

PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE HIDROLISADOS OBTIDOS A PARTIR DE CONCENTRADOS PROTÉICOS DE SORO DE LEITE¹

Maria Teresa Bertoldo PACHECO^{2,3}; Nádia F. G. DIAS³; Vera Lúcia S. BALDINI⁴;

C. TANIKAWA³; Valdemiro C. SGARBIERI³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar a atividade funcional de hidrolisados obtidos por diferentes sistemas enzimáticos. Foram selecionadas proteases de origem animal (pancreatina) e bacteriana (protamex e alcalase). A atividade funcional foi monitorada pela dosagem de glutatona no fígado e testes de atividade imunológica no baço para reação imunológica primária (IgM) através da contagem de células formadoras de placa (CFP). Nos ensaios biológicos foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem A/J, em dieta AIN com 20% de proteínas na forma dos hidrolisados ou de concentrado de soro de leite. O número de CFP não diferiu estatisticamente para os hidrolisados de pancreatina e protamex, sendo inferior ($P < 0,05$) para o de alcalase. Os valores da dosagem de glutatona no fígado ($r=0,992$) correlacionaram positivamente com os resultados de CFP do baço.

Palavras-chave: propriedades funcionais; soro de leite; hidrolisados; glutatona.

SUMMARY

FUNCTIONAL PROPERTIES OF WHEY PROTEIN HYDROLYSATES FROM MILK WHEY PROTEINS CONCENTRATE. The object of this work was to compare the functional activity of whey protein concentrate (WPC) and its hydrolysates produced by different enzyme systems. Pancreatin and microbial (protamex and alcalase) were utilized. Functional activity was monitored by liver concentration of glutathione and primary immunological response (IgM) in spleen (PFC). In the biological assays isogenic mice A/J, fed on an AIN modified diet (20% WPC or its hydrolysates) were used. The PFC number did not differ for pancreatin and protamex hydrolysates but was inferior for alcalase hydrolysate ($p < 0.05$). Liver glutathione concentration showed a high positive correlation ($r=0,992$) with the PFC number in the spleen.

Keywords: functional properties; whey proteins; hydrolysates; glutathione.

1 - INTRODUÇÃO

Os hidrolisados protéicos têm sido utilizados desde 1940 com finalidades médicas na preparação de dietas especiais para alimentação enteral de bebês e para manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas. Na década de 70 assistiu-se um expressivo crescimento nos métodos de preparação e uso de hidrolisados protéicos, tanto com finalidades clínica e nutricional como para a melhoria de propriedades funcionais de proteínas e alimentos de base protéica [12].

A hidrólise enzimática de polímeros em alimentos, como por exemplo de proteínas, é um processo de considerável importância que tem sido utilizado para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando, particularmente, as características de absorção das protei-

nas. Segundo estes investigadores[18], os hidrolisados para fins nutricionais devem reunir as seguintes propriedades: ser osmoticamente equilibrados; hipoalergênicos; apresentar sabor aceitável sendo que o valor nutritivo do hidrolisado deve permanecer tão próximo da proteína original quanto possível.

Exemplos de doenças ou condições clínicas que exigem o uso de fórmulas especiais contendo hidrolisados protéicos incluem: doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome de intestino curto, fistulas, pancreatite, traumas severos, síndromes de imunodeficiência e alergias alimentares. Na preparação de alimentos especiais é desejável utilizar hidrolisados que possuam entre 2 a 6 aminoácidos (peso molecular abaixo de 2kDa) para facilitar ao máximo sua absorção intestinal, evitar o aparecimento de peptídeos amargos e a possibilidade de causarem efeitos alérgicos [12, 22].

Proteínas de soro e caseínas são preferidas para formulações infantis em virtude de seu elevado valor nutritivo. As proteínas de leite são utilizadas na forma de hidrolisados, onde normalmente são reduzidas a aminoácidos e peptídeos de muito baixo peso molecular. Teoricamente a hidrólise extensiva deve destruir os epítonos alérgicos (regiões de ligação da IgE), resultando em produtos hipoalergênicos seguros [19].

Trabalhos recentes têm demonstrado que as proteínas do soro apresentam algumas vantagens em relação às caseínas [6,8]. Diferenças fundamentais no metabo-

¹ Recebido para publicação em 12/03/2004. Aceito para publicação em 17/05/2005(001308).

² Departamento de Engenharia de Alimentos. FZEA/USP. CP: 23. CEP: 19365-900, Pirassununga-SP. E-mail: mtb@usp.br

³ Departamento de Alimentos e Nutrição. FEA/UNICAMP. CP: 6121. CEP: 13083-970, Campinas-SP.

⁴ Centro de Química. Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Centro de Química e Nutrição Aplicada. CEP: 13073-001, Campinas-SP.

A quem a correspondência deve ser enviada.

lismo e na ação fisiológica das caseínas e das proteínas de soro de leite, baseiam-se na propriedade das proteínas do soro não sofrerem alterações conformacionais pelos ácidos estomacais. Ao atingirem o intestino delgado são rapidamente digeridas e seus aminoácidos absorvidos, elevando rapidamente a concentração aminoácida do plasma e estimulando a síntese de proteínas nos tecidos [6,14].

As proteínas e peptídeos do soro produzem vários efeitos biológicos quando ingeridas como estímulo à síntese de glutatona, estímulo à síntese de IGF-1 (Insulin Growth Factor I), reforço imunológico, ação hipocolesterolemica, ação antitumoral e aumento da longevidade em animais de experimentação [11]. Contudo, para que as proteínas do soro de leite estimulem a síntese de glutatona e atuem como imunomoduladoras, elas devem permanecer com suas estruturas nativas intactas, preservando a atividade biológica original, que devem ser transferidas aos peptídeos resultantes da hidrólise [10].

As proteínas de soro de leite parecem ser as únicas com propriedade de aumentar a resposta imune através de uma maior produção de glutatona celular. Para vários investigadores [9,10,11] o estímulo à síntese de glutatona e ao estímulo imunológico depende das propriedades das proteínas de soro liberarem pela hidrólise enzimática peptídeos de glutamilmisteína, contidos nesta seqüência nas frações de albumina sérica (BSA), β -lactoglobulina e de imunoglobulina G. Contudo, para que os peptídeos sejam preservados até a fase de digestão para absorção, as proteínas devem estar na forma estrutural nativa [10]. A glutatona é um tri-peptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, distribuída em todas as células do organismo humano e animal. Desempenha função metabólica como antioxidante celular, protegendo contra efeitos deletérios de radicais livres, xenobióticos e como substrato para a enzima glutatona peroxidase (selênio dependente), com ação desintoxicante sobre o peróxido de hidrogênio e outros hidróperóxidos [11].

Durante a preparação de concentrados protéicos de soro de leite e seus hidrolisados, alguns cuidados são necessários para diminuir a desnaturação das proteínas durante as diversas etapas do processamento como pré-aquecimento, evaporação e secagem. Como cita a literatura, os peptídeos glutamilmisteína contidos nas proteínas devem permanecer intactos e nesta seqüência [9, 10]. Sabe-se que as enzimas possuem especificidade quanto à posição de clivagem das ligações peptídicas, resultando em fragmentos protéicos com diferentes seqüências aminoácidas. Como os estudos sobre a ação imunomoduladora de hidrolisados protéicos de proteínas de soro de leite são escassos, pretendeu-se neste trabalho investigar se a utilização de diferentes enzimas, com diferentes especificidades em hidrólise extensiva, mantém as propriedades bioativas, no que se refere ao estímulo da produção de glutatona e aumento na produção de anticorpos.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Obtenção do concentrado protéico de soro de leite (CSL)

O concentrado protéico de soro de leite foi obtido a partir de leite desnatado pasteurizado, separado da fração caseína por coagulação, utilizando coalho líquido comercial (Há-La 2154/CHR HANSEN), nas proporções indicadas pelo fabricante. O soro foi ultrafiltrado e diafiltrado em membranas de fluxo tangencial (corte 10KDa WGM-Kock membrane system) para concentração da proteína e remoção de outros componentes do soro, e posteriormente desidratado em liofilizador, conforme descrito em BORGES et al. [7].

2.2 - Obtenção dos hidrolisados a partir dos concentrados protéicos de soro de leite

Utilizou-se no preparo dos hidrolisados para os ensaios biológicos, um reator com capacidade de 2,5L, com agitação constante, durante 360 minutos. O grau de hidrólise obtido para todos os hidrolisados foi de aproximadamente 20%. No final do processo a temperatura foi elevada a 85°C por 15 minutos, para inativação das enzimas. Posteriormente os hidrolisados foram congelados e liofilizados.

Três sistemas enzimáticos foram utilizados: a) Pancreatina (Sigma)- complexo enzimático obtido de pâncreas suíno, contendo as enzimas proteolíticas tripsina, quimotripsina e carboxipeptidases; b) Alcalase 0,6L (Novo Nordisk)- enzima proteolítica de grau alimentício, preparada por fermentação controlada de uma linhagem selecionada de *Bacillus licheniformis*; c) Protamex (Novo Nordisk)- protease de *Bacillus*, desenvolvida para hidrólise de proteínas alimentares.

A proporção enzima substrato foi de 1:250, sendo que a concentração de substrato para todos os sistemas foi de 10% (p/v), nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima, de acordo com as especificações do fabricante. O grau de hidrólise foi monitorado pelo método do pH-stat [3].

2.3. Composição centesimal

Sólidos totais, proteína bruta (Nx6,38) e cinzas foram determinados segundo AOAC [1]. Lipídios totais e lactose pelo método de BLIGH & DYER [5] e de ACTON [2], respectivamente.

2.4 - Composição de aminoácidos

Foi determinada após hidrólise ácida (HCl 6N, 110°C, 22h) em um analisador de aminoácidos (Dionex DX - 300), por separação em coluna de troca catiônica, seguida de reação colorimétrica pós-coluna com ninidrina. A quantificação foi realizada com base numa mistura de padrões de aminoácidos (Pierce kit 22).

Para determinação dos aminoácidos livres as amos-

tras foram tratadas com ácido tricloro acético a 10% (TCA) e centrifugadas. Os aminoácidos livres foram extraídos do sobrenadante com éter etílico. O solvente foi posteriormente evaporado e a amostra seca redissolvida no tampão de análise.

2.5 - Solubilidade

A desnaturação protéica do CSL foi avaliada através da solubilidade em pH 4,6. Após 1 hora de agitação em pH 4,6 (temperatura 25°C) as amostras foram centrifugadas (10.000g/15 min/25°C). A proteína foi determinada no sobrenadante (%N_{x6,38}).

2.6 - Ensaio biológico

Utilizaram-se camundongos isogênicos da linhagem A/J com sete semanas de idade, livres de patógenos específicos (SPF), fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP. O protocolo experimental foi certificado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP) por estar de acordo com os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Durante a duração dos testes, os animais foram alojados em grupos de 5 por gaiola e mantidos em isoladores.

Dietas: As dietas foram preparadas de acordo com o "American Institute of Nutrition" (AIN-93G), como descrita por REEVES et al. [21], contendo 20g de proteína/100g de dieta. Utilizou-se como fonte de proteína o CSL e seus hidrolisados.

2.7 - Avaliação da atividade imunomoduladora das dietas

2.7.1 - Estímulo à produção de anticorpos pelas células de baço

A atividade imunogênica das várias dietas foi avaliada pelo teste CFP (células formadoras de placas) no baço. O teste indica a capacidade de formação transitória de anticorpos (IgM), contra imunógenos das hemácias lavadas de carneiro e foi descrita por CUNNINGHAM & SZENBERG [13].

Inicialmente, os animais foram mantidos por 15 dias nas diferentes dietas, quando receberam a injeção de hemácias (10⁷ células) e depois de 7 dias foram sacrificados para a contagem de células que produziram a reação antígeno - anticorpo (CFP), a partir de uma suspensão de células de baço dos camundongos. Os resultados foram expressos em número de células de baço formadoras de placa (CFP).

2.7.2 - Determinação dos níveis de glutatona

Para análise dos níveis de glutatona no fígado, os órgãos foram coletados imediatamente após sacrifício dos animais, congelados, triturados e armazenados em nitrogênio líquido, até o momento da análise. A determinação da glutatona foi realizada por eletroforese capilar de alta resolução (HPCE), de acordo com a metodologia por

ERCAL et al. [15]. Amostras de aproximadamente 300mg de tecido foram inicialmente homogeneizadas em 1,2mL de água ultra-pura. A seguir, adicionou-se o mesmo volume de acetonitrila para precipitação dos compostos protéicos através de centrifugação (10.000g, 10 min, 4°C).

A corrida na HPCE foi realizada em tampão fosfato 10mM, pH 7,0. A coluna capilar de sílica fundida com 85cm de comprimento foi mantida à temperatura de 22°C. As amostras foram injetadas sob pressão de 50mbar pelo tempo de 5seg e a diferença de potencial aplicada foi de 20kV. A detecção dos componentes sulfurados (glutathiona oxidada e reduzida) foi feita em 214nm. Segundo ERCAL et al. [15], os resultados obtidos por esse método foram similares aos obtidos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

2.8 - Análise estatística

Os resultados experimentais submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey ao nível de significância de 5%. Utilizou-se o pacote estatístico Statistic (Basic Statistics and tables Program - Statsoft, 1995).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Solubilidade da ordem de 87% foi encontrada para as proteínas de CSL. O valor encontrado para a solubilidade foi superior ao citado por MORR & FOEGEDING [20], obtidos para concentrados protéicos de soro de leite obtidos pelo processo de ultrafiltração. Os autores encontraram 78% de solubilidade a pH 4,0. O acréscimo de solubilidade no CSL pode ser devido a menor desnaturação das proteínas, que reflete os cuidados durante o processamento, principalmente em relação à temperatura. BOUNOUS & GOLD [10] encontraram solubilidade acima de 95% para proteínas de soro ultrafiltradas.

TABELA 1 - Composição centesimal do concentrado protéico do soro de leite (CSL), dos hidrolisados de pancreatina (H_{Pa}), de protamex (H_{Pt}) e da alcalase 0,6 L (H_{Al}), todos ao nível de 20% de grau de hidrólise

Componente (% Base seca)	CSL	H _{Pa} (Pancreatina)	H _{Pt} (Protamex)	H _{Al} (Alcalase)
Proteína (N x 6,38)	82,72	74,34	73,66	73,75
Lipídios totais	6,24	5,87	5,73	5,73
Cinza	3,04	9,38	8,52	10,39
Lactose	6,64	5,94	5,82	5,85
Umidade	1,36	4,36	6,27	4,41
Sólidos totais	98,64	95,64	93,73	95,59

A Tabela 1 mostra a composição centesimal de CSL, comparativamente aos hidrolisados gerados pela pancreatina (H_{Pa}), pela protamex (H_{Pt}) e pela alcalase (H_{Al}), ao nível de 20% de grau de hidrólise.

Ao se comparar a composição dos hidrolisados com o CSL que lhes originou, pela ação de diferentes sistemas enzimáticos, conclui-se que as concentrações de água (umidade) e de cinzas são mais elevadas nos hidrolisa-

dos, explicado pela maior higroscopicidade dos hidrolisados em relação ao concentrado original. O teor de cinzas mais elevado resulta da metodologia utilizada, onde há necessidade de se acrescentar mineral (NaOH) para o controle do pH durante a reação enzimática que, ao gerar grupos carboxílicos tende a baixar o pH do meio de reação. Alguns autores utilizam o hidróxido de amônio para essa finalidade, evitando, desta forma, o inconveniente de adicionar sal ao produto [17].

O teor mais elevado de umidade e de cinzas nos hidrolisados faz com que a concentração de proteínas fique diminuída em relação ao concentrado original. Nota-se que o hidrolisado mais higroscópico foi o da enzima protamex.

Os perfis de aminoácidos do concentrado de soro de leite e seus hidrolisados são mostrados na *Tabela 2*. Pode-se verificar que as proteínas do soro de leite apresentam elevado conteúdo de aminoácidos de cadeia ramificada, particularmente leucina (Leu) e isoleucina (Ile), os quais estão relacionados com a construção de tecido muscular e regeneração de traumas múltiplos [4]. Outra característica importante das proteínas do CSL é o elevado conteúdo de aminoácidos sulfurados, os quais apresentam um balanço entre metionina e cisteína de aproximadamente 1:1 [8].

Comparando-se os valores de aminoácidos dos produtos de soro de leite, observa-se que nos hidrolisados ocorre uma grande perda de histidina (His). De modo geral, ocorreu uma ligeira redução dos níveis de aminoácidos nos hidrolisados em relação ao CSL. Contudo, a perda de sulfurados (metionina + cisteína) foi maior para o sistema enzimático Alcalase, que poderia estar relacionado às condições mais severas de pH e temperatura (50°C/pH 8,0) utilizados durante o processo de hidrólise da proteína.

Os dados da *Tabela 2* sugerem que o sistema enzimático pancreatina gera no hidrolisado uma concentração mais elevada de aminoácidos livres que as demais enzimas utilizadas. Isso, provavelmente, deve-se ao fato da pancreatina conter, além de endoproteases (tripsina, quimotripsina), as carboxipeptidases, que são exoproteases, responsáveis pela maior liberação de aminoácidos livres. Conseqüentemente, o hidrolisado de pancreatina apresenta maior conteúdo de grupos sulfidrilas livres, provavelmente devido à maior liberação de cisteína e peptídeos de baixo peso molecular contendo cisteína.

Na *Figura 1* pode-se observar que todos os teores de aminoácidos essenciais presentes no soro de leite e nos hidrolisados estão acima dos teores estabelecidos pela FAO/WHO para crianças até 5 anos de idade, exceto a histidina que para os hidrolisados se mostra ligeiramente limitante devido à perda ocorrida durante o processo de hidrólise.

Estímulo imunológico dos concentrados e hidrolisados enzimáticos

O estímulo imunológico das várias preparações foi es-

TABELA 2 - Perfis de aminoácidos no concentrado protéico de soro de leite (CSL) e hidrolisados com diferentes enzimas

Aminoácidos (g/100 g de prot)	CSL	Hidrolisados		
		H _{Pr}	H _{Pa}	H _{Al}
Asp	10,55	11,47	10,52	10,64
Thr	6,88	5,35	6,99	7,17
Ser	5,53	5,06	5,49	5,48
Glu	17,81	17,30	17,97	18,36
Pro	5,97	5,30	6,31	5,95
Gly	1,79	1,88	1,78	1,76
Ala	4,75	4,55	4,61	4,71
Val	5,42	4,42	5,48	5,07
Met + Cys	2,46	4,83	4,24	4,06
Ile	5,69	4,55	5,80	5,31
Leu	10,55	11,87	10,72	10,54
Tyr + Phe	3,14	7,18	6,31	6,21
Lys	9,97	10,11	9,06	9,82
His	5,54	1,95	1,62	1,63
Arg	1,56	2,23	1,81	1,86
AA livres	0,09	2,22	22,78	3,30

Os valores representam a média de duas determinações. *Trp (Triptofano) é destruído na hidrólise ácida da proteína; H_{Pr}= hidrolisado de CSL com Protamex; H_{Pa}= hidrolisado de CSL com Pancreatina; H_{Al}= hidrolisado de CSL com Alcalase. AA = aminoácidos

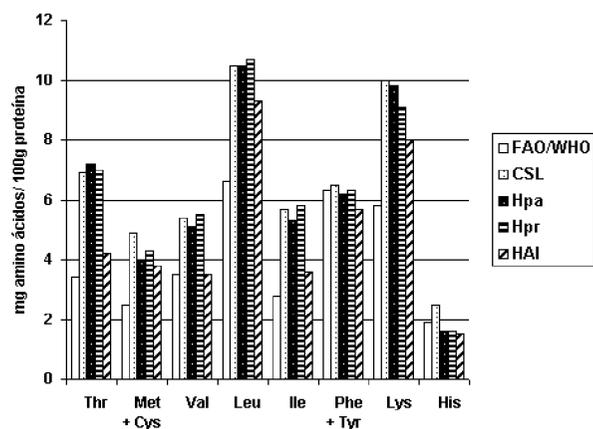


FIGURA 1 - Aminoácidos essenciais do concentrado de soro de leite (CSL) e seus hidrolisados com diferentes enzimas, em relação ao padrão da FAO/WHO [16]

tudado pelo estímulo à síntese tecidual de glutathiona (geralmente no fígado) e da formação de anticorpos (IgM) de camundongos imunizados com hemácias de carneiro.

Na *Tabela 3* são apresentados alguns dados de concentração de glutathiona no fígado e de contagem de células formadoras de placa (CFP) do baço em camundongos isogênicos A/J alimentados com o CSL e seus hidrolisados provenientes da ação hidrolítica de vários sistemas enzimáticos: pancreatina (H_{Pa}), protamex (H_{Pr}) e alcalase 0,6 L (H_{Al}), comparados com a caseína.

TABELA 3 - Valores de contagem de células formadoras de placa (CFP) em baço e concentrações de glutatona no fígado de camundongos isogênicos A/J, alimentados com concentrações e hidrolisados de proteínas de soro de leite e com caseína para comparação

Fonte de proteína	Nº CFP x 10 ⁻³ (*)	Glutatona (µmoles/g)**
CSL	69,03 ± 9,17 ^a	8,72 ± 0,37 ^a
H _{Pa}	65,30 ± 9,93 ^{ab}	8,71 ± 0,67 ^a
H _{Pr}	61,28 ± 4,92 ^b	8,45 ± 0,02 ^a
H _{Al}	52,13 ± 7,33 ^c	7,09 ± 0,65 ^b
Caseína	35,60 ± 3,92 ^d	4,66 ± 0,15 ^c

(*) Número de células de baço formadoras de placa (CFP); CSL = concentrado protéico de soro de leite; H_{Pa} = hidrolisado do CSL pela pancreatina; H_{Pr} = hidrolisado do CSL pelo sistema protamex; H_{Al} = hidrolisado do CSL pelo sistema Alcalase 0,6L; ** micromoles de glutatona por grama de fígado; ^{a, b, c, d} Letras diferentes (coluna) indicam resultados estatisticamente diferentes (p<0,05).

Observa-se que os valores para o CSL e o H_{Pr} não diferem estatisticamente, já o H_{Pr} não difere do H_{Pa}, mas sim do CSL. O hidrolisado H_{Al} (Alcalase 0,6L) e a caseína, apresentaram os menores valores de CFP, diferindo estatisticamente dos três produtos de proteínas do soro. A concentração de glutatona no fígado foi proporcional ao nº CFP e revela uma perfeita correlação positiva, como ilustra a *Figura 2*.

Quanto aos valores de CFP no baço, os animais que receberam o hidrolisado de pancreatina como fonte de proteína (20%), não diferiu estatisticamente do hidrolisado de Protamex e do CSL. Diferiu apenas do tratamento caseína e hidrolisado de alcalase. Alguns fatores podem ter influenciado a menor atividade imunomoduladora dos peptídeos derivados do tratamento com alcalase como, a temperatura utilizada durante a proteólise (50 °C), o pH elevado (8,0) assim como a seqüência dos resíduos de aminoácidos presentes nos fragmentos resultantes da lise. Outro fator é a especificidade da enzima, que ao clivar as ligações peptídicas em sítios específicos da proteína forma peptídeos que podem ter composição diferente dos demais e de bioatividade diferenciada.

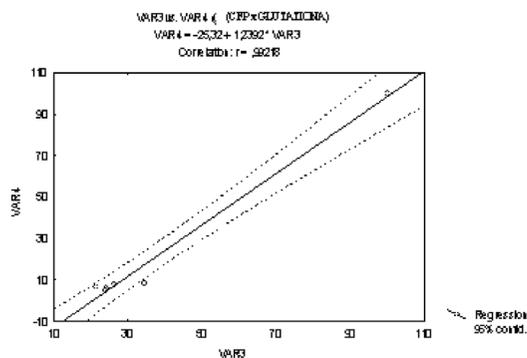


FIGURA 2 - Análise de correlação linear entre os resultados da contagem de CFP e dos níveis de glutatona para os diferentes tratamentos

4 - CONCLUSÕES

A análise dos dados permite algumas conclusões:

- o estímulo imunológico (CFP) produzido pelo CSL e o hidrolisado de pancreatina (H_{Pa}) não apresentou diferença estatística, seguidos pelo hidrolisado de protamex (H_{Pr}) que não difere estatisticamente do H_{Pa}, porém difere do CSL;
- o hidrolisado de alcalase apresentou resposta imunológica inferior (p<0,05) as demais preparações testadas;
- o tratamento com caseína produz estímulo imunológico inferior aos preparados de proteína de soro (CSL);
- a concentração de glutatona no fígado foi proporcional ao número de CFP e revela uma perfeita correlação (r=0,99218). Comparado à caseína, o concentrado de soro de leite (CSL) apresenta capacidade três a quatro vezes superior, quanto ao estímulo do sistema imunológico de camundongos isogênicos da linhagem A/J.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**, W. Horwitz (ed.), 15th edition, 1990, Washington, D.C.
- ACTON, G.H. The determination of lactose in cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, n.9, p.111-114, 1977.
- ALDER-NIELSEN, J. **Enzyme hydrolysis of food proteins**. Elsevier Applied Science Publishers, London, p.116-126, 1986.
- ALEXANDER, JW; GOTTSCHLISH, MM. Nutritional immunomodulation in burned patients. **Critical Care Medical**, v.18, p.S149-153, 1990.
- BLIGH, EG; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemical and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- BOIRIE, Y; DANGIN, M; GACHON, P; VASSON, MP; MAUBOIS, JL; BAUFRERE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Science (USA)**, v. 94, p.14930-14935, 1997.
- BORGES, PFZ; SGARBIERI, VC; JACOBUCCI, HB; PACHECO, MTB; BALDINI, VLS. Produção piloto de proteínas de soro de leite bovino: composição e valor nutricional. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.4, n1, p.1-8, 2001.
- BORÓ, L; GUADIX, EM; AUGUSTIN, OM; BOZA, JJ; GIL, A. Serum amino acid concentrations in growing rats fed intact protein versus enzymatic protein hydrolysate-based diets. **Biology of Neonate**, v.68, p.55-61, 1995.
- BOUNOUS, G; GERVAIS, F; AMER, V; BATIST, G; GOLD, P. The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and the diseases of aging. **Clinical and Investigative Medicine**, n.12, p.343-349, 1989.
- BOUNOUS, G; GOLD, P. The biological activity of unde-

- natured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, v.14, p.296-309, 1991.
- [11] BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. **Life Extension Report**. Life Extension Foundation, Chicago, n.1, p.21-28, 1996.
- [12] CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.254-262, 2000.
- [13] CUNNINGHAM, A; SZENBERG, A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. **Immunology**, v.14, p.599-600, 1968.
- [14] DONIEL, H; VOWINKEL, M; REHNER, G. Effect of casein and b-casomorphins on gastrointestinal motility in rats. **Journal of Nutrition**, v.120, p. 252-257, 1990.
- [15] ERCAL, N; LE, K; TREERATPHAN, P; MATHEWS, R. Analysis of Thiol Containing Compounds in Biological Samples by Capillary Zone Electrophoresis. **Biomedical Chromatography**, v.10, p.15-18, 1996.
- [16] FAO/WHO **Food and Agriculture Organization / World Health Organization**. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation, Maryland, USA, 1990.
- [17] FREITAS, O; PADOVAN, GJ; VILELA, L; SANTOS, JE; DUTRA DE OLIVEIRA, JE; GREENE, LJ. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.41, p.1432-1438, 1993.
- [18] GONZÁLES-TELLO, P; CAMACHO, F; JURADO, E; PÁEZ, MP; GUADIX, EM Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. **Biotechnology and Bioengineering**, v.44, p.523-528, 1994.
- [19] MAHMOUD, MI. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, v.48, p.89-113, 1994.
- [20] MORR, C. V.; FOEGEDING, E.A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates. A status report. **Food Technology**, v:44, p.100-112, 1990.
- [21] REEVES, PG; NIELSEN, FH; FAHEY JR., GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: report of the American Institute of Nutrition "ad hoc" Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.
- [22] TAYLOR, SL. **Allergic and sensitivity reactions to food components**. In: "Nutritional Toxicology", J.N. Hathcock (ed.), Vol. II, p.173-198, Academic Press, Orlando, 1987.

6 - AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio financeiro e bolsa de pós doutorado.