Filiações:

Universidade Estadual de Maringá¹

Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos²

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica³

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Fisiológicas⁴

GENERAL ABSTRACT

WHEY PROTEIN CONCENTRATE SWEETENED WITH REBAUDIOSIDE A AND EVALUATION OF ITS FUNCTIONAL PROPERTIES

INTRODUCTION: *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni features, especially in its leaves, diterpene glycosides with high sweetening power, among which stands out rebaudioside A (RebA). This glycoside has a sweetening capacity up to 450 times greater than sucrose, which arouses commercial interest for application in dietetic products. Additionally, its antioxidant and insulinotropic properties can add functionality to foods and beverages. There is now a significant share of the world population looking for products with alternative sweeteners, especially diabetics and obese individuals. Diabetes mellitus (DM), an endocrine disorder that affects millions of people worldwide, causes a series of metabolic complications. The control or mitigation of these complications involves complex treatments, and sources of natural antioxidants and hypoglycemic agents have been considered important pharmacological adjuvants. Whey protein concentrates contain heterogeneous proteins with properties that together to those attributed to RebA, may represent an excellent dietary supplement for people suffering from DM. We have developed a protein supplement obtained from whey by membrane separation processes and sweetened with RebA. This supplement exhibited excellent functional and nutritional properties in diabetic animals.

OBJECTIVE: To develop a protein concentrate from whey using membrane separation processes. To determine the functional and nutritional properties of the protein concentrate in diabetic animals.

MATERIALS AND METHODS: whey, provided by MILK FLORA (Florida/ PR), was subjected to ultrafiltration with polyamide, diafiltration, nanofiltration and spray drying in order to produce whey protein powder concentrates (CPS I and CPS II). Rebaudioside A (RebA) was obtained by extraction, separation and purification of the leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, Alvarez M1 clonal variety, cultivated in the Center for Natural Products (NEPRON) of the State University of Maringá. CPS I and CPS II were subjected to physicochemical and microbiological analyzes. The effects of supplementation of CPS II sweetened with RebA (100 mg / kg bw) were evaluated in male diabetic Wistar rats (streptozotocin, 40 mg/kg bw) over a period of 35 days. The animals were divided into three experimental groups (n = 6 animals per group): 2 groups of diabetic animals, a control (DC) and other supplemented (DS), and one group of normal non-diabetic control animals (NC). Fasting glucose in fed state and body weight were measured weekly. At the end of the treatment the glicemic curve and glucose tolerance were determined. It was also measured water and food intake by using individual metabolic cages. The weight of the retroperitoneal and periepididimal, the gastrocnemius and soleus muscles and the various body organs were compared among the groups. Other biochemical parameters analyzed were plasma or serum glucose, triglycerides, total cholesterol, fructosamine and the enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), by means of automated analytical techniques and specific reagents. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean and subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test (significance $p < 0.05$ %).

RESULTS AND DISCUSSION: The first concentrate CPS I obtained from whey by means of ultrafiltration with a 10KD membrane, nanofiltration and reverse osmosis (180D), followed by spray drying presented 58% of protein and 24% of lactose. The CPS II developed from exhaustive nanofiltration of CPS I with a 500D membrane, followed by spray drying, showed 74.3 % of protein and 17.3 % of lactose. The CPS II sweetened with RebA (26 mg per 100g CPS II) had equivalent sweetness to commercially available products. Diabetic mice treated daily with CPS II sweetened with RebA showed improvement of body weight gain and reduction of hyperglycemia, plasma levels of fructosamine, triglycerides and total cholesterol.

CONCLUSIONS: CPS II sweetened with RebA presented important results regarding its functionality. Therefore, it can be used as supplement for individuals with diabetes. The RebA provided a great sweetness to the protein concentrate, which makes it a good candidate for replacing artificial sweeteners currently used in this type of supplement.

Key-words: Whey protein; membrane separation methods; rebaudioside A; *Diabetes mellitus*;

RESUMO GERAL

RESUMO GERAL - OBTENÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO ADOÇADO COM REBAUDIOSÍDEO A E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS

INTRODUÇÃO: *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni apresenta, principalmente em suas folhas, glicosídeos diterpênicos com alto poder edulcorante, dentre os quais se destaca o rebaudiosídeo A (RebA). Este glicosídeo pode apresentar capacidade edulcorante até 450 vezes maior que a sacarose, o que desperta interesse comercial, principalmente na aplicação em produtos dietéticos. Além disso, suas propriedades antioxidantes e insulinoatrópicas podem acrescentar funcionalidade a alimentos e bebidas. Existe hoje uma fatia expressiva da população mundial que procuram por produtos com adoçantes alternativos, em especial os indivíduos diabéticos e obesos. O *Diabetes mellitus* (DM) é um distúrbio endócrino que atinge milhões de pessoas em todo o mundo e acarreta uma série de complicações de ordem metabólica. O controle ou atenuação dessas complicações envolvem tratamentos complexos, sendo que fontes de agentes hipoglicemiantes e antioxidantes naturais têm sido considerados importantes adjuvantes. Os concentrados proteicos produzidos a partir do soro do leite possuem um grupo heterogêneo de proteínas que possuem propriedades que, somadas aquelas atribuídas ao RebA, podem representar um excelente suplemento alimentar para pessoas portadoras de DM. Neste trabalho foi desenvolvido um suplemento proteico obtido a partir do soro do leite, por processos de separação por membranas e adoçado com RebA que apresentou excelentes propriedades nutricionais e funcionais em animais diabéticos.

OBJETIVO: Desenvolver um concentrado proteico a partir do soro do leite, utilizando processos de separação por membranas e determinar as propriedades nutricionais e funcionais do concentrado obtido em animais diabéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS: O soro do leite, fornecido pelo laticínio FLORA MILK, da cidade de Flórida/PR, foi submetido a processos de ultrafiltração de poliamida, diafiltração, nanofiltração e secagem em *spray dryer* para a obtenção dos concentrados proteicos de soro de leite (CPS I e CPS II). O rebaudiosídeo A (RebA) foi obtido através da extração, separação e purificação das folhas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, da variedade clonal M1 Alvarez, cultivada no Núcleo de Produtos Naturais (NEPRON) da Universidade Estadual de Maringá. CPS I e CPS II foram submetidos a análises físico-químicas e microbiológicas. Os efeitos da suplementação de CPS II adoçado com RebA (100 mg/kg p.c) foram avaliados em ratos machos Wistar diabéticos (estreptozotocina, 40 mg/ kg p.c.). Foram estabelecidos três grupos experimentais (n = 6 animais por grupo): dois de animais diabéticos, sendo um controle (DC) e outro suplementado (DS), e um grupo de animais normais (não-diabéticos) controle (NC). A suplementação ocorreu por um período de 35 dias. Nos três grupos foram avaliados os parâmetros semanais de glicemia de jejum, glicemia no estado alimentado e do peso corporal. Ao final do tratamento foi determinada a curva glicêmica e a tolerância à glicose e, com o auxílio de gaiolas metabólicas individuais, foram obtidos dados da ingestão alimentar e hídrica. O peso das gorduras retroperitoneais e periepídídímicas, dos músculos gastrocnêmio e sóleo e de diversos órgãos foram comparados, além dos

valores plasmáticos ou séricos de glicose, triglicérides, colesterol total, frutossamina e das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), obtidos por meio de técnicas analíticas automatizadas e reagentes específicos. Os resultados, expressos como média \pm erro padrão da média, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey (significância quando $p < 0,05\%$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: O primeiro concentrado produzido CPS I, obtido a partir do soro do leite por meio dos processos de ultrafiltração em membrana de 10kD e concentração em sistema de nanofiltração em osmose reversa (180D), seguido de secagem em *spray dryer* apresentou teor de proteínas de 58% e lactose de 24%. O CPS II desenvolvido a partir de nanofiltração exaustiva de CPS I em membrana de 500D, seguida de secagem em *spray dryer*, apresentou 74,3% de proteínas e 17,3% de lactose. O CPS II adoçado com RebA, na proporção de 26mg para cada 100g de CPS II, apresentou dulçor equivalente aos produtos disponíveis comercialmente. Os efeitos da suplementação diária de CPS II adoçado com RebA em ratos diabéticos melhorou o ganho de peso corporal, reduziu a hiperglicemia, os níveis plasmáticos de frutossamina, triglicérides e colesterol total.

CONCLUSÕES: o CPS II adoçado com RebA apresentou importantes resultados em relação a sua funcionalidade e pode ser um importante suplemento para indivíduos portadores de diabetes. O RebA promoveu excelente dulçor ao concentrado, sendo uma opção para a substituição dos edulcorantes artificiais atualmente utilizados nesse tipo de suplemento.

Palavras-chaves: Concentrado protéico do soro do leite; métodos de separação por membranas; redaudiosideo A; *Dibetes mellitus*;

ABSTRACT

Whey protein powder concentrate with 58% of protein and 24% of lactose (CPS I) was obtained from whey by membrane separation processes. Whey was submitted to ultrafiltration with a 10k Dalton membrane, concentration in reverse osmosis nanofiltration (180Daltons), followed by spray drying. Exhaustive nanofiltration of CPS I with a 500 Dalton membrane, followed by spray drying generated CPS II with 74.3 % of protein and 17.3 % of lactose. The CPS II sweetened with rebaudioside A (26mg RebA/100g CPS II) had sweetness equivalent to commercially available products with sucralose. Effects of daily supplementation of CPS II sweetened with RebA (100 mg/kg bw; gavage) were evaluated in diabetic Wistar rats induced by streptozotocin (40 mg/kg bw, iv) for 35 days. The results showed that supplementation improved body weight gain, hyperglycemia and reduced plasma levels of fructosamine, triglycerides and total cholesterol in diabetic rats.

RESUMO

Concentrado protéico de soro de leite na forma de pó (CPS I), com teor de proteínas de 58% e lactose de 24%, foi obtido a partir do soro do leite por meio de processos de separação por membranas; ultrafiltração em membrana de 10kDaltons e concentração em sistema de nanofiltração em osmose reversa (180Daltons), seguido de secagem em *spray dryer*. Nanofiltração exaustiva de CPS I em membrana de 500Daltons, seguida de secagem em *spray dryer*, gerou CPS II, com 74,3% de proteínas e 17,3% de lactose. O CPS II foi adoçado com rebaudiosídeo A (26mg de RebA/100g de CPS II) e apresentou dulçor equivalente a produtos disponíveis comercialmente adoçados com sucralose. Efeitos da suplementação diária de CPS II adoçado com o RebA (100mg/ kg p.c; sonda esofágica) foram avaliados em ratos *Wistar* machos, diabéticos induzidos por estreptozotocina (40 mg/kg p.c, i.v), por um período de 35 dias. Os resultados mostraram que a suplementação melhorou o ganho de peso corporal, reduziu a hiperglicemia e os níveis plasmáticos de frutossamina, triglicérides e colesterol total de ratos diabéticos.

INTRODUÇÃO

Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni, planta da família Asteraceae, é nativa do Paraguai e é cultivada em muitos países, incluindo o Brasil, Argentina, Japão, Estados Unidos e países europeus.^(1,2) Tem importância na indústria de alimentos por apresentar, principalmente em suas folhas, glicosídeos diterpênicos com alto poder edulcorante, dentre os quais se destacam o esteveosídeo e o rebaudiosídeo A (RebA). Estes glicosídeos podem apresentar capacidade edulcorante até 450 vezes maior que a sacarose,^(3,4) o que desperta interesse comercial, principalmente na aplicação de alimentos e bebidas.

No Brasil, o Núcleo de Estudos em Produtos Naturais (NEPRON) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), apresenta uma coleção de plantas de estêvia com diferentes perfis na composição de glicosídeos de esteviol. Destacam-se as variedades clonais *Stevia* UEM-320 e a M1 Alvarez que possuem altos teores de RebA.

O RebA é mais estável, mais solúvel, apresenta menor residual amargo⁽⁵⁾ e, portanto melhor perfil sensorial que o esteviosídeo.⁽³⁾ Sua estrutura é formada por quatro unidades de β -D-glucopiranosose ligados à aglicona de esteviol.⁽⁶⁾

As características do RebA, e a procura por alimentos menos calóricos, impulsionaram o desenvolvimento de produtos alimentícios com este glicosídeo. Além disso, suas propriedades antioxidantes e insulínótropicas podem acrescentar funcionalidade a alimentos e bebidas.^(7, 8)

Existe hoje uma fatia expressiva da população mundial que não pode consumir sacarose e que procuram por produtos com adoçantes alternativos. Em especial estão os indivíduos diabéticos. O *Diabetes mellitus* (DM) é um distúrbio metabólico endócrino que atinge mais de 370 milhões de pessoas em todo o mundo.⁽⁹⁾ Os países que

apresentam maiores números de portadores são China, Índia, Estados Unidos e Brasil.⁽⁹⁾ A etiopatogenia do diabetes envolve distúrbios na secreção de insulina, os quais acarretam uma série de complicações de ordem metabólica no indivíduo portador.⁽¹⁰⁾ Essas podem ser crônicas (hiperglicemia, perda de peso e glicosúria), agudas (cetoacidose diabética, alterações macrovasculares doenças coronarianas, vasculares cerebrais e periféricas), microvasculares (falência renal e cegueira) e complicações neuropáticas).⁽¹⁰⁾

Para que haja controle e atenuação nessas complicações, os pacientes são submetidos a tratamentos relativamente complexos. São necessárias dietas especiais, com o consumo de produtos dietéticos com propriedades nutricionais e funcionais, monitoramento da glicemia, exercícios físicos e o uso de insulina e/ou hipoglicemiantes orais. Sendo assim, fontes de agentes hipoglicemiantes e antioxidantes naturais são importantes adjuvantes no tratamento.⁽¹⁰⁾

O soro do leite é definido como um subproduto da indústria de laticínios. Representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante o processamento de queijos, na produção de caseína e de outros produtos laticínios. É composto basicamente por água (94 a 95 %), lactose (3,8 a 4,2%), proteínas (0,8 a 1%) e minerais (0,7 a 0,8%).⁽¹¹⁾

O soro, se tratado como rejeito, provoca um enorme efeito poluidor quando descartado em cursos d'água.^(12, 13) O tratamento adequado desse subproduto apresenta custos elevados, por isso as indústrias procuram maneiras de reutilizá-lo e agregar valor ao mesmo. É possível reaproveitá-lo principalmente na produção de concentrados proteicos do soro (CPS) e isolados proteicos do soro (IPS).

Os CPS, produtos conhecidos como *Whey protein*, apresentam taxas de proteínas entre 35 e 80%.⁽¹¹⁾ São suplementos consumidos principalmente por atletas que

objetivam o ganho de massa muscular, por obesos, no tratamento da obesidade associada a exercícios físicos, por diabéticos e pré-diabéticos, no tratamento e na prevenção de distúrbios metabólicos e por indivíduos que objetivam aumentar o ganho de proteínas pelo organismo. A quantidade de carboidratos presente varia muito, sendo que a procura é, geralmente, pelo de menor teor, principalmente quando o público alvo é diabético ou obeso.

Os CPS são constituídos por um grupo heterogêneo de proteínas sendo que a β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina estão presentes em maior abundância. Proteose peptona, imunoglobulinas, albumina sérica bovina, lactoferrina e lactoperoxidase também estão presentes em menores concentrações. Tais proteínas contêm a grande maioria dos aminoácidos essenciais ao ser humano. Também está presente o glicomacropéptido, peptídeo que é fonte de uma cadeia ramificada de aminoácidos (BCAAs).⁽¹⁴⁾

Essas proteínas possuem atividades imunomoduladoras, antimicrobianas e antivirais, atividade anticâncer, antiúlcera, proteção do sistema cardiovascular, benefícios à atividade esportiva e têm potencial antioxidante.^(15, 14, 16, 17) Além disso, possuem propriedades que aumentam a digestibilidade e a funcionalidade de alimentos elevando a solubilidade e atuando como emulsificantes.⁽¹¹⁾

A suplementação com proteínas do soro do leite possui efeitos insulíntrópicos,^(14, 18) ganho da massa muscular, diminuição da gordura corporal,^(14, 19) efeitos adjuvantes na cicatrização, aumento da resposta imune, atuam na eliminação de patógenos e toxinas e ainda diminuem o estresse oxidativo.^(20, 21, 22) Porém ainda são necessários novos estudos que avaliem maiores propriedades dessas proteínas, seus mecanismos de ação e formas de adicioná-las à alimentação humana.

Os CPS podem ser obtidos por processos de separação física das micelas de caseína utilizando métodos de separação por membranas.⁽¹⁶⁾ Esses processos incluem membranas porosas, com diferentes pesos moleculares e dimensões, que resultam em diferentes tipos de CPS. O crescente número de estudos comprovando as excelentes propriedades de suas proteínas impulsiona pesquisas por novas tecnologias que apresentem métodos mais eficazes de obtenção.

Os processos que utilizam membranas têm a seletividade definida pela relação de tamanho entre as espécies presentes e os poros da membrana e, são regidos pelo gradiente de pressão através dela. A concentração de proteínas a partir do soro do leite por ultrafiltração (UF) pode ser intensificada e produzir resultados melhores quando é seguida de diafiltração (DF) para a obtenção do produto final.⁽¹¹⁾

A obtenção do CPS por técnicas de separação por membranas tem-se mostrado atrativa, pois se realiza com um menor consumo de energia, pode ser feita sem a adição de insumos químicos, não é agressiva sob o ponto de vista ambiental e pode ser operada utilizando temperaturas e pressão mais amenas.^(13,23)

Devido a variações dessas técnicas pesquisas visam evitar problemas de processo como o entupimento dos poros das membranas, a formação de espumas, a ocorrência do chamado *fouling* (acúmulo de partículas indesejáveis que pode danificar a superfície da membrana), problemas de seletividade e com o fator ideal de concentração.

Nesse contexto, alimentos com propriedades funcionais, além das nutricionais, que possam atuar eficientemente na prevenção e no tratamento de muitas doenças e que atendam aos novos conceitos industriais, agregando aos produtos questões como sustentabilidade e conservação do meio ambiente, somam as principais características procuradas pelos consumidores atuais. Isto tem produzido forte impacto nas indústrias

de alimentos e de bebidas, que tem buscado o desenvolvimento de produtos que atendam tais exigências de mercado.

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um suplemento proteico obtido a partir do soro do leite, por processos de separação por membranas e adoçado com RebA que, por suas propriedades antioxidantes e insulinoatrópicas pode enriquecer as propriedades nutricionais e funcionais dos CPS. Além disso, que esse suplemento pudesse ser utilizado sem restrições por pessoas diabéticas, e que apresentasse propriedades benéficas para o controle metabólico desses pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO A PARTIR DO SORO DO LEITE (CPS)

Materiais

O soro do leite foi fornecido pelo laticínio FLORA MILK, da cidade de Flórida/PR. Na Unidade Piloto de Extração do NEPRON, da UEM, foram realizados todos os processos para a obtenção do concentrado em pó. Esses incluem as etapas de ultrafiltração (UF), diafiltração (DF), nanofiltração (NF) e secagem em *spray dryer*.

O rebaudiosídeo A (RebA) foi obtido através da extração, separação e purificação das folhas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, da variedade clonal M1 Alvarez cultivada no NEPRON.

Equipamentos

A ultrafiltração e a diafiltração foi realizada em um sistema com duas membranas filtrantes (*cut off* de 10kD) de poliestersulfona, marca *Koch*, em configuração espiral, composta em paralelo perfazendo uma área de 3,5m².

A nanofiltração foi realizada em sistema de osmose reversa, composto por duas membranas de *cut off* de massa molecular 180D (*Koch*) e 500D (*Millipore*), em configuração espiral dispostas em série, com área total de 3,5m² e 0,3 m², respectivamente. Ambas as membranas utilizadas são de poliamida. A secagem do CPS foi realizada em um atomizador *spray dryer*, marca *Büchi*, modelo B-191.

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Proteínas totais

A quantificação de proteínas totais dos concentrados proteicos produzidos foi realizada no laboratório de alimentos e água (CCE/Departamento de Química) da Universidade Estadual de Maringá. A análise foi determinada segundo metodologia da AOAC 16^a Edição.⁽²⁴⁾

Lactose

A concentração de lactose foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por meio de um cromatógrafo líquido (Marca *Gilson*, modelo 307) acoplado a um detector de Índice de Refração e coluna de NH₂ 5μ de dimensões 150 x 4,6mm.

Lipídeos totais

A concentração de lipídeos totais realizada no laboratório de alimentos e água (CCE/Departamento de Química) da Universidade Estadual de Maringá. A análise foi determinada segundo metodologia da AOAC 16ª Edição.⁽²⁴⁾

Resíduo Mineral fixo (Cinzas)

Todas as análises foram feitas em triplicata e seguiram a metodologia do Instituto Adolfo Lutz, 2005⁽²⁵⁾ de métodos químicos e físicos para análises de alimentos. Os experimentos foram realizados no laboratório do NEPRON.

Teor de sólidos solúveis (° Brix) e pH (%)

Esses parâmetros foram avaliados no laboratório do NEPRON. Todas as análises foram feitas em triplicata e seguiram a metodologia do Instituto Adolfo Lutz, 2005⁽²⁵⁾ de métodos químicos e físicos para análises de alimentos.

AVALIAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

As análises foram realizadas segundo a metodologia proposta do FDA/Bacteriological Analytical Manual 8th Edition, 1995⁽²⁶⁾ e às recomendações da legislação brasileira estabelecida pela RDC nº12/2001 da ANVISA,⁽²⁷⁾ para cada tipo de alimento. Foram avaliados coliformes a 45°C, *Salmonella* sp e *Staphylococcus* coagulase positiva.

FORMULAÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO ADOÇADO COM REBA

O CPS II foi adoçado com RebA por meio de testes sensoriais com 15 provadores treinados. O teste foi realizado no NEPRON e foi baseado em equivalência de dulçor entre RebA e sucralose.

AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS EM ANIMAIS DIABÉTICOS

Animais Experimentais

Todos os procedimentos realizados neste trabalho atendem plenamente aos princípios éticos da experimentação animal, elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (Parecer 120/2013).

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 50 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UEM. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas nas seguintes condições: temperatura de 24°C, fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, água e ração *ad libitum* (Nuvilab[®] - Colombo - PR) e acondicionados em gaiolas coletivas (46 X 24 X 20 cm), 5 animais por gaiola, ou em gaiolas metabólicas individuais.

Indução do Diabetes

Os animais, em jejum noturno de 12 horas, receberam uma única aplicação intravenosa de estreptozotocina (Sigma; 40mg/kg p.c.) dissolvida em tampão citrato (0,05M; pH 4,5), ficando, em seguida, por mais quatro horas em jejum. Após três dias da indução do diabetes foram selecionados os animais que apresentaram glicemia de jejum igual ou superior a 140 mg/dL.

Grupos experimentais

Foram estabelecidos três grupos experimentais (n=6 para cada grupo): dois de animais diabéticos, sendo um controle (DC) e outro suplementado (DS), e um grupo de animais normais (não-diabéticos) controle (NC). Os valores da glicemia de jejum, da glicemia no estado alimentado e do peso corporal, registrados no terceiro dia após a indução do diabetes, foram utilizados para a separação dos animais diabéticos em dois grupos homogêneos com relação ao grau de diabetes instalado.

Suplementação com o concentrado proteico adoçado com RebA

O grupo DS recebeu por via oral, através de sonda esofágica, o concentrado proteico CPS II (100mg / kg de peso corporal/ dia) adoçado com o RebA (0,026mg de RebA/100mg de CPS II diluído em água), sempre no mesmo horário (07:30 hs), por um período de 35 dias. Os animais dos grupos DC e NC passaram pelo mesmo procedimento, mas receberam apenas água. A quantidade de proteína utilizada na suplementação do grupo DS foi estabelecida segundo estudos realizados por outros autores.^(20, 21, 22) A quantidade de RebA foi estabelecida através de testes sensoriais de equivalência de dulçor com a sucralose.

Parâmetros avaliados

Semanalmente, foram registrados o peso corporal, a glicemia de jejum e no estado alimentado. A glicemia no estado alimentado foi obtida em amostras de sangue colhidas às 8 horas da manhã, tendo os animais livre acesso ao alimento durante toda a noite. Após tal procedimento, os animais permaneceram em jejum de 8 horas e nova coleta foi realizada às 17 horas e permitiu a determinação da glicemia de jejum. Ao final do tratamento, foi determinada a curva glicêmica e os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT). Todas as coletas de sangue foram realizadas por punção caudal e os valores de glicemia determinados por meio de um glicosímetro (marca *MediSense Optium*).

Para a determinação da curva glicêmica de 12 horas, foram colhidas amostras de sangue dos animais em estado de jejum (tempo 0h) e, em seguida os animais foram alimentados. Novas amostras de sangue foram colhidas às 2, 4 e 12 horas após esse fornecimento de alimento.

Para o teste oral de tolerância à glicose os animais foram deixados em jejum noturno de 12 horas e, após a determinação da glicemia no tempo zero, receberam uma sobrecarga de glicose via oral (1,0 g/kg p.c.) e novas amostras de sangue foram colhidas nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Com o auxílio de gaiolas metabólicas individuais foram obtidos, ao final do tratamento, os dados da ingestão alimentar e hídrica.

No dia da eutanásia, os animais (jejum noturno de 12 horas) foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg de p.c, via i.p), submetidos a laparotomia mediana e amostras de sangue foram colhidas através da veia cava inferior e transferidas para

tubos para obtenção de amostras de soro e plasma. Tais amostras ficaram armazenadas a -20°C e utilizadas posteriormente para dosagens bioquímicas.

Para eutanásia foi realizada uma sobrecarga do mesmo anestésico e, logo em seguida, fossem retirados e pesados as gorduras retroperitoneais e periepididimais, os músculos gastrocnêmio e sóleo, os testículos, as vesículas seminais, os rins, o fígado e o baço.

Os valores plasmáticos de glicose, colesterol total, triglicérides e da frutossamina e os valores séricos de AST (Aspartato aminotransferase) e ALT (Alanina aminotransferase) foram quantificados através de técnicas analíticas automatizadas, utilizando o espectrofotômetro da marca *Bioplus2000*[®] e reagentes específicos da marca *Gold Analisa*[®].

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey (nível de significância estabelecido em $p < 0,05$). Foi utilizado o programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*) 2006, versão 9.1 e o programa *GraphPad Prism 5.0*[®].

RESULTADOS

OBTENÇÕES DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS CPS I e CPS II

Obtenção do CPS I

Um lote de mil litros de soro de leite bovino, produzido pelo Laticínio *Flora Milk*, da cidade de Flórida (PR), foi fornecido ao NEPRON pasteurizado e desnatado. Os teores iniciais de proteínas e °Brix mediram respectivamente 0,5% e 6°. A Tabela 1 mostra as condições estabelecidas para a realização da etapa de concentração das proteínas do soro de leite por ultrafiltração (UF). Ao final desse processo obtivemos o concentrado CPS e o permeado, que foi descartado. O volume de concentrado obtido foi de 150 litros (9°Brix).

Tabela 1. Ultrafiltração (concentração) do soro do leite

	Vol. de soro (L)	Temperatura (°C)	Pressão (kgf/cm ²)	Vazão (L/h.)	Vol. Final do CPS (L)
UF	1000	35	2,5	120	150

Na diafiltração (DF), etapa seguinte à ultrafiltração do soro, foi adicionado um volume de 400 litros de água destilada ao sistema, com o objetivo de promover a recirculação de partículas e aumentar a concentração e purificação das proteínas. Após esse processo, foi realizada a nanofiltração (NF) e, por fim, a secagem. Dessa forma obtivemos o CPS I. As Tabelas 2 e 3 ilustram esses processos.

A secagem foi realizada com 20L de concentrado, sendo que 30L foram acondicionados e armazenados no freezer.

Tabela 2. Obtenção do CPS I

	Vol. inicial de CPS (L)	Pressão (kgf/cm ²)	Vazão (L/h)	Vol. Final de CPS I (L)	° Brix
DF	150+400 ⁺	3,0	90	140	7
NF	140	14,05	50	50	7

⁺400L de água destilada adicionados.

Tabela 3. Secagem em *spray dryer* do CPS I

Etapa	Vol. de CPS I (L)	Temperatura (°C)	Massa obtida (g)
Secagem	20	120	800

Análises físico-químicas do CPS I

A Tabela 4 apresenta os resultados das análises físico-químicas do CPS I. O concentrado produzido apresentou taxa de 58% de proteínas. Tal porcentagem enquadra-o na categoria de concentrados proteicos. Porém o teor de lactose, principal carboidrato presente foi relativamente alto, 24%. Sendo assim foi realizada uma nova etapa de concentração com o objetivo de aumentar a taxa de proteínas e reduzir o teor de lactose.

Tabela 4. Análises físico-químicas do CPS I

	g/100 g de CPS I
Proteínas Totais	58 ± 0,01
Lactose	24 ± 0,01
Lipídeos Totais	8,1 ± 0,01
Resíduo Mineral fixo (Cinzas)	0,96 ± 0,01

Dados expressam a média ± E.P.M.

Obtenção do CPS II

Com o objetivo de obter um concentrado com maior teor de proteínas e menor teor de lactose, uma amostra de CPS I foi nanofiltrada (membrana de poliamida de 500D) e diafiltrada, gerando o CPS II. A Tabela 5 mostra as condições as quais o processo de nanofiltração foi realizado.

Tabela 5. Processo de NF do CPS II

	Vol. Inicial de CPS (L)	Pressão (kgf/cm²)	Vazão (ml/min)	Vol. Final de CPS II (L)
NF	4	5,25	84	2

Foram realizados 15 ciclos de DFs (à quente - 35°C) com adição de 2 litros de água destilada em cada um deles. Ao final, coletamos o CPS II para a realização do processo de secagem. O °Brix e o pH do CPS II foram de 20 e 6,5 respectivamente.

O processo de secagem, em *spray dryer*, foi realizado com 600 ml de CPS II. As condições e os resultados do processo estão ilustrados na Tabela 6. Esse concentrado (CPS II) foi utilizado para os experimentos fisiológicos e funcionais que avaliaram seus efeitos em ratos diabéticos induzidos.

Tabela 6. Processo de Secagem do CPS II em *spray dryer*

Vol. de CPS II (L)	Temperatura (°C)	Massa seca (g)
0,6	105	60

Análises físico-químicas CPS II

O CPS II obtido por meio do processo de nanofiltração e diafiltração do CPS I, apresentou teor protéico de 74,3% e teor de lactose de 17,3% (Tabela 7).

Tabela 7. Análises físico-químicas de CPS II

	g/100g de concentrado
Proteínas Totais	74,3 ± 0,03
Lactose	17,3 ± 0,05
Lipídeos Totais	5,16 ± 0,01
Resíduo mineral fixo (Cinzas)	0,76 ± 0,01

Dados expressam a média ± E.P.M.

Avaliações Microbiológicas

A Tabela 8 evidencia que as técnicas de processamento e obtenção do CPS II estão de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira vigente.

Tabela 8. Avaliações microbiológicas do CPS II

	CPS II
Coliformes a 45°C (NMP. g ⁻¹)	< 3
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC. g ⁻¹)	< 1x10 ²
<i>Salmonella</i> spp	Ausência

Formulação de CPS II com RebA

Através de experimentos realizados neste laboratório, baseados em equivalência

de dulçor, o concentrado proteico (CPS II) foi adoçado com 26mg de RebA/100g de CPS II.

AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS EM ANIMAIS DIABÉTICOS

Peso corporal

A Figura 1 apresenta a evolução do peso corporal dos três grupos de animais experimentais. Um dos parâmetros utilizados para separar os grupos DC e DS foi o peso corporal, de modo que antes de iniciar o tratamento os animais diabéticos de ambos os grupos apresentavam pesos semelhantes. Os animais do grupo DC, conforme já esperado para este modelo experimental, ganharam significativamente menos peso quando comparado com os animais do grupo NC. Os animais do grupo DS, no entanto, ganharam significativamente mais peso que o grupo DC, apresentando valores próximos ao do grupo NC. Portanto, a suplementação foi eficiente em melhorar o ganho de peso corporal no grupo DS, como pode ser constatado também pelos valores de ASC (área sob a curva) demonstrados no detalhe da Figura 1.

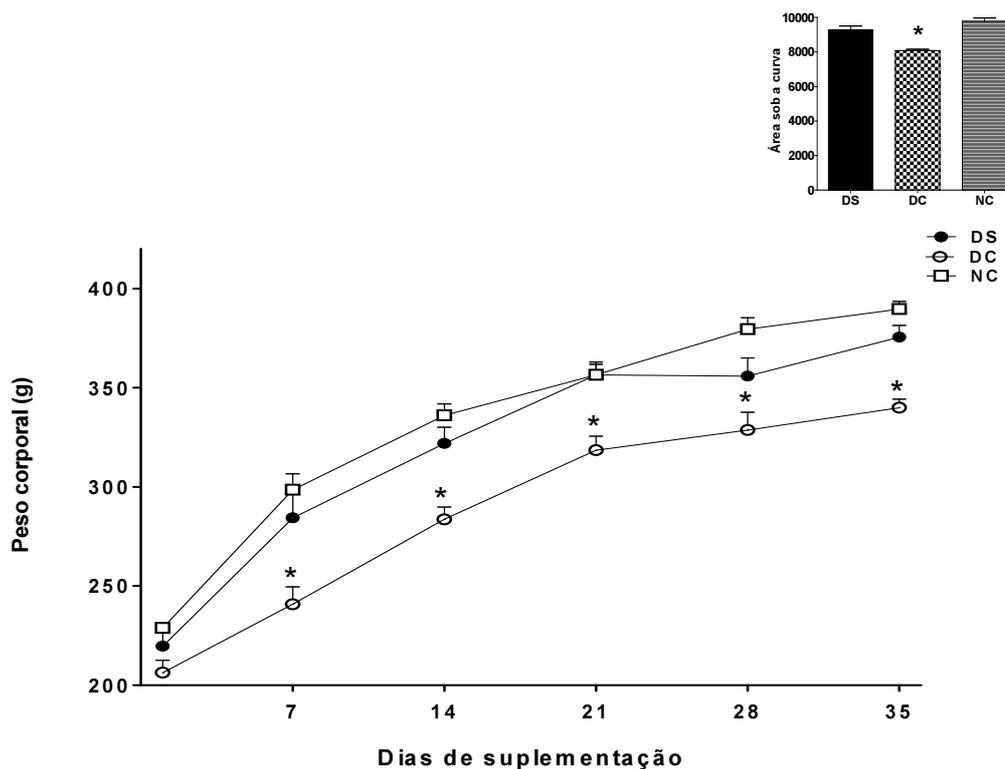


Figura 1. Efeito da suplementação com CPS II adoçado com RebA na evolução do peso corporal de ratos diabéticos. No detalhe área sob a curva (ASC). DS = Diabéticos suplementados; DC = Diabéticos controles; NC = Normais controles. Dados expressam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ para comparação com DS e DC.

Glicemia semanal - Variação da glicemia de jejum ao longo dos dias de suplementação

Os dados da glicemia de jejum obtidos semanalmente são mostrados na Figura 2. Observa-se que os animais diabéticos, de ambos os grupos experimentais, apresentaram valores significativamente maiores quando comparados com os animais do grupo NC. Percebe-se que após 21 dias de suplementação os ratos diabéticos do grupo DS passaram a apresentar valores menores de glicemia, com diferenças estatisticamente significativas a partir de 28 dias de suplementação, em relação ao grupo DC. No detalhe da figura estão demonstrados os valores de ASC, que comprovam o quadro de

hiperglicemia dos animais diabéticos e, apesar dos valores menores para o grupo DS, esses não foram estatisticamente diferentes do grupo DC.

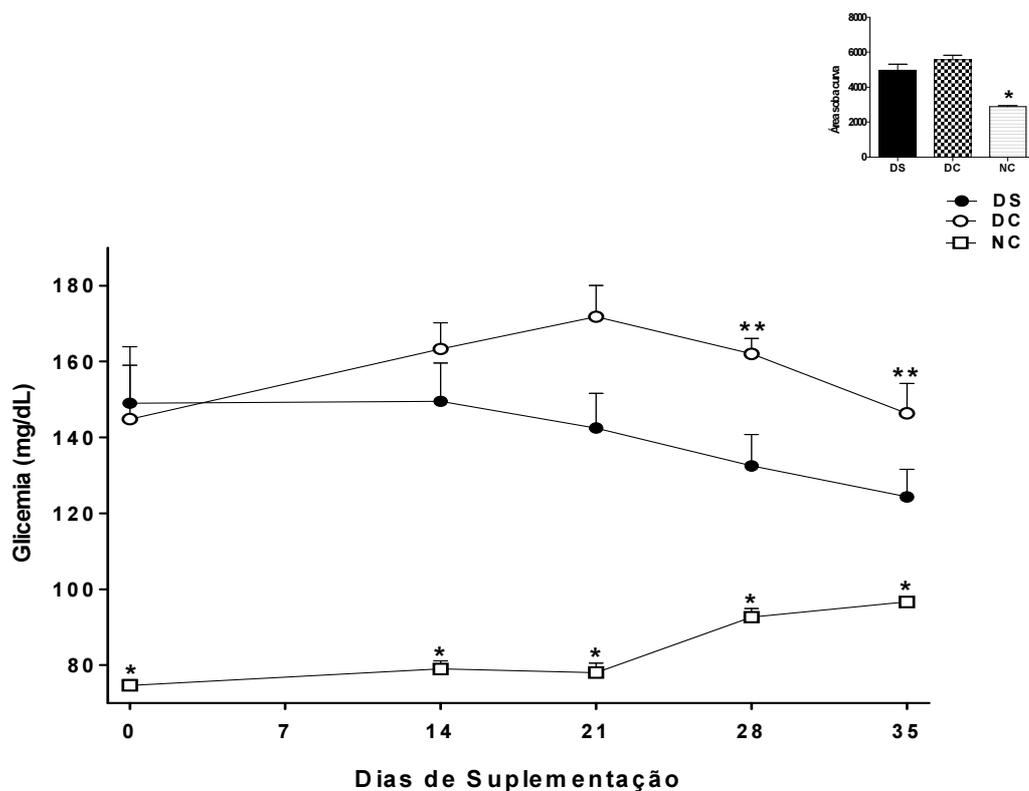


Figura 2. Efeito da suplementação com CPS II adoçado com Reb A na glicemia de jejum de ratos diabéticos No detalhe área sob a curva (ASC). DS = Diabéticos suplementados; DC = Diabéticos controles; NC = normais controles. Dados expressam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ para comparação com DS e DC; ** $p < 0,05$ em comparação com DC.

Glicemia semanal - Variação da glicemia no estado alimentado ao longo dos dias de suplementação

A Figura 3 mostra a glicemia dos animais no estado alimentado e, no detalhe, os valores de ASC. Verifica-se que, em todos os dias avaliados, os grupos de animais diabéticos apresentaram valores glicêmicos significativamente maiores que o grupo NC, caracterizando, mais uma vez, o quadro hiperglicêmico daqueles animais. Os animais do grupo DS apresentaram sempre valores glicêmicos inferiores aos animais do grupo DC,

sendo que no 14^o dia de suplementação tais diferenças foram significativas. Apesar dos valores verificados nos outros pontos não diferirem significativamente, a redução da glicemia no estado alimentado causado pela suplementação foi suficiente para reduzir significativamente os valores de ASC.

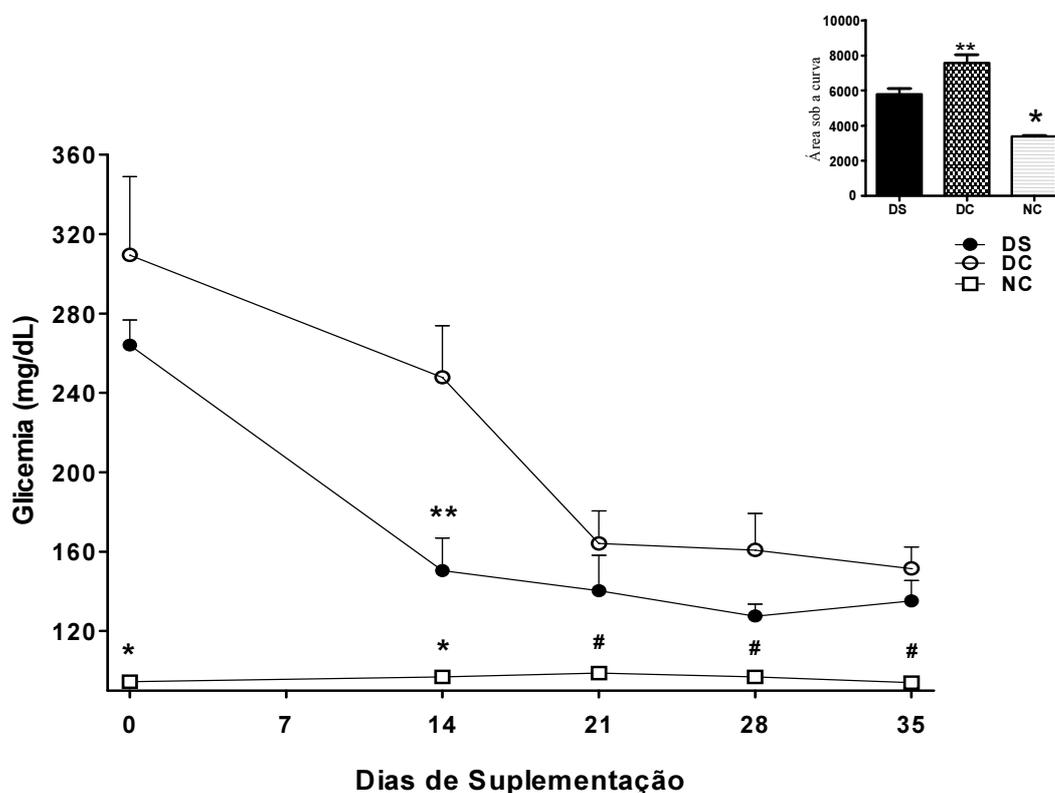


Figura 3. Efeito da suplementação com CPS II adoçado com Reb A na glicemia no estado alimentado de ratos diabéticos. No detalhe área sob a curva (ASC). DS = Diabéticos suplementados; DC = Diabéticos controles; NC = normais controles. Dados expressam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ para comparação com DS e DC; # $p < 0,05$ em comparação com DC; ** $p < 0,05$ em comparação com DC.

Teste de tolerância à glicose (GTT)

Os valores de glicemia observados durante o GTT oral estão representados na Figura 4. Verificam-se respostas alteradas dos grupos de animais diabéticos (DC e DS) comparados com animais não diabéticos (NC). O efeito benéfico da suplementação foi observado, pois todos os valores de glicemia registrados durante o teste foram inferiores

no grupo DS quando comparados com o grupo DC, com diferenças estatísticas nos tempos 0, 15 e 30 minutos. Os valores de ASC, evidenciados no detalhe da Figura mostram diferenças significativas apenas entre os grupos de animais diabéticos e o grupo NC; o grupo DS apesar dos valores menores de ASC, não diferiu significativamente dos valores encontrados para o grupo DC.

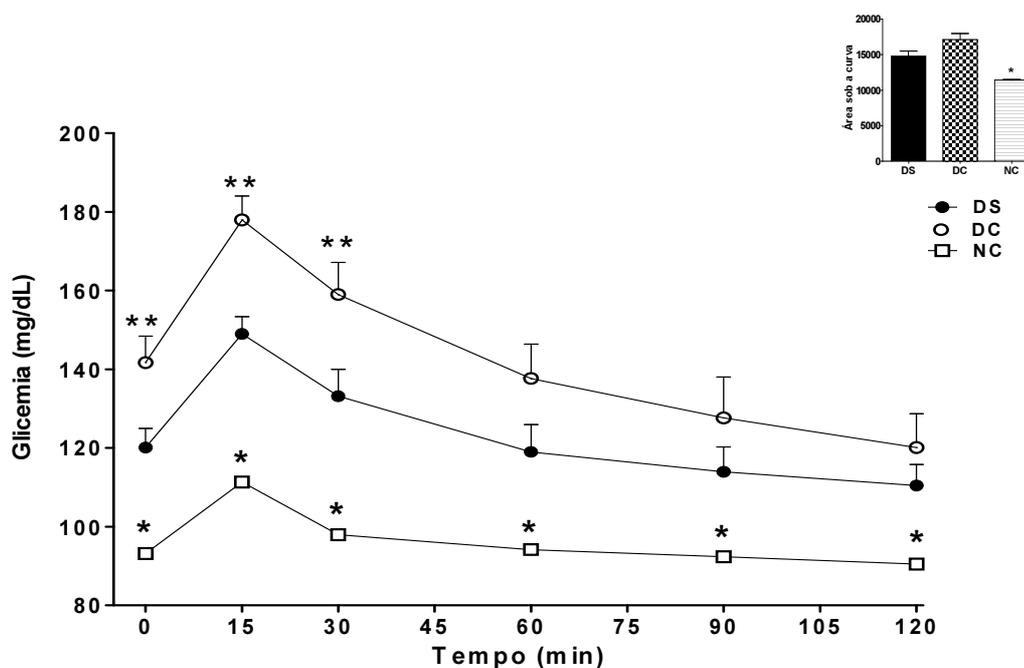


Figura 4. Efeito da suplementação com CPS II adoçado com Reb A no teste oral de tolerância à glicose (1 g/kg p.c) em ratos diabéticos. No detalhe área sob a curva (ASC). DS = Diabéticos suplementados; DC = Diabéticos controles; NC = normais controles. Dados expressam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ para comparação com DS e DC; ** $p < 0,05$ em comparação com DC.

Curva glicêmica

A Figura 5 mostra a curva glicêmica dos grupos DS, DC e NC. Percebe-se que os animais do grupo NC apresentaram pouca variação nos valores glicêmicos registrados nos diferentes horários, com pequena elevação após a oferta de ração. Outras pequenas elevações na glicemia devem ter ocorrido durante o intervalo de tempo em que não foram realizadas avaliações, ou seja, entre 4 e 12 horas após o fornecimento

de alimento, visto que tais animais apresentam hábitos noturnos. Independente desse fato é importante assinalar que não só a glicemia de jejum, mas também a glicemia no estado alimentado, registrada 2, 4 e 12 horas após o fornecimento de alimento (considerados pós-prandiais) estavam dentro de intervalos normais, mostrando o bom controle metabólico de tais ratos. Já nos animais diabéticos, tanto do grupo DC como do grupo DS, os valores glicêmicos estavam, em todos os horários registrados, significativamente elevados. A suplementação com CPS II possibilitou melhora no controle metabólico, com reduções significativas na glicemia registrada nos dois primeiros horários (2 e 4 horas). Os valores de ASC (detalhe da figura), no entanto, apesar de menores no grupo DS, não diferiu significativamente do grupo DC.

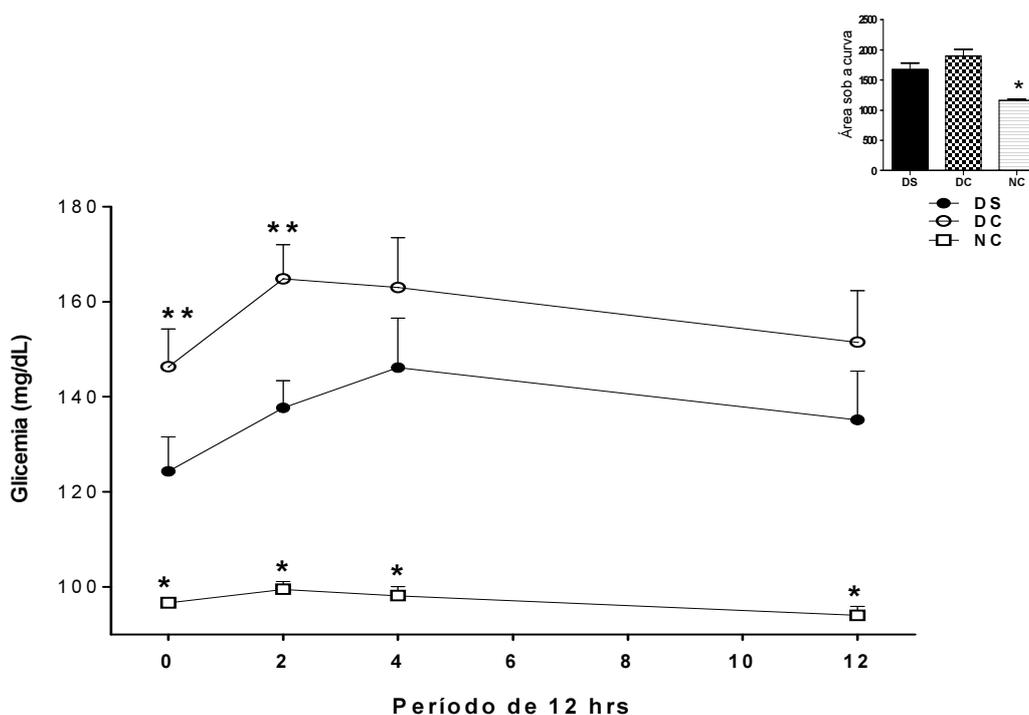


Figura 5. Efeito da suplementação com CPS II adoçado com Reb A na curva glicêmica de ratos diabéticos No detalhe área sob a curva (ASC). DS = Diabéticos suplementados; DC = Diabéticos controles; NC = normais controles. Dados expressam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ para comparação com DS e DC; ** $p < 0,05$ em comparação com DC.

Ingestão Alimentar e Hídrica

A Tabela 9 mostra os resultados de ingestão alimentar e hídrica no período de 24 horas. A ingestão alimentar foi semelhante nos três grupos experimentais. A ingestão hídrica foi significativamente maior nos grupos de animais diabéticos, quando comparados com os animais normais, caracterizando naqueles o quadro de polidipsia. Não foram observados efeitos significativos da suplementação com CPS II adoçado com RebA em tal parâmetro.

Tabela 9. Efeito da suplementação com CPS II adoçado com RebA na ingestão alimentar (IA) e na ingestão hídrica (IH) de ratos diabéticos.

	DS	DC	NC
IA (g/dia)	39,03 ± 1,11	37,92 ± 1,11	36,92 ± 1,11
IH (ml/dia)	78,67 ± 1,90	79,33 ± 1,90	30,33 ± 1,90*

DS = Diabéticos suplementados. DC = Diabéticos controles. NC = normais controles. Dados expressam a média ± E.P.M. *p<0,05 em relação aos grupos DS e DC.

Dosagens bioquímicas

Na Tabela 10 estão os resultados referentes aos parâmetros bioquímicos avaliados em amostras de plasma ou soro colhidas ao final do tratamento. Os valores de glicemia de jejum estavam significativamente mais elevados no grupo de animais diabéticos quando comparados com o grupo NC. A suplementação, confirmando outros resultados mencionados, reduziu significativamente a hiperglicemia, refletindo beneficemente nos valores de frutossamina, que foram significativamente menores no

grupo DS em comparação com o grupo DC e muito próximos dos valores registrados nos animais do grupo NC. Outro efeito benéfico da suplementação foi a redução no colesterol total e dos triglicérides plasmáticos. Os valores de AST e ALT não diferiram estatisticamente entre os grupos DC e DS.

Tabela 10. Efeito da suplementação com CPS II adoçado com RebA nos valores plasmáticos de glicose, frutossamina, colesterol total e triglicérides e nos valores séricos de AST e ALT de ratos diabéticos.

	DS	DC	NC
Glicemia (mg/dL)	129,88 ± 4,78	153,54 ± 3,21 ^{**}	96,63 ± 0,68 [*]
TGP ou ALT (U/L)	1,96 ± 0,71	3,82 ± 1,02	6,81 ± 0,13 [*]
TGO ou AST (U/L)	37,21 ± 2,17	35,50 ± 2,36	17,13 ± 0,82 [*]
Colesterol total (mg/dL)	84,00 ± 2,72	92,87 ± 2,93 ^{**}	71,00 ± 1,01 [*]
Triacilgliceróis (mg/dL)	38,25 ± 2,09	46,75 ± 2,02 ^{**}	54,83 ± 0,83 [*]
Frutossamina (mmol/L)	1,03 ± 0,03	1,27 ± 0,14 ^{**}	1,00 ± 0,01

DS = Diabéticos suplementados. DC = Diabéticos controles. NC = normais controles. Dados expressam a média ± E.P.M. *p<0,05 para comparação com DS e DC; **p<0,05 em comparação com DS.

Peso de órgãos e tecidos

O peso do tecido adiposo periepídídimo, dos músculos gastrocnêmio e sóleo, dos rins, do fígado, das vesículas seminais e dos testículos não diferiram significativamente entre os grupos DC e DS, tanto na comparação dos valores absolutos como relativos (por 100g p.c.) (dados não mostrados). Diferenças significativas foram registradas no peso das gorduras retroperitoniais, tendo a suplementação causado redução da adiposidade (1,00 ± 0,09g) quando comparado com ratos diabéticos controle (1,45 ± 0,09g).

DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a produção de concentrados proteicos do soro de leite (CPS) por meio de processos de separação de membranas, avaliou o perfil sensorial com RebA bem como suas propriedades funcionais para diabéticos.

A ultrafiltração do soro de leite desnatado e pasteurizado, em membrana com *cut off* de 10kD e secagem em *spray dryer*, resultou em um produto (CPS I) na forma de pó com 58% de proteínas, 24% de lactose, 8,1% de lipídios e 0,96% de sais minerais. Esses resultados são similares aos encontrados por Ramos *et al.*⁽²⁸⁾ A ultrafiltração permitiu a concentração de proteínas e ainda a remoção de sais do soro do leite. O fator de concentração dessa etapa foi de 6,6; o que está de acordo com Baldasso *et al.*⁽¹³⁾

Considerando que o baixo teor de proteínas no CPS I, em relação à maioria dos produtos de maior aceitação comercial, realizou-se a nanofiltração e a diafiltração de uma amostra de CPS I, em membrana com *cut off* de 500D, obtendo assim o CPS II. Foram realizados 15 ciclos de diafiltração a fim de aumentar o teor de proteínas do concentrado. Segundo Pagno *et al.* e Yee *et al.*,^(11,29) a concentração de proteínas pode ser aumentada proporcionalmente ao número de ciclos de DF.

Após a diafiltração, o CPS II foi submetido à secagem em *spray dryer* na temperatura de 105°C. Fang *et al.*,⁽³⁰⁾ investigou o efeito das condições de secagem por *spray dryer* sobre a funcionalidade das proteínas do soro do leite concentradas. Foram avaliadas secagens nas seguintes temperaturas: 77°C, 107°C, 155°C e 178°C. Os resultados indicaram que a utilização de temperaturas mais baixas preserva a solubilidade das proteínas e diminui a possibilidade de desnaturação.

Sendo assim, o processo de nanofiltração resultou em um aumento do teor de proteínas e redução do teor de lactose e, portanto, em um produto similar aos concentrados protéicos disponíveis comercialmente.

Em face da necessidade de aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos e visando à proteção à saúde da população e a regulamentação dos padrões microbiológicos para alimentos,⁽²⁷⁾ o CPS II foi submetido à avaliação microbiológica. Os resultados negativos quanto aos microrganismos avaliados, indicaram que o CPS II foi produzido seguindo boas práticas de fabricação e conservação.

Os CPS disponíveis no mercado (*Whey protein*) são adoçados com edulcorantes sintéticos como o acesulfame K e principalmente a sucralose. O CPS II foi submetido a testes com o adoçante não calórico RebA, e a melhor formulação com dulçor similar aos produtos disponíveis no mercado e adoçados com sucralose, necessitou da adição de 26mg de RebA/100g de CPS II; portanto, uma concentração apenas duas vezes maior que a da sucralose. Relatos na literatura indicam que, geralmente, quantidades 5 a 6 vezes maiores de extratos de estévia ou esteviosídeo (baixo teor de pureza) são necessárias para que haja uma equivalência de dulçor em relação à sucralose.⁽³¹⁾

O CPS II adoçado com RebA foi testado em modelos de animais diabéticos com a finalidade de avaliar possíveis propriedades funcionais desse suplemento para pessoas portadoras de *Diabetes mellitus* (DM), uma das doenças crônicas degenerativas mais comuns da atualidade.⁽³²⁾ O DM é causado por defeitos na secreção ou ação da insulina, um hormônio proteico secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas. Uma das principais características dessa doença é a hiperglicemia prolongada, que provoca múltiplas disfunções no organismo, podendo causar a falência de vários órgãos.⁽³³⁾ O tratamento do DM é complexo, envolve o uso de insulino terapia e hipoglicemiantes,

exige dietas especiais e programas de atividades físicas. O estabelecimento de modelos experimentais de animais tem possibilitado realizar estudos que buscam contribuir na descoberta de métodos alternativos para o tratamento ou até mesmo para a prevenção do DM.⁽¹⁰⁾

O modelo de animais diabéticos utilizado neste trabalho foi aquele induzido por estreptozotocina, que apresenta como principal mecanismo de ação a alquilação do DNA, ocasionando a morte das células β pancreáticas,^(34,35) causando um quadro de alterações metabólicas semelhantes ao *Diabetes mellitus* tipo 1. Conforme os resultados apresentados, os animais diabéticos apresentaram hiperglicemia, redução no ganho de peso corporal, polidipsia e aumento nos níveis plasmáticos de frutossamina, confirmando a eficiência da droga no estabelecimento do modelo de diabetes. O suplemento alimentar com o CPS II adoçado com o RebA (100mg/kg p.c.), administrado diariamente com uma sonda esofágica, por um período de 35 dias, foi eficiente em amenizar os distúrbios metabólicos resultantes do quadro diabético.

A insulina é um hormônio com características anabólicas e a falta ou redução da sua ação causa sérias alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, com os processos catabólicos se sobrepondo aos anabólicos, levando a severa perda de peso corporal ou redução de seu ganho,⁽³⁶⁾ como no caso do modelo experimental de diabetes utilizado neste trabalho. O grupo de animais diabéticos que recebeu o suplemento CPS II adoçado com o RebA apresentou ganho de peso corporal significativamente maior que animais diabéticos controles, com valores próximos aos dos animais normais. Estudos mostraram que o aumento de peso de indivíduos que consomem proteínas do soro do leite está relacionado com o aumento da massa muscular que, por sua vez, depende do perfil de aminoácidos e proteínas que constituem estes suplementos.⁽³⁷⁾ Tal aumento no ganho de peso não pode ser explicado pelos

dados referentes ao peso de órgãos e tecidos que foram aqui avaliados, visto que estes não foram significativamente maiores que aqueles registrados no grupo de animais diabéticos controle (dados não mostrados). Não pode, também, ser em função de menor atividade lipolítica ou aumento de lipogênese dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal, visto que tais depósitos estavam significativamente menores nos animais diabéticos tratados. Com relação a este fato, estudos demonstram que os suplementos com aminoácidos, especialmente os de cadeia ramificada conhecidos como BCAAs, afetam processos do metabolismo que resultam na redução da gordura corporal.⁽³⁷⁾ Tratando-se de animais diabéticos tipo 1, a redução de gordura corporal pode, no entanto, representar uma efeito não benéfico e deve ser melhor avaliado. Considerando que não foram mensurados os depósitos de gordura subcutâneo, assim como não foram avaliados outros músculos além do gastrocnêmio e sóleo, estudos posteriores, investigando de modo mais amplo a composição corporal são necessários. Outro aspecto importante no quadro diabético é a severa desidratação que acompanha, de modo proporcional, à hiperglicemia instaurada no animal diabético. Os animais diabéticos tratados apresentaram melhor controle metabólico, com níveis hiperglicêmicos menores que o controle, deste modo é possível que tais animais apresentassem um quadro de desidratação mais ameno, o que pode ter contribuído significativamente no ganho de peso corporal registrado.

Os dados obtidos neste trabalho confirmam os estudos que tem mostrado a importância da suplementação das proteínas do soro do leite no controle da glicemia^(14, 18, 38). Pesquisas envolvendo humanos e animais diabéticos demonstraram que tais proteínas diminuem os valores de glicose plasmática e possuem importantes efeitos insulíntricos.^(38, 39, 40) Ratos diabéticos que receberam suplementação com o CPS II adoçado com RebA apresentaram reduções da glicemia de jejum e no estado

alimentado. Também mostraram melhor controle metabólico na análise da curva glicêmica e durante o GTT, que pode ser confirmado através dos valores plasmáticos de frutossamina. É possível que a adição de RebA como adoçante tenha contribuído nos efeitos funcionais atribuídos ao concentrado proteico, visto que importantes efeitos antidiabéticos tem sido atribuído a produtos extraídos da planta *Stevia rebaudiana*.^(7,8) Abdula *et al.*⁽⁸⁾ estudou o possível mecanismo de ação do RebA, e os resultados obtidos, indicaram que o RebA produz efeito insulínico, causando secreção de insulina por inibir canais de K_{ATP} nas células β pancreáticas.

Frid *et al.*⁽¹⁸⁾ constataram que a suplementação de refeições com alto índice glicêmico acompanhadas de proteínas do soro de leite, pode aumentar a secreção de insulina e melhorar o controle de glicose no sangue em indivíduos diabéticos tipo 2. Foram avaliados os comportamentos glicêmicos em até 4 horas após a refeição. Os resultados permitiram concluir que o acréscimo de proteínas do soro do leite adicionadas a refeições com carboidratos de rápida digestão e absorção, estimulam a liberação de insulina e reduzem os índices glicêmicos pós-prandiais.

Os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos hipoglicemiantes destes suplementos ainda não estão totalmente elucidados, mas estudos indicam que estejam relacionados com o aumento da secreção de insulina.⁽¹⁴⁾ Proteínas do soro do leite parecem induzir seus efeitos através de peptídeos bioativos e de aminoácidos gerados durante o processo de digestão gastrointestinal. Esses estimulam a liberação de hormônios intestinais que potencializam a secreção de insulina a partir de células β . Além disso, esses peptídeos podem servir como inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) que inibem hormônios que estão relacionados com o controle glicêmico.^(14, 38)

As dosagens plasmáticas de frutossamina confirmaram a melhora do quadro hiperglicêmico dos animais diabéticos que receberam a suplementação com CPS II

adoçado com o RebA. A hiperglicemia, característica do quadro diabético, causa a glicação não enzimática de proteínas plasmáticas que, após rearranjo molecular, transformam-se em cetoaminas estáveis nomeadas genericamente de frutosaminas, cuja maior parcela está ligada à albumina, que se constitui na maior massa proteica plasmática depois da hemoglobina,⁽⁴¹⁾ ou seja, assim como a formação da hemoglobina glicada, a frutosamina é resultante da interação da glicose plasmática e a lisina presente na molécula de albumina e em outras proteínas livres no plasma, decorrente de uma modificação não enzimática. Sua determinação em pacientes diabéticos é indispensável já que níveis elevados e contínuos de glicemia levam a um aumento de glicação das proteínas, fator que é a principal causa de doenças vasculares em pacientes diabéticos.⁽⁴²⁾ A frutosamina está elevada nos casos de diabetes cujo controle não está adequado, de modo que o teste de frutosamina pode detectar alterações nos níveis glicêmicos recentes.⁽⁴³⁾ Portanto, a redução nos níveis de frutosamina comprovam o melhor controle metabólico dos animais diabéticos que receberam a suplementação.

Com relação à lipidemia, os resultados obtidos mostraram que os animais diabéticos suplementados apresentaram níveis de colesterol total significativamente mais baixos que os animais do grupo diabético controle. Zhang *et al.*⁽⁴⁴⁾ investigaram o efeito da dieta de proteínas do soro do leite vs a de caseína sobre as concentrações plasmáticas de colesterol no sangue e no fígado de ratas fêmeas e constataram que, após 21 dias de suplementação, houve redução significativa nos níveis de colesterol no plasma e no fígado. Esses resultados evidenciam que as proteínas do soro do leite podem ter efeito significativo sobre os níveis de colesterol e, conseqüentemente, podem auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares de indivíduos normais e diabéticos. Assim como os níveis plasmáticos de colesterol, níveis reduzidos de triglicérides também foram encontrados nos animais diabéticos suplementados com o CPS II

adoçado com RebA. Resultados similares foram encontrados por Mortensen *et al.*⁽⁴⁵⁾ que mostraram que uma dieta com proteínas do soro do leite foi mais efetiva na redução dos níveis de triacilgliceróis de pacientes diabéticos, quando comparadas a outras fontes de dietas proteicas.

As concentrações séricas das aminotransferases AST e ALT, enzimas marcadoras da função hepática, foram avaliadas nos três grupos de animais experimentais. Um aumento na concentração destas enzimas pode indicar lesão de hepatócitos. Além disso, essas enzimas são consideradas indicadoras do diabetes. A elevação de seus níveis pode indicar comprometimentos na sinalização de insulina. O estresse oxidativo decorrente da reação da peroxidação lipídica e β -oxidação peroxissomal podem causar elevações nos níveis das aminotransferases e de resistência à insulina. O estado de resistência à insulina é caracterizado por um aumento de citocinas pró-inflamatórias como o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), que também pode contribuir para injúrias nos hepatócitos.⁽²²⁾ Não foram observadas diferenças significativas entre essas enzimas no plasma dos animais diabéticos tratados e controle.

Por fim, os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que os processos de separação por membranas foram eficientes na produção do CPS II, apresentando bons rendimentos. O CPS II adoçado com RebA apresentou importantes propriedades funcionais, e por isso deve ser melhor avaliado quanto a possibilidade de ser indicado como um suplemento alimentar para indivíduos portadores de *Diabetes mellitus*. Além disso, o RebA mostrou-se excelente para promover dulçor ao concentrado, podendo substituir os edulcorantes artificiais atualmente utilizados para adoçar tais suplementos e, possivelmente, conferir maior funcionalidade aos mesmos.

REFERÊNCIAS

- 1 Dacome AS, Silva CC, Costa CEM, *et al.* Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and eletrophoretic methods. *Process Biochemistry* 2005; **40**: 3587–3594.
- 2 Carakostas MC, Curry LL, Boileau AC, Brusick DJ. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology* 2008; **46**: 1–10.
- 3 Carvalho ACG, Oliveira RCG, Navacchi MFP, *et al.* Evolution of the potencial use of rebaudioside-A as sweetener for diet jam. *Food Science and Technology* 2013; **33 (3)**: 555–560.
- 4 Williams LD, Burdock GA. Genotoxicity studies on a hight-purity rebaudioside A preparation. *Food and Chemical Toxicology* 2009; **47**: 1831–1836.
- 5 Goto A, Clemente E. Influência do rebaudiosídeo A na solubilidade e no sabor do esteviosídeo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1998; **18 (1)**: 3–6.
- 6 Steinmetz WE, Lin A. NMR studies of the conformation of the natural sweetener rebaudioside A. *Carbohydrate Research* 2009; **344**: 2533–2538.
- 7 Tadhani MB, Patel VH, Subhash R. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of food compositionand Analysis* 2007; **20**: 323–329.
- 8 Abudula R, Matchkov VV, Jeppensen PB, *et al.* Rebaudioside A directly stimulates insulin secretion from pancreatic beta cells: a glucose-dependent action via inhibition of ATP-sensitive K⁺-channels. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2008; **10**: 1074–1085.
- 9 World Health Organization. **Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications.** Report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization 1999.
- 10 O' Keef, Jr. JH, Bell DSH, Wyne KL; tradução Machado PH. *Fundamentos em Diabetes.* Porto Alegre: Artmed, Inc., 2010; 14–152.
- 11 Pagno CH, Baldasso C, Tessaro IC, *et al.* Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. *Alim. Nutr.* 2009; **20(2)**: 231–239.

- 12 Ciabotti S, Barcelos MFP, Cirillo MA, Pinheiro ACM. Propriedades tecnológicas e sensoriais de produto similar ao tofu obtido pela adição de soro de leite ao extrato de soja. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2009; **29(2)**: 346–353.
- 13 Baldasso C, Barros TC, Tessaro IC. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalinação* 2011; **278**: 381–386.
- 14 Jakubowicz D, Froy O. Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and Type 2 diabetes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2013; **24**: 1–5.
- 15 Scherer R, Godoy HT. Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* 2009; **112(3)**: 654–658.
- 16 Sgarbieri VC. Propriedades fisiológicas - funcionais das proteínas do soro do leite. *Rev. Nutr.* 2004; **17(4)**: 397–409.
- 17 Pacheco MTB, Dias NFG, Baldini VLS, *et al.* Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2005; **25(2)**: 333–338.
- 18 Frid AH, Nilsson M, Holst JJ, Bjorck IM. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005; **82**: 69–75.
- 19 Mortensen LS, Jensen JH, Hartvigsen ML, *et al.* Effects of different fractions of whey protein on postprandial lipid and hormone responses in type 2 diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2012; **66**: 709–805.
- 20 Badr G, Mohany M, Metwalli A. Effects of undenatured whey protein supplementation on CXCL12- and CCL21-mediated B and T cell chemotaxis in diabetic mice. *Lipids Health Dis* 2011; **10**: 203–211.
- 21 Badr G, Badr MB, Mahmoud MH, *et al.* Treatment of diabetic mice with undenatured whey protein accelerates the wound healing process by enhancing the expression of MIP-1 α , MIP-2, KC, CX3CL1 and TGF- β in wounded tissue. *BMC Immunology* 2012; **13**: 32–40.
- 22 Ebaid H, Amir SA, Sayed A, Metwalli A. Whey protein enhances normal inflammatory responses during cutaneous wound healing in diabetic rats. *Lipids Health Dis* 2011; **10**: 235–245.
- 23 Baldasso C. **Fracionamento dos componentes do soro do leite através da tecnologia de separação por membranas.** 2011. 282 p. Tese (Doutorado em

Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RG, 2011.

24 **AOAC International**. *Official methods of analysis of AOAC International*. 16th edition. Arlington, VA, USA, Association of Analytical Communities. 2 vols. 1995.

25 Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. Vol.1, 4ª ed., Cap. IV, p. 98-105, IMESP, São Paulo, 2005.

26 Food and Drug Administration (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**. 8 ed. Arlington: A.O.A.C. International, 1995.

27 Brasil. Resolução RDC nº 12, 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União. Poder Executivo do Brasil**, Brasília, DF, 02 jan. 2001. Seção 1, n. 7, p. 07–09.

28 Ramos OL, Pereira JO, Silva SI, *et al*. Effect of composition of commercial whey protein preparations upon gelation at various pH values. *Food Research International* 2012; **48**: 681–689.

29 Yee KWK, Wiley DE, Bao J. Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: Operability under constant operating conditions. *Journal of Membrane Science* 2007; **290**: 125–137.

30 Fang Y, Rogers S, Selomuya C, Chen XD. Functionality of milk protein concentrate: Effect of spray drying temperature. *Biochemical Engineering Journal* 2012; **62**: 101–105.

31 Cardoso JMP, Battochio JR, Cardello HMAB. Equivalência de dulçor e poder edulcorante de edulcorantes em função da temperatura de consumo em bebidas preparadas com chá-mate em pó solúvel. *Ciênc Tecnol Aliment* 2004; **24(3)**: 448–452.

32 WHITING, D.R. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011; **94**: 311–321.

33 Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; **40**: 405–411.

34 Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MHL, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. *Biochem Pharmacol* 1995; **50**: 2015–2020.

- 35 Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, *et al.* Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 2000; **43**: 1528—1533.
- 36 Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; **46**: 419–425.
- 37 Haragushi FK, Abreu WC, De Paula H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para saúde a saúde humana. *Ver. Nutr.* 2006; **19(4)**: 479–488.
- 38 Takasaki K, Nakajima T, Ueno K, *et al.* Effects of combination treatment with dipeptidyl peptidase IV inhibitor and sulfonylurea on glucose levels in rats. *J. Pharmacol. Sci* 2004; **95**: 291–293.
- 39 Jain SK. L-cysteine supplementation as an adjuvant therapy for type-2 diabetes. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012; **90(8)**: 1061–1064.
- 40 Oliveira FCE, Volp ACP, Alfenas RC. Impact of different protein sources in the glycemic and insulinemic responses. *Nutr. Hosp.* 2011; **26 (4)**: 669–676.
- 41 Costa CEM. Rebaudiosídeo **A, um adoçante natural com efeitos celulares na ação e na secreção da insulina.** 2004. 98 p. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2004.
- 42 Costa CEM, COSTA SC, ROCHA M, *et al.* Rebaudioside A, glycoside of the *Stevia rebaudiana*, stimulates insulin secretion in rat isolated pancreatic islets. *Diabetes* 2003; **52(1)**: A370.
- 43 Beltrame CO. **Padronização da metodologia para determinação das concentrações sanguíneas de hemoglobina glicada e frutossamina em cães saudáveis, diabéticos e insulino-terapia.** 2011. 63 p. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná Curitiba, Curitiba, PR, 2011.
- 44 Huber IS, Strufaldi, B. Determinação de frutossamina sérica como índice de controle glicêmico em diabéticos. *Rev. ciênc. Farm* 1994; **15**: 75–84.
45. Zhang X, Beynen AC. Lowering effect of dietary milk-whey protein v. casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *British Journal of Nutrition* 1993; **70**: 139–146.
- 46 Mortensen LS, Hartvigsen ML, Brader LJ, *et al.* Differential effects of protein quality on postprandial lipemia in response to a fat-rich meal in type 2 diabetes: comparison of whey, casein, gluten, and cod protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009; **90**: 41–48.

47 Gunnarsson PT, Winzell MS, Deacon CF, Larsen MO, *et al.* Glucoseinduced incretin hormone release and inactivation are differently modulated by oral fat and protein in mice. *Endocrinology* 2006; **147**:3173–3180.

48 Leme JACA, Castellar A, Remedio RN, *et al.* efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para indução de diabetes em ratos wistar. *Biosci. J.* 2010; **26(3)**: 451–456.

49 Souza RR, Bergamasco R, Costa SC, *et al.* Recovery and purification of lactose from whey. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 2010; **49**:1337–1143.

50 Silva FM, Mello VDF. Índice glicêmico e carga glicêmica no manejo do Diabetes melito. *Rev. HCPA* 2006; **26(2)**: 73–81.