

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

ALINE ROSIGNOLI DA CONCEIÇÃO

**EFEITOS DO CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE ADICIONADO
DE CURCUMINA NO CONTROLE METABÓLICO, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A EXERCÍCIO EXAUSTIVO**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

ALINE ROSIGNOLI DA CONCEIÇÃO

**EFEITOS DO CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE ADICIONADO
DE CURCUMINA NO CONTROLE METABÓLICO, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A EXERCÍCIO EXAUSTIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientadora: Ceres Mattos Della Lucia

Coorientadores: Hercia Stampini Duarte Martino
Eliana Carla Gomes de Souza
Reggiani Vilela Gonçalves
Sérgio Luis Pinto da Matta
Antônio Jose Natali

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C744e
2020

Conceição, Aline Rosignoli da, 1995-

Efeitos do concentrado proteico de soro de leite adicionado de curcumina no controle metabólico, inflamação e estresse oxidativo em ratos Wistar submetidos a exercício exaustivo / Aline Rosignoli da Conceição. – Viçosa, MG, 2020.

83f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Ceres Mattos Della Lucia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Exercícios físicos. 2. Exercícios aeróbicos. 3. Natação.
4. Stress oxidativo. 5. Citocinas. 6. Inflamação. 7. Cúrcuma.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição.
II. Título.

CDD 22 ed. 613.71


ALINE ROSIGNOLI DA CONCEIÇÃO

**EFEITOS DO CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE ADICIONADO
DE CURCUMINA NO CONTROLE METABÓLICO, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A EXERCÍCIO EXAUSTIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Aline Rosignoli da Conceição
Autora



Ceres Mattos Della Lucia
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser meu guia e por ter me dado saúde, força, sabedoria e resiliência para alcançar mais esta conquista.

Aos meus pais, Elton e Rosimar, meu irmão Ricardo e a toda minha família pelo amor, incentivo, apoio incondicional e por acreditarem em todos os meus sonhos. Amo vocês!

A minha orientadora Prof.^a Ceres Mattos Della Lucia, exemplo de profissional e ser humano, por todo o carinho, paciência, disponibilidade, conselhos e por ter torcido por mim esse tempo todo, ansiando pelo meu sucesso. Você me inspira!

Aos meus coorientadores Prof.^a Hércia Stampini Duarte Martino, Prof.^a Eliana Carla Gomes de Souza, Prof.^a Reggiani Vilela Gonçalves, Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta e Prof. Antônio Jose Natali, além do Prof. Sérgio de Paula por terem aberto as portas dos seus laboratórios e por toda a ajuda científica para a concretização desse trabalho.

À técnica Renata Celi, pós-doutoranda Mariaurea Sarandy e ao pesquisador Roberto Dias por todo aprendizado, orientação e contribuições durante o experimento e análises.

À empresa Theravalues pela doação da curcumina (Theracurmin[®]) e ao Prof. Ítalo Tuller Perrone, pela produção do whey protein utilizado neste estudo.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Vitaminas e agregados, Lívy Oliveira, Luis Saraiva, Abigail Brandão, Soraia Pinheiro, Stephanie Michelin, Vinicius Brilhante, Andressa Bernardes e Kelly Dias, pela convivência, companheirismo compartilhado e por me ajudarem tanto. Sou eternamente grata!

À irmã de coração Lucimar Aguiar, pela amizade, por ser o meu braço direito, não medir esforços, estar sempre comigo e, principalmente, por ser minha dupla da vida!

Aos demais amigos de Ubá e Viçosa, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e por me fazerem acreditar que posso mais que imagino.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro a projetos e bolsas de pesquisa.

Ao Departamento de Nutrição de Saúde e à Universidade Federal de Viçosa, por proporcionaram dias de aprendizagem muito ricos e permitirem a realização deste trabalho.

Aos membros da banca, Dra. Hércia Stampini Duarte Martino, Dr. Antonio Jose Natali e Dra. Bárbara Pereira da Silva, pela disponibilidade e contribuições para o enriquecimento deste

estudo.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada!

Sem vocês, eu não conseguiria.

"Uma jornada de mil milhas começa com um único passo."

Lao Zi

RESUMO

CONCEIÇÃO, Aline Rosignoli da. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Efeitos do concentrado proteico de soro de leite adicionado de curcumina no controle metabólico, inflamação e estresse oxidativo em ratos Wistar submetidos a exercício exaustivo.** Orientadora: Ceres Mattos Della Lucia. Coorientadores: Hércia Stampini Duarte Martino, Eliana Carla Gomes de Souza, Reggiani Vilela Gonçalves, Sérgio Luis Pinto da Matta e Antônio Jose Natali.

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do concentrado proteico de soro de leite adicionado de curcumina no controle metabólico, inflamação e estresse oxidativo em ratos Wistar submetidos a exercício exaustivo. Foram utilizados 48 ratos machos que, ao completarem 12 semanas de vida, foram divididos em 6 grupos experimentais (n=8): Grupo dieta padrão (AIN-93M); grupo dieta padrão submetido a teste de exaustão; grupo whey protein concentrado adicionado de curcumina (WPC + CCM); grupo WPC + CCM submetido a teste de exaustão; grupo CCM e grupo CCM submetido a teste de exaustão. O teste de exaustão em natação foi realizado após 4 semanas de experimento. Durante o período do estudo, os animais tiveram seu peso aferido semanalmente, e, ao início e ao final do experimento, suas medidas biométricas também foram aferidas. Após a eutanásia, foram coletados o sangue e o fígado para avaliação de variáveis bioquímicas, inflamatórias, antioxidantes e histológicas. Foram determinadas também a concentração dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do produto, bem como sua composição centesimal. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. As comparações entre dois grupos foram realizadas por meio do teste t ou Mann Whitney, a depender da normalidade. As comparações entre todos os grupos foram realizadas pela análise de variância, ANOVA one way, seguida do teste post hoc de Tukey para os dados com distribuição paramétrica, enquanto que, para os dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Os dados foram analisados no software SPSS versão 20 e STATA versão 13, sendo adotado como nível de significância estatística $\alpha = 5\%$. O WP utilizado nesse estudo foi do tipo concentrado, apresentando teor proteico de quase 88%. A CCM apresentou elevada concentração de fenólicos totais e capacidade antioxidante. O consumo do WPC+CCM, bem como da CCM isolada, não alterou as medidas biométricas, o consumo alimentar dos animais e a função hepática, renal, bem como o balanço proteico dos animais, mas reduziu a glicemia e a expressão gênica de TNF- α e IL-6, além de aumentar a expressão de IL-10. Os animais que foram submetidos ao teste de exaustão (AIN-93 M TE) apresentaram maiores valores de AST quando comparados aos animais que não realizaram o exercício (AIN-93 M). O WPC+CCM

reduziu a concentração de óxido nítrico e proteína carbonilada, e aumentou a concentração de catalase. Ambos (WPC+CCM e CCM) foram capazes de aumentar as concentrações de superóxido dismutase. Todos os grupos apresentaram grau I de esteatose hepática e o grupo WPC+CCM TE apresentou menores áreas de infiltrado inflamatório em relação ao grupo AIN-93 M TE. Conclui-se que o WPC adicionado de CCM representa um produto seguro, viável e de eficácia comprovada. Ainda, representa uma estratégia capaz de diminuir a glicemia e os danos oxidativos e inflamatórios causados pelo exercício físico exaustivo em natação.

Palavras-chave: Exercício físico. Exercício aeróbico. Natação. Estresse oxidativo. Citocinas. Inflamação. Cúrcuma.

ABSTRACT

CONCEIÇÃO, Aline Rosignoli da. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Effects of whey protein concentrate admixed with curcumin on metabolic control, inflammation and oxidative stress in Wistar rats submitted to exhaustive exercise.** Advisor: Ceres Mattos Della Lucia. Co-advisors: Hércia Stampini Duarte Martino, Eliana Carla Gomes de Souza, Reggiani Vilela Gonçalves, Sérgio Luis Pinto da Matta and Antônio Jose Natali.

This work aimed to evaluate the effects of whey protein concentrate with curcumin on metabolic control, inflammation and oxidative stress in Wistar rats submitted to exhaustive exercise. A total of 48 male rats were divided into 6 experimental groups, which, after completing 12 weeks of life, were divided into 6 experimental groups (n = 8): standard diet group (AIN-93M); standard diet group subjected to exhaustion test; concentrated whey protein group added with curcumin (WPC + CCM); WPC + CCM group submitted to exhaust test; CCM group and CCM group submitted to exhaust test. The swimming exhaustion test was performed after 4 weeks of experiment. During the study period, the animals had their weight measured weekly, and, at the beginning and at the end of the experiment, their biometric measurements were also measured. After euthanasia, blood and liver were collected to assess biochemical, inflammatory, antioxidant and histological variables. The concentration of total phenolic compounds and antioxidant activity of the product were also determined, as well as their chemical composition. The normality of the data was assessed using the Shapiro-Wilk test. Comparisons between two groups were performed using the t-test or Mann Whitney, depending on normality. The comparisons between all groups were performed by analysis of variance, ANOVA one way, followed by Tukey's post hoc test for data with parametric distribution, whereas for non-parametric data, the Kruskal Wallis test was applied, complemented by Dunn's multiple comparisons test. Data were analyzed using SPSS version 20 and STATA version 13, with a level of statistical significance $\alpha = 5\%$. The WP used in this study was of the concentrated type, with a protein content of almost 88%. CCM showed a high concentration of total phenolics and antioxidant capacity. The consumption of WPC + CCM, as well as of isolated CCM, did not alter the biometric measurements, the animals' food consumption and the hepatic and renal function, as well as the protein balance of the animals, but reduced the glycemia and the gene expression of TNF- α and IL-6, in addition to increasing the expression of IL-10. The animals that were submitted to the exhaustion test (AIN-93 M TE) presented higher AST values when compared to the animals that did not perform the exercise (AIN-93 M). WPC + CCM reduced the concentration of nitric oxide and carbonylated protein, and increased the concentration of catalase. Both (WPC + CCM and CCM) were able to

increase the concentrations of superoxide dismutase. All groups had grade I hepatic steatosis and the WPC + CCM TE group had smaller areas of inflammatory infiltrate compared to the AIN-93 M TE group. It is concluded that the WPC added by CCM represents a safe, viable and proven efficacy product. Still, it represents a strategy capable of decreasing blood glucose and oxidative and inflammatory damage caused by exhaustive physical exercise in swimming.

Keywords: Physical exercise. Aerobic exercises. Swimming. Oxidative stress. Cytokines. Inflammation. Turmeric.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Variáveis a serem utilizadas para o cálculo amostral..... | 39 |
| Quadro 2. Sequências de primers para análise de qPCR..... | 44 |
| Figura 1. Desenho Experimental..... | 41 |
| Figura 2. Fenólicos totais (A) e capacidade antioxidante (B) do whey protein concentrado (WPC), curcumina (CCM) e whey protein concentrado adicionado de curcumina (WPC+CCM)..... | 49 |
| Figura 3. Níveis de expressão gênica de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (A), interleucina 6 (IL-6) (B) e interleucina 10 (IL-10) (C), no fígado de ratos sedentários que foram ou não submetidos a teste exaustivo em natação..... | 53 |
| Figura 4. Valores de malondialdeído (MDA) (A), proteína carbonilada (PCN) (B), óxido nítrico (NO) (C), catalase (CAT) (D), superóxido dismutase (SOD) (E) e glutathione S transferase (GST) (F) no fígado de ratos sedentários que foram ou não submetidos a um teste exaustivo em natação..... | 55 |
| Figura 5. Fotomicrografias do fígado de ratos sedentários que foram ou não submetidos a teste exaustivo em natação..... | 57 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Composição das dietas experimentais..... | 40 |
| Tabela 2. Composição centesimal do concentrado proteico de soro de leite..... | 48 |
| Tabela 3. Medidas biométricas e de consumo alimentar de ratos sedentários que foram ou não submetidos a teste exaustivo em natação..... | 50 |
| Tabela 4. Variáveis bioquímicas de ratos sedentários que foram ou não submetidos a teste exaustivo em natação..... | 52 |
| Tabela 5. Histomorfometria do fígado de ratos sedentários que foram ou não submetidos a teste exaustivo em natação..... | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Aminoácidos
ACMS - American College of Sports Medicine
ADA - American Dietetic Association
AGE - Equivalentes de Ácido Gálico por Grama de Amostra
ALT - Alanina Aminotransferase
ARR - Atividade de Retirada de Radical
AST - Aspartato Aminotransferase
BCAA - Aminoácidos de Cadeia Ramificada
BDMC - Bisdesmetoxicurcumina
BSA - Albumina do Soro Bovino
CAT - Catalase
CCM - Curcumina
CK - Creatina Quinase
CUR - Cúrcuma
DCV - Doença Cardiovascular
DHC - Di-Hidrocurcumina
DM2 - Diabetes Mellitus Tipo 2
DMC - Desmetoxicurcumina
DMTI - Dor Muscular de Início Tardio
EFSA - European Food Safety Authority
ERNS - Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs - Espécies Reativas De Oxigênio
FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA - Food and Drug Administration
gGCL - g-Glutamil Cisteína Ligase
GPx - Glutathione Peroxidase
GR - Glutathione Redutase
GSH - Glutathione

GST - Glutathione-S-Transferase
HHC - Hexa-Hidrocurcumina
IDA - Ingestão Diária Adequada
IL - Interleucina
IOM - Institute of Medicine
JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LDH - Lactato Desidrogenase
MB - Mioglobina
MPC-1 - Proteína Quimiostática de Monócitos-1
NF- κ B - Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
OHC - Octa-Hidrocurcumina
OMS - Organização Mundial de Saúde
RDA - Quota Dietética Recomendada
SM - Síndrome Metabólica
SOD - Superóxido Dismutase
TE - Animais Submetidos ao Teste de Exaustão
THC - Tetra-Hidrocurcumina
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa
UHT - Ultra-High Temperature
WP - Whey Protein
WPC - Whey Protein Concentrate
WPI - Whey Protein Isolate
A-LA - Alfa-Lactoalbumina
B-LG - Beta-Lactoglobulina

LISTA DE SÍMBOLOS

β - Beta

α - Alfa

® - Marca registrada

► - Glóbulos de gordura

→ - Infiltrado inflamatório

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1. Exercício Físico | 18 |
| 2.1.1. Aspectos gerais..... | 18 |
| 2.1.2. Formação de radicais livres..... | 20 |
| 2.1.3. Exercício exaustivo | 22 |
| 2.2. Cúrcuma..... | 23 |
| 2.2.1. Aspectos gerais..... | 23 |
| 2.2.2. Curcumina | 24 |
| 2.3. Whey protein..... | 29 |
| 2.3.1. Recomendação de proteína..... | 29 |
| 2.3.2. Composição do soro de leite | 30 |
| 2.3.3. Aspectos tecnológicos do Whey Protein | 32 |
| 2.3.4. Metabolismo do Whey Protein..... | 33 |
| 2.3.5. Capacidade antioxidante do Whey Protein | 34 |
| 3. OBJETIVOS | 35 |
| 3.1. Objetivo geral | 35 |
| 3.2. Objetivos específicos | 35 |
| 4. METODOLOGIA..... | 35 |
| 4.1. Produto teste | 35 |
| 4.1.1. Curcumina | 35 |
| 4.1.2. Desenvolvimento de um concentrado proteico de soro de leite (WPC) pelo método de secagem spray drying | 36 |
| 4.1.3. Concentrado proteico de soro de leite (WPC) adicionado de curcumina | 36 |
| 4.2. Determinação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do WPC, WPC adicionado de CCM e CCM..... | 37 |
| 4.2.1. Obtenção dos extratos | 37 |
| 4.2.2. Estimativa da concentração de fenólicos totais..... | 37 |
| 4.2.3. Determinação da atividade antioxidante | 38 |
| 4.3. Delineamento experimental | 38 |
| 4.3.1. Cálculo amostral..... | 38 |
| 4.3.2. Animais | 39 |
| 4.3.3. Dietas experimentais | 39 |
| 4.3.4. Desenho experimental..... | 41 |
| 4.3.5. Protocolo de exercício exaustivo..... | 42 |

| | |
|--|----|
| 4.3.6. Eutanásia e dissecação dos órgãos | 42 |
| 4.4. Medidas biométricas e de consumo alimentar | 43 |
| 4.5. Análises bioquímicas | 43 |
| 4.6. Expressão gênica..... | 43 |
| 4.6.1. Extração do RNA | 43 |
| 4.6.2. PCR quantitativo (qPCR) | 44 |
| 4.7. Análise de estresse oxidativo | 45 |
| 4.7.1. Obtenção do homogenato..... | 45 |
| 4.7.2. Atividade da superóxido dismutase..... | 45 |
| 4.7.3. Atividade da catalase..... | 45 |
| 4.7.4. Atividade da glutatona S-transferase | 45 |
| 4.7.5. Malondialdeído..... | 46 |
| 4.7.6. Óxido nítrico | 46 |
| 4.7.7. Proteína carbonilada..... | 46 |
| 4.8. Análises histológicas..... | 46 |
| 4.9. Análise estatística | 47 |
| 4.10. Aspectos Éticos..... | 48 |
| 5. RESULTADOS | 48 |
| 5.1. Composição centesimal do concentrado proteico de soro de leite | 48 |
| 5.2. Concentração dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do concentrado proteico de soro de leite, curcumina e concentrado proteico de soro de leite adicionado de curcumina..... | 48 |
| 5.3. Medidas biométricas e de consumo alimentar | 49 |
| 5.4. Variáveis bioquímicas..... | 51 |
| 5.5. Expressão gênica de TNF- α , IL-6 e IL-10 | 53 |
| 5.6. Estresse oxidativo | 54 |
| 5.7. Histologia..... | 56 |
| 6. DISCUSSÃO | 58 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 64 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 65 |
| 9. ANEXOS | 82 |
| 9.1. Anexo I – Composição centesimal da Theracurmin® | 82 |
| 9.2. Anexo II – Certificado de Aprovação no CEUA/UFV | 83 |

1. INTRODUÇÃO

A prática regular de atividades físicas associada a uma dieta balanceada pode ser importante fator na promoção da saúde. Todavia, a frequente realização de exercícios físicos de alta intensidade ou exaustivos pode aumentar a suscetibilidade a lesões hepáticas (HUANG et al., 2013) e renais (WU et al., 2012; LIN et al., 2013), promover a fadiga crônica e o overtraining, parcialmente em razão da elevada síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CRUZAT et al., 2007).

Esses compostos podem ter efeitos considerados positivos sobre o sistema imune e exercer funções metabólicas essenciais para a homeostasia celular a depender da quantidade a ser produzida (CRUZAT et al., 2007; STROBEL et al., 2011). Entretanto, quantidades excessivas podem estar envolvidas com o desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos, como danos ao DNA, das proteínas e dos lipídios celulares (GOLDFARB et al., 2011; CAPUTO et al., 2012).

O exercício é capaz de aumentar a utilização de oxigênio em 200 vezes acima dos níveis de repouso nos músculos ativos, podendo induzir ainda mais o estresse oxidativo (POWERS et al., 2011). Uma das formas de evitar tais danos é por meio do aumento da concentração de antioxidantes na dieta (PETERNELJ et al., 2011), visando à melhora da saúde e otimização dos benefícios do treinamento (SGARBIERI et al., 2004).

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada ao possível papel dos compostos bioativos na prevenção dos efeitos deletérios do dano oxidativo induzido pelo exercício (WAWRZYNIAK et al., 2013). Nesse contexto, destaca-se a cúrcuma (CUR) (Cúrcuma longa L.), cujo principal composto, denominado curcumina (CCM), passou a ser estudado no meio esportivo devido ao seu potencial antioxidante e anti-inflamatório (SETHI et al., 2015). Seu rizoma tem sido muito utilizado na indústria alimentícia, como corante, aromatizante e ingrediente culinário, tornando-se fácil sua incorporação em alimentos e bebidas (SILVA et al., 2004).

O whey protein (WP) também merece atenção, pois, além de estar presente em uma variedade de suplementos esportivos, vários benefícios têm sido relatados quanto à combinação de WP e exercício físico, visto que as proteínas lácteas apresentam elevado valor biológico e estão relacionadas ao aumento de força, hipertrofia muscular, estimulação da secreção de insulina, além de evitar a oxidação de proteínas musculares e manter baixos os níveis de lipídios peroxidados (PESCUMA et al., 2010; HARAGUCHI et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2016).

Tendo em vista que, cada vez mais, o consumidor tem se preocupado com sua alimentação e saúde, dando preferência a alimentos que possam trazer algum benefício adicional em relação aos produtos tradicionalmente comercializados, grande número de alimentos com características funcionais tem sido desenvolvido pela indústria (ZIEGLER et al., 2009; LOPES et al., 2009; MOREIRA et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2013). Até o presente momento, nenhum estudo avaliou o impacto da associação da CCM a um suplemento proteico de alto valor biológico, como o WP, no controle metabólico, inflamação e estresse oxidativo de ratos Wistar submetidos a um protocolo de exercício exaustivo. Uma vez verificada a eficácia do produto, o mesmo poderá ser considerado como uma alternativa de bebida a ser disponibilizada ao mercado.

Diante de tal cenário, o WP adicionado de CCM parece suprir as exigências dos consumidores, pois essa especiaria elevaria as características nutricionais do WP devido ao seu potencial antioxidante e nutricional (DROBNIC et al., 2014; SCIBERRAS et al., 2015). Ainda, os potenciais benefícios da CUR para a saúde, como seu bom perfil de segurança, facilidade de acesso e aquisição, além de não ser tóxica mesmo em altas doses, levaram ao interesse em incorporá-la em produtos alimentícios funcionais como ingrediente nutracêutico (ALAMDARI et al., 2009; ZOU et al., 2015).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Exercício Físico

2.1.1. Aspectos gerais

O músculo esquelético é um tecido integral do corpo que desempenha papéis fundamentais na força, no desempenho (tanto no esporte quanto nas atividades diárias) e na regulação metabólica. Conforme o indivíduo cresce, há aumento correspondente na massa muscular esquelética. No entanto, uma vez que o crescimento esteja completo, geralmente não há aumento líquido na massa muscular. Além disso, a partir da quarta década de vida, a massa muscular esquelética naturalmente começa a diminuir a uma taxa de aproximadamente 0,8% ao ano, um processo denominado sarcopenia (PADDON-JONES e RASMUSSEN 2009).

Dado o papel instrumental do músculo na locomoção, produção de força e regulação metabólica, a perda ou baixos níveis de massa muscular aumentam o risco de doenças crônicas, como síndrome metabólica (SM), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doença cardiovascular

(DCV), bem como quedas e diminuição da capacidade de realizar atividades da vida diária, contribuindo para a redução da qualidade de vida. Dessa forma, otimizar a massa muscular ao longo da vida para um ótimo desempenho e saúde, em geral, é de extrema importância (VELÁZQUEZ-ALVA et al., 2013; ALEXANDRE et al., 2014).

A massa muscular esquelética é o produto de processos contínuos e simultâneos de síntese e degradação muscular e é o equilíbrio entre esses dois processos que determina se a massa muscular aumenta (balanço proteico positivo), diminui (balanço proteico negativo), ou permanece constante. Em indivíduos saudáveis com faixa etária entre 20 e 40 anos, a síntese proteica muscular geralmente é igual à degradação proteica, de modo que a massa muscular não se altera. No entanto, quando a síntese proteica predomina, ocorre aumento na massa muscular, processo denominado hipertrofia muscular; enquanto que, quando a degradação proteica predomina, ocorre diminuição na massa muscular, denominada atrofia muscular (quando a imobilização está presente) ou sarcopenia (quando se trata de um processo relacionado à idade) (DEVRIES e PHILLIPS, 2015).

Ao longo do dia, as taxas de síntese e degradação proteica flutuam continuamente. Após o consumo de uma refeição contendo proteína, períodos de curta duração de hiperaminoacidemia estimulam a síntese e a hiperinsulinemia inibe a degradação proteica, resultando em balanço proteico líquido positivo. À medida que o tempo após uma refeição aumenta, as taxas de síntese diminuem e ocorre aumento da degradação, o que leva a um balanço de proteínas negativo até que uma refeição subsequente seja consumida. Em indivíduos saudáveis e em equilíbrio energético, esses períodos de balanço proteico positivo e negativo são iguais e a massa muscular permanece constante. No entanto, a proporção entre síntese e degradação proteica pode ser influenciada por vários fatores, incluindo déficit de energia, treinamento resistido e envelhecimento (DEVRIES e PHILLIPS, 2015).

É bem conhecido que o exercício resistido estimula tanto a síntese quanto a degradação proteica. Se o consumo proteico for adequado ao longo do dia, ocorre balanço positivo de proteína, resultando em hipertrofia muscular ao longo do tempo (CERMAK et al., 2012). Por outro lado, em períodos de déficit de energia (ARETA et al., 2014) e com o aumento da idade (PHILLIPS, 2009), as taxas de síntese proteica muscular e, conseqüentemente, o balanço proteico são negativos, resultando em perda de massa muscular.

No entanto, sabe-se que essa perda de massa muscular pode ser atenuada pelo consumo de uma dieta com maior concentração de proteína (GEIRSDOTTIR et al., 2013). Ademais, ao se tratar dos sintomas negativos associados ao dano muscular, nota-se que o balanço negativo

de proteína muscular não se torna positivo após o exercício se não for compensado pela disponibilidade de proteína. Consequentemente, a ingestão de proteína pode fornecer os AAs necessários para melhorar o equilíbrio proteico, o que é crucial para a reparação de proteínas estruturais danificadas (BROWN et al., 2017).

Além disso, sabe-se também que, durante qualquer treino, uma redução na função muscular prejudicará a qualidade e a intensidade, sendo potencialmente prejudicial para o atleta. O WP, sendo uma fonte de proteína de alta qualidade, rico em AA essenciais, conhecido por melhorar a síntese proteica muscular pós-exercício, tem o objetivo de acelerar a recuperação da função muscular, embora as evidências ainda não sejam tão claras (DAVIES et al., 2018).

2.1.2. Formação de radicais livres

O exercício não habitual, especialmente os de alta intensidade e/ou com grande número de contrações excêntricas, induz ao dano muscular. O dano muscular induzido por exercício excêntrico é identificado por reduções prolongadas na força muscular e amplitude de movimento, inchaço, dor muscular tardia e aumento de proteínas musculares no sangue. Sabe-se que danos musculares iniciam respostas inflamatórias, resultando em dano muscular secundário. O comprometimento da função muscular causado por danos e respostas inflamatórias subsequentes pode reduzir a capacidade de realizar atividades diárias e o desempenho atlético. Assim, é importante prevenir ou minimizar o dano muscular após o exercício, atenuando as respostas inflamatórias (TANABE et al., 2015).

Muitos tipos de suplementos estão disponíveis para melhorar o desempenho no exercício, atenuar a fadiga ou proporcionar uma recuperação eficiente após o exercício. Exercícios físicos de alta intensidade ou exaustivos afetam a homeostase do corpo, como o status redox e alteram as funções fisiológicas. Lesões musculares ou danos são causados por mecanismos físicos ou químicos. As EROs estão relacionadas com a fadiga do músculo esquelético por meio do rompimento da integridade da membrana celular causada pela peroxidação lipídica. O vazamento das células libera enzimas específicas do citosol ou proteínas, como creatina quinase (CK), mioglobina (Mb), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no sangue, indicando dano muscular. Outros biomarcadores, como lactato, amônia, ureia e glicose são amplamente usados para avaliar a fadiga (HUANG et al., 2015).

A geração de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) pelo exercício físico pode ser caracterizada como um fenômeno dose-resposta. O exercício de intensidade moderada produz baixos níveis de EROs e ERNs, o que, por sua vez, causa adaptação dos sistemas antioxidante e reparador. Em contraste, o exercício de alta intensidade pode acelerar a geração de EROs e ERNs, o que frequentemente excede a capacidade de defesa antioxidante e resulta em um estado de estresse oxidativo. Conseqüentemente, redução na força muscular, aumento de dor muscular e, até mesmo, danos musculares estruturais podem ocorrer (TEIXEIRA et al., 2016).

As EROs são representadas por radicais livres como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil (OH^{\cdot}), peroxil (ROO^{\cdot}), alcóxil (RO^{\cdot}) e moléculas não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio simpleto ($1/2 O_2$) e ozônio (O_3) (RAY et al., 2012).

Quanto aos produtos de oxidação decorrentes do estresse oxidativo, os mais estudados são o malondialdeído (MDA), proteína carbonilada (PCN) e óxido nítrico (NO), visto que se sabe que os lipídios e proteínas constituem a maior parte da massa das membranas biológicas (CATALÁ, 2009). Vários estudos relataram que a CCM inibe a eliminação de radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico de macrófagos ativados, reduzindo o complexo de ferro e inibindo a peroxidação lipídica (SAHIN et al., 2016).

Já por meio da ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), o organismo mantém a concentração de EROs dentro dos limites fisiológicos, formando o mecanismo antioxidante enzimático (RIBEIRO et al., 2005). A SOD converte enzimaticamente o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DROGE, 2002), enquanto a CAT é responsável pela decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 (AEBI, 1984).

Um estudo realizado por Sahin et al. (2016) teve como um dos seus objetivos investigar os efeitos da ingestão de CCM (100 mg/kg de CurcuWin[®]) sobre a capacidade antioxidante, por meio da avaliação de MDA, SOD, CAT, GPX e GSH, de ratos que foram ou não submetidos a um exercício em esteira durante 6 semanas. Dentre os resultados, destaca-se que a concentração de MDA muscular diminuiu 15,5% no grupo que realizou exercício, o tratamento com CCM reduziu a concentração sérica de MDA em 43,5% e os ratos exercitados apresentaram maior atividade muscular de SOD, GPx e GSH em relação aos controles.

Já Ren et al. (2017) avaliaram dezoito ratos Wistar machos que foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: o grupo dieta padrão+WPC, grupo dieta padrão+ WPC+soja e grupo controle. Durante o período experimental, todos os ratos realizaram o teste de natação

até a exaustão, cinco dias por semana, durante 7 semanas. Os animais do grupo WPC, que receberam 218,4 mg de WPC em 2 mL de água estéril/dia/rato por gavagem, apresentaram maior atividade da SOD em relação ao grupo controle. Além disso, as concentrações séricas de MDA foram significativamente mais baixas nos ratos do grupo dieta padrão+WPC+soja do que os do grupo controle.

O mecanismo que controla a expressão gênica da enzima antioxidante em diferentes tecidos, incluindo o músculo esquelético, envolve o Nrf2, que desempenha papel central na proteção celular contra o estresse oxidativo, por meio da ativação da transcrição na região promotora de genes antioxidantes (HYBERTSON et al., 2011; GOUNDER et al., 2012).

2.1.3. Exercício exaustivo

O exercício físico regular tem sido recomendado para reduzir o risco de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e câncer. No entanto, o exercício exaustivo é conhecido por provocar inflamação transitória, dano muscular, dor muscular de início tardio (DMIT) e até lesão hepática em ratos. Tais danos musculares e a DMIT podem resultar em perda de força muscular e dor significativa (HUANG et al., 2015).

Os atletas buscam equilibrar sua carga de treinamento com a recuperação para otimizar o desempenho enquanto previnem doenças. Em contraste com uma grande proporção da população geral, que realiza níveis baixos a moderados de atividade física e está em risco de inflamação crônica de baixo grau, os atletas podem ser suscetíveis a um estado inflamatório elevado. Isto é resultado de crises agudas e repetidas de exercícios extenuantes, que podem suprimir transitoriamente a função imunológica e aumentar o risco de infecção oportunista por vírus, bactérias e reativação viral. Tal condição pode comprometer a disponibilidade de treinamento e o desempenho (SHAW et al., 2017).

O exercício também está relacionado com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), dependendo da intensidade e duração (ZBINDEN-FONCEA et al., 2012). Embora o fígado não seja um órgão que demanda tanta energia quanto o músculo, ressalta-se que também é um órgão altamente exigente, o que faz com que a relação entre metabolismo energético, bioquímica redox e geração de ERO seja de suma importância (SUNAMI et al., 2012).

Esse órgão também demonstrou desempenhar um importante papel no estado inflamatório, visto que a produção exacerbada de ERO aumenta a secreção de marcadores

inflamatórios. O estresse oxidativo pode refletir um desequilíbrio na síntese protéica, aumento da produção de superóxido, diminuição da capacidade de tamponamento e/ou diminuição da atividade de importantes enzimas antioxidantes. Tais danos fazem com que a função mitocondrial seja prejudicada, e, portanto, diversas vias de sinalização relacionadas ao estresse são desencadeadas, resultando em lesão mitocondrial, inflamação e esteatose hepática. A formação de ERO mitocondrial, devido ao aumento do consumo de oxigênio durante exercícios intensos, é uma das principais causas de lesão hepática (PILLON BARCELOS et al., 2017). Estudos demonstraram que uma baixa capacidade aeróbica se traduz em um fenótipo hepático mais propenso às consequências de complicações metabólicas (ASCENSÃO et al., 2013; SANTOS-ALVES et al., 2014).

Portanto, considerando que o exercício físico exaustivo leva à produção de EROs, inflamação e catabolismo proteico e que várias proteínas do soro de leite e seus produtos metabólicos são antioxidantes, anti-inflamatórios e sequestrantes de radicais livres (bem como a CCM), é de se esperar que a ação conjunta do WPC + CCM seja altamente benéfica ao organismo humano e animal, antes, durante e após períodos de exercícios intensos e/ou prolongados, por meio da melhora de parâmetros bioquímicos e antioxidantes, redução dos parâmetros inflamatórios e preservação da função tecidual hepática.

2.2. Cúrcuma

2.2.1. Aspectos gerais

A cúrcuma (CUR), também conhecida como açafrão-da-terra, turmérico, açafrão-da-índia, açafrão e gengibre amarelo, da família Ginger (Zingiberaceae) é uma planta nativa do sudeste da Índia e tem sido usada há séculos na culinária e na medicina. O rizoma (raiz) dessa planta é a porção mais comumente utilizada (GAFFEY et al., 2015), visto que é um aditivo que dá sabor e cor para as preparações de alimentos, além de fazer parte da medicina tradicional e ser usada como remédio caseiro para várias doenças (MAITHILIKARPAGASELVI et al., 2016). Afirma-se que a CUR tem sido amplamente utilizada para tratamentos médicos de várias doenças há pelo menos 2.500 anos nos países asiáticos (KOCAADAM e ŞANLIER, 2017).

Ainda, é uma planta perene, herbácea e tuberosa com flores amarelas e folhas largas, que cresce em clima tropical (PRASAD et al., 2014; AKPOLAT et al., 2010). As condições geográficas da região onde ela cresce, bem como as características do solo podem afetar seu crescimento, sua composição nutricional e a qualidade dessa planta (HAYAKAWA et al., 2011; KOCAADAM e ŞANLIER, 2017).

A CUR contém carboidrato (69,4%), proteína (6,3%), gordura (5,1%), minerais (3,5%) e umidade (13,1%) (PRASAD et al., 2014). Além disso, contém pelo menos três polifenóis naturais denominados curcuminoides, sendo eles: curcumina (CCM; curcuminóide mais prevalente na cúrcuma, representando cerca de 77% do total de curcuminoides na planta), desmetoxicurcumina (DMC; constituindo cerca de 17% do total de curcuminoides) e a bisdesmetoxicurcumina (BDMC; aproximadamente 5%) (AGGARWAL et al., 2007 e GOEL et al., 2008). O DMC e o BDMC são análogos naturais da CCM e também apresentam atividade biológica (KOCAADAM e ŞANLIER, 2017).

Sabe-se que os polifenóis são compostos naturais que possuem uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático e que são encontrados em frutas, vegetais e grãos. Ainda, os polifenóis são uma classe de compostos com mais de 8.000 representantes, que atuam na pigmentação, crescimento, reprodução, resistência a patógenos, dentre outras funções das plantas. Esses compostos demonstraram ter efeito antioxidante e parece haver uma relação inversa, encontrada em estudos epidemiológicos, entre o consumo de dieta rica em polifenóis e a ocorrência de doenças crônicas (OLIVEIRA, 2002; MEYDANI e HASAN, 2010), visto que desempenham papéis significativos como eliminadores de radicais livres, doadores de hidrogênio, agentes redutores e inibidores de oxigênio. Portanto, para combater os riscos potenciais de dano oxidativo (nesse caso, causados pelo exercício físico exaustivo), o consumo alimentar de fenólicos pode ser considerado como uma linha de defesa contra tóxicos altamente reativos (AKTER et al., 2019).

2.2.2. Curcumina

A CCM é, sem dúvida, uma das moléculas com maior capacidade bioativa já descoberta (SAHEBKAR, 2014) sendo estudada há mais de três décadas (SAHIN et al., 2016). A CCM foi definida por Vogel e Pelletier, há cerca de 200 anos, como a "substância que dá a cor amarela". Em meados de 1900, foi declarado que, para ser um componente biologicamente ativo, era necessário ser antibacteriana e, portanto, a CCM se fez eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Trichophyton gypseum*. Em 1953, Srinivasan determinou a existência dos curcuminoides da cúrcuma por meio de cromatografia (DEOGADE e GHATE, 2015; PRASAD et al., 2014; PATIL et al., 2009).

A denotação química da CCM é 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, enquanto sua fórmula química é $C_{21}H_{20}O_6$ e a massa molecular absoluta é 368,37 (DEOGADE e GHATE, 2015; ESATBEYOGLU et al., 2012). A CCM não é solúvel em água, mas sim em acetona, metanol ou etanol (GOEL et al., 2008; JURENKA, 2009), além de ser sensível à luz (PRASAD et al., 2014).

2.2.2.1. Propriedades da curcumina

Com os estudos sobre a CCM, foi determinado que a estrutura química desta substância polifenólica apresenta propriedades antioxidantes equivalente às vitaminas C e E (ATAIE et al., 2010), e mais potentes do que as de outro polifenol bem estudado: o resveratrol (AFTAB e VIEIRA, 2010). Além disso, apresenta propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antiangiogênicas, antimutagênicas, antiagregantes, antiepilépticas, analgésicas e quimioterápicas (DEOGADE e GHATE, 2015; PRASAD et al., 2014; SHEHZAD et al., 2013; PATIL et al., 2009; SAMARGHANDIAN et al., 2017).

Devido a essas propriedades, a CCM tem um efeito protetor e tem sido utilizada devido a seus efeitos trombopressores, cardioprotetores, antiartríticos, hepatoprotetores, hipoglicêmicos, renoprotetores, neuroprotetores, antineoplásicos e antiproliferativos (MYTHRI e BHARATH, 2012; MERRELL et al., 2009), além do tratamento de tosse, febre, icterícia, feridas, eczema, inflamação nas articulações, doenças parasitárias da pele, resfriados e anemia (SYED et al., 2015).

Ainda, a CCM pode ter um efeito sobre a adiposidade e o metabolismo lipídico por meio de vários mecanismos, incluindo a modulação do metabolismo energético e da inflamação (BRADFORD, 2013 e PANZHINSKIY et al., 2014).

A base molecular das propriedades anti-inflamatórias da CCM está ligada aos seus efeitos em vários alvos, incluindo fatores de transcrição, reguladores de crescimento e moléculas de sinalização celular. A CCM é relatada por influenciar diretamente a atividade de vários reguladores inflamatórios (DAVIS et al., 2007).

Danos musculares com a produção de EROs em resposta a exercícios inatos podem levar ao aumento da produção de citocinas inflamatórias, à dor e a déficits de desempenho muscular (LANIER, 2003).

A CCM tem um papel na supressão da inflamação aguda e crônica, ao bloquear a formação de enzima, como a COX-2, envolvida na inflamação. Além disso, sua suplementação está associada a níveis plasmáticos reduzidos de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α),

interleucina-6 (IL-6) e proteína quimioestática de monócitos-1 (MCP-1) (RAHMANI et al., 2018).

A inibição da atividade do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) também é de particular interesse para o uso potencial da CCM no tratamento da perda de massa muscular, uma vez que a ativação do NF- κ B é um mecanismo importante para tal perda (ONO et al., 2015). Outros mecanismos pelos quais a CCM pode exercer efeitos anti-inflamatórios incluem inibição da atividade da p38 quinase e formação de EROs, além da prevenção da produção e/ou liberação de outras citocinas (ALAMDARI et al., 2009). Em outro achado, a atividade antioxidante da CCM foi estabelecida pela inibição da iniciação controlada da oxidação do estireno, visto que a CCM é um antioxidante fenólico clássico, doando átomos de H⁺ dos grupos fenólicos (BARCLAY et al., 2000). Esta substância afeta as espécies reativas, capturando os radicais superóxido, peroxinitrito, óxido nítrico, radicais peroxila e hidroxila. Ainda, a CUR é capaz de induzir indiretamente a expressão de proteínas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), glutaciona-S-transferase (GST) e g-glutamil cisteína ligase (gGCL) (SAMARGHANDIAN et al., 2017 e HU, 2018).

A atividade sequestradora de EROs da CCM pode surgir tanto dos grupos OH fenólicos como do grupo CH₂ da porção β -dicetona. Especificamente, os grupos OH fenólicos da CCM são essenciais para a atividade de eliminação de ERO e a presença dos grupos metoxi aumenta ainda mais essa atividade, sendo provavelmente um dos mecanismos por meio dos quais a administração de CUR protege as células do dano oxidativo (TAKAHASHI et al., 2014).

2.2.2.2. Metabólitos da curcumina

Existem muitos metabólitos da CCM, como a di-hidrocurcumina (DHC), tetra-hidrocurcumina (THC), hexa-hidrocurcumina (HHC), octa-hidrocurcumina (OHC), glicuronídeo de curcumina e sulfato de curcumina (PRASAD et al., 2014). A CUR é metabolizada para formar o THC e HHC, juntamente com uma pequena quantidade de ácido di-hidroferulico em ratos (HOLDER et al., 1978). Embora muitos metabólitos fossem considerados inativos, muitas pesquisas sugerem que alguns desses possuem atividades biológicas importantes (WANG et al., 2018), como, por exemplo, o THC, o HHC e o OHC, que apresentam efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anticancerígenos e antiplaquetários (KOCAADAM e ŞANLIER, 2017).

A distribuição tecidual da CCM foi estudada em camundongos e ratos. A mesma pode ser encontrada na mucosa intestinal, no fígado, no rim e no coração após administração oral em ratos (PAN et al., 1999). No entanto, há muito pouco conhecimento sobre a farmacocinética e a distribuição tecidual de seus principais metabólitos (WANG et al., 2018).

2.2.2.3. Doses de ingestão de curcumina

Segurança, ingredientes ativos, interações e dosagem de medicamentos são altamente importantes no tratamento de doenças. Por esses motivos, pelo fato da CCM ser um produto natural seguro e por seu custo ser menor do que o dos medicamentos, pode-se supor que a CCM pode ser usada no tratamento e, ou prevenção de doenças (KOCAADAM e ŞANLIER, 2017).

Entretanto, a CCM ainda não apresenta potencial terapêutico completo. Isso tem sido em parte devido a preocupações com relação ao controle de qualidade (pureza e outros atributos químicos) e baixa biodisponibilidade oral. Contudo, várias formulações novas e bem caracterizadas (mais biodisponíveis) ajudaram a facilitar seu estudo crescente e a emergir o uso complementar na medicina ocidental (HU et al., 2018).

A raiz de CUR é relativamente fácil de cultivar em áreas temperadas e tropicais e, tendo em vista que tolera uma variedade de tipos de solo, poderia representar um material acessível e de baixo custo para uso por pessoas com acesso limitado a produtos farmacêuticos. Além disso, como a ingestão de CUR é tolerada em altas doses (ANAND et al., 2007; ARBER et al., 2008; NGUYEN e FRIEDMAN, 2013), apresenta baixa toxicidade (EPSTEIN et al., 2010 e KIZHAKKEDATH, 2013) e é rotineiramente consumida como parte normal das dietas de muitas pessoas, seu potencial de utilidade é aumentado por não exigir supervisão intensiva por profissionais de saúde (GAFFEY, 2015).

A CCM é um composto "reconhecido como seguro" pelo FDA (Food and Drug Administration), e é indicada para consumo por não ter qualquer efeito tóxico. De acordo com os relatórios Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), a própria Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e o European Food Safety Authority (EFSA), o valor da IDA (Ingestão Diária Adequada) de curcumina é de 0-3 mg/kg (JECFA, 2004; FAO, 2004; EFSA, 2014).

Em uma minoria de pacientes, efeitos colaterais como náusea, diarreia, cefaleia, sonolência e dermatite de contato (com uso tópico) foram relatados. Considerando o custo relativamente baixo e o perfil de segurança favorável da CCM, um impacto terapêutico nas

doenças com esse agente, mesmo que necessite de tratamento em longo prazo ou como adjuvante, representa uma perspectiva estimulante (HU et al., 2018).

Uma toxicidade mínima de doses de até 8.000 mg tem sido descrita em humanos (ZANDI et al., 2010 e MOGHADAMTOUSI et al., 2014) e até o momento, nenhuma dose máxima tolerada foi definida (RAHMANI, 2018). Estudos de toxicidade mostraram que o composto é bastante seguro, mesmo em altas doses (até 12 g em humanos) (WAHLSTRÖM e BLENNOW, 1978; ANAND et al., 2007; SALEM et al., 2017 e LAO et al., 2006), embora esteja associada a mau gosto e odor (LAO et al., 2006 e ANAND et al., 2007).

2.2.2.4. Biodisponibilidade da curcumina

Devido a sua absorção insuficiente pelo corpo, alta velocidade de metabolismo e alta eliminação, a CCM tem uma biodisponibilidade limitada no organismo, o que reduz os efeitos terapêuticos desse componente (DEVASSY et al., 2015 e GAFFEY et al., 2015). Esta situação deve-se a sua fraca estabilidade (altamente instável ao pH intestinal: meia vida em pH 7 <10 min) (CHUN et al., 2003) e a sua baixa absorção oral semelhante à maioria dos fenólicos dietéticos, visto que a CCM é lipossolúvel (CAI et al., 2013 e JÄGER et al., 2014). Por isso, é necessário o desenvolvimento de formulações com aumento da solubilização e resistência à inativação por hidrólise (SCHAFFER et al., 2015; GHOSH et al., 2015 e HE et al., 2015).

Assim, sua biodisponibilidade pode ser melhorada de algumas maneiras, incluindo aquecimento e combinação com adjuvantes, como a piperina, que é encontrada na pimenta preta e age inibindo a glucuronidação (agindo sobre a principal enzima metabólica, a glucuronidase, que é responsável pela rápida degradação da CCM no fígado e no intestino) (AGGARWAL e HARIKUMAR, 2009; JAYAPRAKASHA et al., 2016) e complexação de CCM em fitossomos (DULBECCO e SAVARINO, 2013 e DI PIERRO FRANCESCO et al., 2013) e complexos com transportadores, como a albumina do soro bovino, albumina sérica humana, b-lactoglobulina, imunoglobulina ou quitosana (LI et al., 2015), que também melhoram a biodisponibilidade via aumento da absorção do polifenol, conforme demonstrado em estudos de caracterização.

Ainda, há as preparações de CCM em nanopartículas, em que o tamanho das partículas é mantido abaixo de 100 nm em uma suspensão ou gel, e que mostraram ter aumentado a biodisponibilidade em nove vezes em comparação com a CMM-piperina, tanto em modelo animal quanto em humanos (NEHRA et al., 2016; RAY et al., 2016 e MANTZOROU et al., 2018). As nanopartículas são hidrofílicas no exterior e hidrofóbicas no interior (SINGH, 2007),

o que permite que a nanocurcumina seja solúvel em água, possibilitando que as partículas entrem na corrente sanguínea e liberem a curcumina (ALAMDARI et al., 2009).

2.3. Concentrado proteico de soro de leite

2.3.1. Recomendação de proteína

Os efeitos metabólicos da proteína da dieta no balanço de nitrogênio são bem descritos, já que o aumento da ingestão desse macronutriente geralmente aumenta a retenção de nitrogênio. Além disso, a ingestão de uma dieta hiperproteica quando comparada a uma ingestão tradicional de proteína dietética parece otimizar a síntese proteica muscular em 24 horas, o que, teoricamente, pode facilitar a manutenção ou aumento da massa muscular. Esses achados são particularmente importantes para indivíduos suscetíveis à perda muscular. O consumo de dietas ricas em proteínas também poupa a massa corporal magra durante a perda de peso, uma vantagem independente da massa corporal (PASIAKOS, 2015). Evidências também sugerem que tais dietas podem melhorar a regulação glicêmica em situações de déficit calórico (SMITH et al., 2011), enquanto outros estudos mostraram que o consumo de dietas com maior proteína aumenta a secreção de fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) (um dos principais mediadores da saúde óssea), a absorção intestinal de cálcio, suprime o hormônio da paratireóide e melhora a força e a massa muscular, o que pode resultar em melhorias de longo prazo na saúde óssea (MANGANO et al., 2014; TANG et al., 2014).

A qualidade da proteína na dieta é talvez tão importante para a saúde dos músculos e ossos quanto para a regulação glicêmica. A qualidade reflete as taxas de digestão e absorção, e o conteúdo de aminoácidos (AA) indispensáveis de uma determinada proteína. As proteínas animais são consideradas de alta qualidade porque contêm altos níveis de todos os AA indispensáveis, particularmente a leucina, um aminoácido de cadeia ramificada (BCAA), considerado um regulador independente da síntese proteica muscular. As proteínas lácteas são a proteína de mais alta qualidade com base na sua classificação de AA indispensáveis, que reflete a digestibilidade e absorção ileal de um AA. Além disso, as propriedades digestivas e absorptivas do soro e da caseína, proteínas constituintes dos alimentos lácteos, provocam uma entrega rápida, robusta e sustentada desses AA aos tecidos periféricos que podem melhorar a retenção de proteína muscular, regulação glicêmica e saúde óssea em longo prazo (PASIAKOS, 2015).

Além dos aspectos nutricionais, as proteínas do soro de leite possuem funções tecnológicas, que permitem sua ampla aplicação em alimentos e bebidas, melhorando propriedades como solubilidade, gelatinização, formação de espuma, tamponamento e emulsificação (JERVIS et al., 2012).

Essas proteínas são importantes também devido a sua ação biológica, por liberarem no organismo, durante o processo digestivo ou tratamento enzimático, peptídeos bioativos, com diversos efeitos benéficos para a saúde. Dentre as propriedades funcionais desses peptídeos, podem-se citar as ações anti-hipertensiva, hipocolesterolêmica, imunomoduladora, antioxidante, inibidora do apetite e redutora de gordura corporal (BATISTA et al., 2015).

Para evitar a perda muscular, o Institute of Medicine (IOM) estabeleceu uma quota dietética recomendada (RDA) para proteínas de 0,8 g/kg/dia. A RDA para proteína é considerada o nível de proteína de alta qualidade necessário para quase 98% dos adultos americanos saudáveis manterem o equilíbrio de nitrogênio (NAS, 2005). Recomendações de proteína para os americanos são semelhantes às recomendações dietéticas internacionais de proteína (0,83 g/kg/dia) estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011). No entanto, um aumento na ingestão proteica pode ser metabolicamente vantajoso, principalmente em indivíduos fisicamente ativos, como atletas e militares, durante períodos de maior demanda metabólica (PHILLIPS, 2014; MOORE et al., 2014; MURPHY et al., 2015).

Como os atletas apresentam necessidade aumentada de nutrientes, a American Dietetic Association (ADA) e o American College of Sports Medicine (ACSM) recomendam uma faixa de ingestão de 1,2 a 2 g/kg/dia. Estas recomendações não se baseiam apenas no balanço de nitrogênio líquido, mas também buscam promover a massa muscular e melhorar o desempenho (PHILLIPS e VAN LOON, 2011; PHILLIPS et al., 2016). Estudos mostram que a ingestão de suplementos proteicos aumenta a massa muscular e melhora o desempenho esportivo em treinamentos de resistência (PASIAKOS et al., 2015; MORTON et al., 2017), fornecendo contexto para sua popularidade.

2.3.2. Composição do soro de leite

O leite, produto da secreção das glândulas mamárias, é um fluido viscoso constituído de uma fase líquida e partículas em suspensão, formando uma emulsão natural, estável em condições normais de temperatura ou de refrigeração. Possui elevado valor nutritivo, sendo o

único alimento que satisfaz às necessidades nutricionais e metabólicas do recém-nascido de cada espécie (SGARBIERI, 2004).

Os macrocomponentes do leite bovino são: água (87,30%), lactose (4,90%), gordura (3,80%), proteínas (3,30%) e vitaminas/minerais (0,72%). As partículas suspensas na fase líquida do leite são gotículas de gordura e micelas de caseína. O leite bovino é comercializado em sua forma líquida, integral ou desengordurada, e pasteurizado ou esterilizado. Essas mesmas formas são também comercializadas desidratadas, que é o leite em pó (SGARBIERI, 2004).

O soro de leite pode ser obtido em laboratório ou na indústria por três processos principais: a) processo de coagulação enzimática (enzima quimosina), resultando no coágulo de caseínas, matéria-prima para a produção de queijos e no soro “doce”; b) precipitação ácida no pH isoelétrico (pI), resultando na caseína isoelétrica, que é transformada em caseinatos e no soro ácido; c) separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado proteico (BORGES et al., 2001).

O componente proteico do soro fornece uma fonte proteica completa e é rico em AA contendo enxofre (1,7%) e em AA de cadeia ramificada (26%). É composto por beta-lactoglobulina (β -LG: 50-60%), alfa-lactoalbumina (α -LA: 15-25%), albumina do soro bovino (BSA: 6%), lactoferrina (<3%) e imunoglobulinas (<10%) (CORROCHANO et al., 2018).

As principais proteínas do soro, que são mais importantes para as propriedades funcionais na maioria das aplicações alimentares, são β -LG e α -LA. O tratamento térmico influencia as propriedades funcionais das proteínas do soro ou os tamanhos de seus agregados. Em aproximadamente 67,5 a 78°C, a β -LG começa a se desdobrar, e em temperaturas mais altas de 78 a 82,5°C ocorre agregação. A α -LA contribui menos para a agregação causada pela desnaturação. A relação caseínas: proteínas do soro é bastante variável entre as espécies de mamíferos. Esta relação é de 80:20 (%) no leite bovino e de búfala, de 20:80 (%) no leite humano e 82,2:15,8 (%) no leite de cabra. Observa-se que no leite humano a proporção de proteínas de soro é 4 vezes a das caseínas, comparadas com as do leite de vaca e de búfala (SVANBORG et al., 2015).

Além disso, sequências peptídicas especiais das proteínas do soro de leite têm demonstrado diversos benefícios fisiológicos. Tais sequências peptídicas bioativas geralmente consistem em 2 - 20 resíduos de aminoácidos e podem ser liberados in vivo por meio da digestão gastrointestinal (MADADLOU e ABBASPOURRAD, 2018).

Pimenta et al. (2006) demonstraram que uma solução de proteína de soro de leite parcialmente lisada proporcionou melhor desempenho físico, diminuição dos níveis de lactato sanguíneo imediatamente após a exaustão, aumento das concentrações de albumina sérica, reservatórios de glicogênio muscular e proteína do músculo total em comparação com a solução de proteína intacta em ratos jovens.

2.3.3. Aspectos tecnológicos do concentrado proteico de soro de leite

As principais proteínas do leite são a caseína (cerca de 80% do teor de proteína) e as proteínas do soro de leite (cerca de 20% do teor de proteína). O WP é um “subproduto” da produção de queijo (ou pode ser especificamente isolado por meio de uma filtração de leite) e sua proteína é um dos suplementos mais utilizados por atletas e consumidores de produtos de nutrição esportiva para apoiar a hipertrofia muscular e melhorar a composição corporal (DEVRIES e PHILLIPS, 2015).

O WP é uma fonte importante de AA essenciais, dos quais os BCAAs estão associados à estimulação da síntese proteica do músculo esquelético. Em relação à composição de AA, o soro é semelhante às proteínas musculares. Normalmente, o soro apresenta os mais altos níveis de BCAA, bem como a maior concentração de AA em geral (WRÓBLEWSKA et al., 2018).

Nos últimos anos, diversos ingredientes derivados do soro de leite estão sendo incorporados em alimentos e bebidas, contribuindo para sua reutilização, tais como o soro de leite em pó, com concentração de proteína de 11 a 14,5%; o concentrado proteico de soro de leite (WPC – Whey Protein Concentrate), com teor proteico de 35 a 89%; e a proteína isolada de soro de leite (WPI – Whey Protein Isolate), que contém, no mínimo, 90% de proteína em sua composição (JERVIS et al., 2012 e BRANS et al., 2004).

Tanto o WPC quanto o WPI, tendo alto valor nutricional e propriedades funcionais únicas, que podem ser incorporados a bebidas esportivas, bebidas substitutas de refeições e fórmulas infantis. As bebidas proteicas podem ser formuladas em diferentes níveis de acidez, incluindo o neutro (pH 6–7), levemente ácido (pH 4-5) ou altamente ácido (pH <3,5). A proteína do soro é menos solúvel em seu ponto isoelétrico (pH 5,2) e a solubilidade aumenta com a diminuição do pH (PELEGRINE e GASPARETTO, 2005), tornando o WPC e o WPI ideais para bebidas ácidas. As bebidas de proteína de soro de pH baixo têm maior clareza e passam por um processo de pasteurização térmica mais suave (PARK et al., 2014).

Entre os tratamentos térmicos mais utilizados pelas indústrias para conservação do leite encontram-se o tratamento por ultra-high temperature (UHT) e a pasteurização. Entretanto, tais processos estão relacionados a alterações indesejáveis no produto em relação às propriedades físico-químicas e sensoriais. A fim de solucionar estes problemas, a indústria de laticínios tem buscado novas tecnologias para obter um leite com maior vida de prateleira e melhor qualidade nutricional e sensorial. Neste contexto, a tecnologia de microfiltração oferece uma alternativa interessante ao tratamento térmico do leite, visto que possibilita a obtenção de um produto com baixa carga microbiana, além de preservar seus constituintes naturais, gerando um produto com vida de prateleira estendida e com alta qualidade. Nessa técnica, a força-motriz responsável pela separação é o gradiente de pressão que se forma através de uma membrana. O processo utiliza membranas com poros na faixa entre 0,1 e 10 μm , sendo, portanto, indicado para a retenção de materiais em suspensão e emulsão (SUDA, 2011).

2.3.4. Metabolismo do concentrado proteico de soro de leite

Após a ingestão, a proteína do soro é rapidamente digerida e, uma vez que é solúvel em ácido, deixa o estômago rapidamente, resultando em aumento pronunciado de AA no sangue, que é considerado crítico para a estimulação da síntese de proteína muscular. Em comparação com outras proteínas suplementares, as proteínas do soro são consideradas proteínas “rápidas”, enquanto a caseína é considerada uma proteína “lenta”, uma vez que coagula devido ao pH ácido do estômago (DEVRIES e PHILLIPS, 2015).

Além de ser de fácil digestão, o WP também promove pico mais elevado de AA circulantes, como a leucina, que é um AA chave para a ativação da síntese proteica muscular (DEVRIES e PHILLIPS, 2015). Supõe-se que uma quantidade maior de leucina resulta em uma maior taxa de síntese proteica quando associada a um estímulo de treinamento (NABUCO et al., 2018) por meio do aumento e prolongação da resposta de sinalização da mTORC (mammalian target of rapamycin), que é um complexo enzimático que integra sinais do status energético da célula e estímulos ambientais (fatores de crescimento, sinais mitocondriais e exercício) para controlar a quebra e a síntese de proteínas (GUILLET et al., 2004; ANTHONY et al., 2000; DEVRIES e PHILLIPS, 2015).

2.3.5. Capacidade antioxidante do concentrado proteico de soro de leite

Dentro de cada célula do corpo, processos metabólicos geram radicais livres, e sistemas antioxidantes estão no local para desarmá-los efetivamente. No entanto, este equilíbrio homeostático pode ser alterado devido ao excesso de produção de EROs e ERNs, depleção de antioxidantes, ou ambos. Quando os controles falham, as células são expostas a altos níveis de radicais livres. O estresse oxidativo leva à lesão celular, com peroxidação lipídica e proteica, quebra de fita de DNA, racemização ou descarboxilação de AA, disfunção enzimática e degradação oxidativa de carboidratos. Tais modificações são consideradas agentes causadores de distúrbios neurodegenerativos, câncer, lesão hepática, envelhecimento, fibrose cística, pancreatite crônica e doença cardiovascular. As células protegem-se do dano oxidativo por meio da prevenção, reparo ou produção e/ou absorção de antioxidantes na dieta ou seus precursores. Os antioxidantes endógenos incluem as enzimas intracelulares SOD, glutathiona (GSH), GPx e CAT (CORROCHANO et al., 2018). Já os antioxidantes dietéticos bem documentados incluem ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), polifenóis e carotenoides (FIEDOR e BURDA, 2014).

Recentemente, as proteínas lácteas obtidas a partir do soro do leite têm recebido considerável atenção por sua bioatividade antioxidante (BAYRAM et al., 2008; HARAGUCHI et al., 2011; ZHANG et al., 2012). O consumo de 150 g de WP/1000 g de dieta preveniu a oxidação das proteínas musculares e manteve baixos os níveis de lipídios peroxidados em ratos exercitados por oito semanas. O treinamento físico consistiu em induzir os animais a realizar saltos (HARAGUCHI et al., 2011).

O principal mecanismo pelo qual o WP exerce suas propriedades antioxidantes é baseado em sua capacidade de aumentar os níveis de GSH, visto que as proteínas do soro de leite são ricas em cisteína e a síntese de GSH é limitada pela disponibilidade desse aminoácido (MCPHERSON e HARDY, 2011; SHEIKHOLESAMI e AHMADI, 2012); CAT, GPx e SOD, mas também por estimular a via de sinalização molecular do Nrf2, sendo este um fator de transcrição nuclear que controla a expressão e a indução coordenada de uma bateria de genes defensivos que codificam enzimas desintoxicantes e proteínas antioxidantes. Este é um mecanismo de importância crítica para a proteção e sobrevivência celular (XU et al., 2011).

Ressalta-se que vários peptídeos sintéticos derivados de β -LG e α -LA e AA livres liberados durante a hidrólise também demonstram atividade antioxidante. Entretanto, a potência antioxidante dos produtos de soro é menor do que os antioxidantes vegetais conhecidos, embora

o WP possa ser adicionado aos alimentos em concentrações muito mais altas. Futuros estudos devem se concentrar no efeito sinérgico ou antagonista de novas combinações de produtos de soro de leite com outros antioxidantes conhecidos (CORROCHANO et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do concentrado proteico de soro de leite adicionado de curcumina no controle metabólico, inflamação e estresse oxidativo em ratos Wistar submetidos a exercício exaustivo.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um concentrado proteico de soro de leite adicionado de curcumina;
- Determinar a concentração dos compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante do WPC, WPC adicionado de CCM e da CCM bem como sua composição centesimal;
- Avaliar as medidas biométricas e de consumo alimentar dos animais;
- Avaliar a função hepática, renal e o balanço proteico dos animais;
- Analisar a expressão gênica de TNF- α , IL-6 e IL-10 no fígado dos animais;
- Avaliar o estresse oxidativo no fígado por meio da quantificação dos produtos da oxidação (malondialdeído, óxido nítrico e proteína carbonilada), e por meio da atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione-S-transferase);
- Avaliar as áreas de depósitos de gordura e infiltrado inflamatório no fígado dos animais.

4. METODOLOGIA

Esse trabalho é continuação de uma dissertação de mestrado intitulada: “Concentrado proteico de soro de leite adicionado de extrato de cúrcuma desenvolvido por secagem em leito de espuma e spray drying: aspectos nutricionais e tecnológicos”.

4.1. Produto teste

4.1.1. Curcumina

Os animais receberam CCM (Theracurmin[®]; Theravalues, Tóquio, Japão) altamente absorvível e dispersa em nanopartículas coloidais. A Theracurmin[®] consiste em 30 w/w% de CCM e apresenta 27 vezes mais biodisponibilidade do que a CCM convencional. Sua composição química encontra-se disponível no Anexo I.

4.1.2. Desenvolvimento de um concentrado proteico de soro de leite (WPC) pelo método de secagem spray drying

O leite para a fabricação do concentrado proteico de soro foi obtido do estábulo da Universidade Federal de Viçosa-MG, sendo submetido à microfiltração para obtenção do soro de leite. Foram coletadas amostras de quatro dias de produção de queijo. O soro foi armazenado em embalagens plásticas com tampa, identificadas e armazenadas em freezer (-80 °C) até o momento de sua utilização.

O procedimento de secagem do soro de leite foi conduzido em um secador de pulverização de nível único, modelo único (modelo MSD 1.0), equipado com um bico de pulverização de 1 mm de diâmetro (Labmaq, Brasil). As taxas de ar e de fluxo de produto, bem como a temperatura do ar foram definidas mediante testes iniciais, seguindo a metodologia proposta por Perrone e colaboradores (2013), em que o ar de entrada e o fluxo de saída do produto é de, 170 ± 2 °C e 1 L h^{-1} .

A caracterização do WPC foi realizada de acordo com a AOAC (2012), em triplicata. O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico a 105 ° C até peso constante. A proteína foi determinada pelo método 991.20 (N x 6,38) (AOAC, 2012), a lactose pelo método ISO 22662/IDF198 (BRASIL, 2017), os lipídios pelo método 989.05 (AOAC, 2012) e cinzas pelo método 942.05 (AOAC, 2012). Os resultados foram expressos em base seca. O valor energético total foi calculado utilizando-se o fator de conversão de 4,0 kcal g⁻¹ para carboidratos e proteínas, e 9,0 kcal g⁻¹ para lipídios (MERRIL & WATT, 1955).

4.1.3. Concentrado proteico de soro de leite (WPC) adicionado de curcumina

A CCM foi adicionada ao WPC de modo que se obtivesse um produto com a concentração de 0,8 g de curcumina em cada 100 g de WPC. Para este cálculo, considerou-se uma ingestão de 3,0 mg/kg/dia de curcumina (valor máximo da IDA para humanos (FAO, 2004)) para um indivíduo de 70 kg e que realiza uma substituição de proteína por meio do WPC

de 0,3 g/kg/dia (SCHOENFELD e ARAGON, 2018). Assim, a substituição de proteína nos animais, por meio do WPC, correspondeu a 30% das necessidades estipuladas para ratos em fase de manutenção (REEVES et al., 1993), sendo essa substituição de acordo com a que é utilizada em humanos.

4.2. Determinação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do WPC, WPC adicionado de CCM e CCM

4.2.1. Obtenção dos extratos

Para o preparo dos extratos, utilizaram-se 2 g de cada amostra e 20 mL de solução de extração composta de acetona: água (70:30 v v¹). As misturas foram submetidas à agitação em banho metabólico (DUBNOFF, modelo MA-093) (180 rpm), em temperatura ambiente por 15 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas (Multi-purpose centrifuge, NF 1200/1200R, 14000 rpm) por 15 minutos e as frações dos sobrenadantes foram filtradas em papel de filtro, e seus volumes completados para 20 mL com solução extratora. Os extratos foram armazenados em frasco âmbar a -18 °C. Alíquotas dos extratos foram utilizadas para a estimativa de fenólicos totais e teste antioxidante.

4.2.2. Estimativa da concentração de fenólicos totais

A concentração de fenólicos totais nos extratos foi estimada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com a metodologia proposta por Singleton et al. (1999). Foram adicionados em tubos de ensaio 500 µL do extrato, 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu a 20% diluído em água (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 500 µL de solução de carbonato de sódio a 7,5% (diluído em água). Realizou-se agitação em vórtex (Bio Vórtex V1 BIOSAN[®]) e, em seguida, as amostras foram deixadas para reagir por 30 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolução 60S, EUA), em comprimento de onda de 760 nm. Uma curva analítica foi construída a partir da leitura da absorvância de soluções com diferentes concentrações (0,006-0,09 mg/mL) de ácido gálico (Sigma-Aldrich, Alemanha). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg AGE/g de amostra).

4.2.3. Determinação da atividade antioxidante

A atividade de retirada de radical (ARR) das amostras foi determinada a partir dos extratos preparados para a análise de fenólicos totais, utilizando o método do radical DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidrazila) (BLOOR, 2001). Uma alíquota de 100 µL dos extratos foi adicionada de 1500 µL de solução metanólica de DPPH (Sigma-Aldrich, Alemanha). Realizou-se agitação em vórtex e, em seguida, os extratos foram deixados em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (ThermoScientific, Evolution 60S, EUA) a 517 nm. Os resultados foram expressos em mM de equivalente de trolox por grama de amostra (mM trolox/g de amostra).

As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Vitaminas (DNS/UFV).

4.3. Delineamento experimental

4.3.1. Cálculo amostral

Os animais foram alocados em seis grupos experimentais, contendo oito animais em cada grupo de acordo com o método proposto por Conagin (1959), no qual cada animal é considerado uma repetição, de modo que a diferença da média dos pesos entre os grupos não excedesse dez gramas (Quadro 1). Foi considerado um estudo prévio com modelo animal e desfecho similar ao da presente pesquisa (MAITHILIKARPAGASELVI et al., 2016).

Para o cálculo amostral, utilizou-se a seguinte equação (Conagin, 1959):

$$r = 2 \times s^2 \times (t\alpha + t\beta) * (t\alpha + t\beta)/d^2, \text{ em que:}$$

r = número de repetições calculado

s^2 = variância dos dados de referência

$t\alpha$ = probabilidade do erro tipo 1 em função do grau de liberdade do resíduo

$t\beta$ = probabilidade do erro tipo 2 em função do grau de liberdade do resíduo

d = distância mínima entre médias.

Quadro 1. Variáveis a serem utilizadas para o cálculo amostral.

| | Média+DP Grupo 1 | Média+DP Grupo 2 | Média+DP Para fórmula |
|----------|---------------------|---------------------|--------------------------|
| Peso (g) | 306,9 + 7,4 | 280,9 + 2,6 | 293,9 + 5 |
| N | 10 | 10 | 10 |

Fonte: MAITHILIKARPAGASELVI et al., 2016

$$s^2 = 25$$

$$t\alpha = 2,262, \text{ considerando } \alpha \text{ de } 0,05$$

$$t\beta = 1,833, \text{ considerando } \beta \text{ de } 0,1$$

$$d = 10 \text{ g}$$

$$2 \times 25 \times (2,262 + 1,833) \times (2,262 + 1,833) / (10^2) \rightarrow \mathbf{8 \text{ animais}}$$

4.3.2. Animais

Foram utilizados 48 ratos machos (adultos jovens), com 12 semanas de vida, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, Rodentia), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa.

O transporte dos animais do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde até o Departamento de Nutrição e Saúde (Laboratório de Nutrição Experimental) foi feito em carro próprio e em curto espaço de tempo. Durante o transporte, os animais tiveram livre acesso à água e ração, e cuidados adicionais para a manutenção de uma temperatura agradável aos animais foram tomados.

Os animais foram mantidos em gaiolas de aço inoxidável individuais, com ciclo de claro/escuro de 12 horas e temperatura média de 22 ± 2 °C, durante todo o período experimental.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa, MG, no período de janeiro a abril de 2019 (período de aclimação + 4 semanas de experimento) (Figura 1).

4.3.3. Dietas experimentais

Todos os animais receberam dieta padrão comercial até atingirem 12 semanas de vida, idade em que se deu início o experimento com a alocação dos animais aos seus respectivos grupos de tratamento. A partir de então, as dietas experimentais foram formuladas de acordo com as recomendações AIN-93M, propostas pelo American Institute of Nutrition (1993) para manutenção de animais adultos, sendo elas: dieta AIN-93M (controle), na qual a fonte proteica utilizada foi a albumina; dieta WPC + CCM, na qual 30% (36 g) da necessidade de proteína foram advindos do WPC, considerando sua pureza, e o restante de albumina, mais a adição de CCM; e dieta CCM, que é a dieta AIN-93M acrescida de CCM isolada, também considerando sua pureza (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

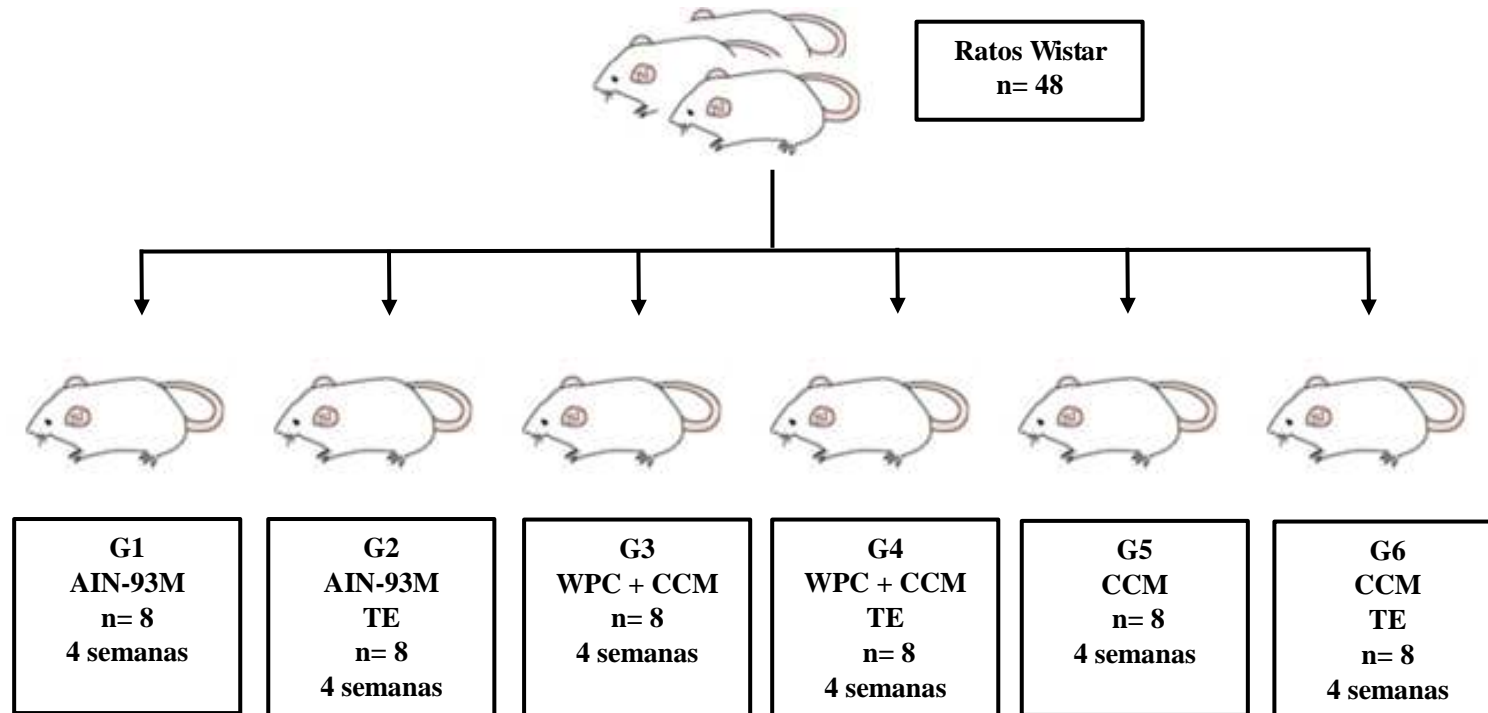
| Ingredientes | g/kg de dieta | | |
|-----------------------|---------------|---------|-------|
| | AIN-93M | WPC+CCM | CCM |
| Amido de Milho | 455,7 | 455,7 | 455,7 |
| Albumina* | 150,0 | 105,0 | 150,0 |
| Maltodextrina | 155,0 | 155,0 | 155,0 |
| Sacarose | 100,0 | 99,0 | 99,0 |
| Óleo de Soja | 40,0 | 40,0 | 40,0 |
| Celulose | 50,0 | 50,0 | 50,0 |
| Mistura de Minerais | 35,0 | 35,0 | 35,0 |
| Mistura de Vitaminas | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| L-cistina | 1,8 | 1,8 | 1,8 |
| Bitartarato de colina | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| WPC | - | 44,0 | - |
| Theracurmin® | - | 1,2 | 1,2 |

Fonte: Reeves et al., 1993; WPC: whey protein concentrado. *Considerou-se a albumina como tendo 80% de proteína.

Todos os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica da marca Gehaka®, modelo BG2000, misturados manualmente e peneirados em peneiras de plástico. As dietas foram confeccionadas em pó e foram armazenadas protegidas da luz, em temperaturas de 0 a 4°C, até o momento da sua utilização. Os animais receberam água destilada e dieta ad libitum.

4.3.4. Desenho experimental

Os animais foram divididos randomicamente em seis grupos experimentais (n=8), conforme demonstrado abaixo:



G: grupo; AIN-93M: dieta padrão; WPC+CCM: whey protein concentrado adicionado de curcumina; CCM: curcumina; TE: animais submetidos ao teste de exaustão.

Figura 1. Desenho Experimental.

4.3.5. Protocolo de exercício exaustivo

Os animais dos grupos G2, G4 e G6 foram submetidos a um teste exaustivo agudo em natação, após 4 semanas de consumo das dietas experimentais. Os animais foram forçados a nadar até a exaustão, suportando um peso de 5% do peso corporal fixo à cauda (VENDETTI e DIMEO, 1996). A exaustão foi definida quando o rato permaneceu submerso por 10 segundos ou quando não conseguiu mais manter seus movimentos corporais (DAWSON e HORVATH, 1970).

O teste foi realizado no Laboratório de Biologia do Exercício (BioEx), em um tanque de alvenaria azulejado (largura: 65 cm, comprimento: 75 cm, altura: 85 cm), com altura da água de 45 cm e temperatura em torno de $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.3.6. Eutanásia e dissecação dos órgãos

Os animais foram eutanasiados 24 horas após a realização do exercício exaustivo, no Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV), por uma equipe treinada em ambiente tranquilo e adequado, longe da sala de experimentação.

Utilizou-se anestésico inalatório como agente de eutanásia, em função da necessidade de coleta de sangue, como forma de minimizar os efeitos do estresse na manipulação dos animais. Após serem submetidos a um jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados de 3 a 5 minutos com Isoflurano a 3 % (Isoforine, Cristália[®] Brasil), utilizando circuito simples com fluxômetro, acoplado a um cilindro de oxigênio. Os animais foram acondicionados individualmente em caixas transparentes e vedadas para saturação do anestésico, ampliando, assim, os efeitos aguardados da sedação e anestesia profunda. Foram avaliados parâmetros fisiológicos e reflexos para averiguação do grau de sensibilidade da anestesia para que os animais pudessem ser submetidos à exsanguinação total. Todo procedimento foi feito com objetivo de favorecer uma morte humanitária dos animais (RN n^o37, 2018).

O sangue foi coletado por punção cardíaca e posteriormente centrifugado a $1.006\times g$ por 10 minutos (FANEM[®], São Paulo, Brasil) para obtenção do soro, sendo o mesmo armazenado a -80°C para análises posteriores. O fígado também foi pesado e congelado para análises, sendo que uma pequena porção foi separada para as análises histológicas.

4.4. Medidas biométricas e de consumo alimentar

O peso corporal dos animais foi avaliado semanalmente (Mettler Toledo[®], Brasil), sendo que o peso final de cada animal foi subtraído do peso inicial para determinação do ganho de peso.

O consumo alimentar também foi avaliado semanalmente a partir da diferença de peso (em gramas) entre a quantidade de dieta ofertada e a quantidade restante não consumida nos comedouros somada às sobras do fundo da gaiola.

O índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela relação entre o peso e o quadrado do comprimento naso-anal (NOVELLI et al., 2007).

A Circunferência Abdominal no início e ao final do experimento foi obtida no ponto médio entre o crânio e os membros pélvicos do animal (PEREIRA et al., 2012).

A relação entre o ganho de peso (g) e a ingestão alimentar foi utilizada para o cálculo do coeficiente de eficácia alimentar (CEA) $((\text{ganho de peso final}/\text{consumo alimentar total}) \times 100)$ (DA SILVA et al., 2016).

4.5. Análises bioquímicas

Foram avaliadas as concentrações plasmáticas de bilirrubina total, direta e indireta; ácido úrico, fosfatase alcalina, glicose, proteínas totais, albumina, globulina, relação albumina/globulina, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase. As análises foram realizadas na Divisão de Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. O procedimento metodológico foi realizado de acordo com a recomendação do fabricante dos kits (Bioclin[®], Inc.) e as leituras efetuadas no equipamento BS-200 (Mindray[®], Inc.).

4.6. Expressão gênica

4.6.1. Extração do RNA

O RNA total das amostras foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA). Em microtubos de 2 mL, foi adicionado 1 mL de Trizol para cada 50-100 g de amostra. Em seguida, a mesma foi macerada com homogeneizador de tecidos e foram adicionados 200 μ L de clorofórmio. Agitou-se manualmente por 3 minutos. Após

centrifugação (15.000 xg/10min), a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 2 mL, no qual foi adicionado 1 mL de isopropanol e incubada a -80°C por 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi então centrifugada a 12.000 xg por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e adicionou-se 500 µL de etanol 75% no precipitado. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 7.500 xg por 5 minutos a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, as amostras foram ressuspensas em 30 µL de água ultrapura.

Após essa etapa, as amostras foram tratadas com RQ1 DNase (Promega, Madison, EUA) utilizando 1,5 U de enzima por reação. As reações foram incubadas a 37 °C por 30 minutos, e após o período de incubação a enzima foi inativada pela incubação a 70 °C por 10 minutos.

4.6.2. PCR quantitativo (qPCR)

O qPCR foi realizado utilizando o kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, EUA). Para cada reação, foram utilizados 10 µL de Master Mix (2X), 0,4 µL de enzima GoScript™ RT Mix (50X) e 0,4 µL de cada primer (forward e reverse). Padronizou-se a concentração de 600 ng/mL de RNA e a água foi adicionada para completar o volume final de 20 µL. As sequências dos primers utilizados estão descritas no Quadro 2.

A amplificação e detecção foram realizadas com o sistema Eco™ Real-Time PCR (Illumina, CA, EUA), com as seguintes condições de reação qPCR: transcrição reversa a 48 °C por 15 minutos, desnaturação a 95 °C por 10 segundos, anelamento e extensão a 60 °C por 30 segundos.

Para cálculo do aumento da expressão do gene utilizou-se o método $2^{-\Delta Ct}$.

As análises foram realizadas no Laboratório de Imunovirologia (DBG/UFV).

Quadro 2. Sequências de primers para análise de qPCR.

| Gene | Forward | Reverse |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------|
| GAPDH | ATG ACT CTA CCC ACG GCA AG | GGA AGA TGG TGA TGG GTT TC |
| TNF- α | TGG GCT ACG GGC TTG TCA CTC | GGG GGC CAC CAC GCT CTT |
| IL-6 | TCC TAC CCC AAC TTC CAA TGC TC | TTG GAT GGT CTT GGT CCT TAG CC |
| IL-10 | TTG AAC CAC CCG GCA TCT AC | CCA AGG AGT TGC TCC CGT TA |

4.7. Análise de estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado por meio da quantificação dos produtos da oxidação (malondialdeído (MDA), óxido nítrico (ON) e proteína carbonilada (PC)) e por meio da atividade das enzimas antioxidantes (catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona-S-transferase (GST)) no Laboratório de Patologia Experimental (DBA/UFV).

Todos os resultados foram normalizados segundo o teor de proteínas totais presentes em cada amostra e foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ por mg de proteína (BRADFORD, 1976). A curva analítica de proteínas foi preparada com solução de albumina de soro bovino (Sigma Aldrich[®], Inc.). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific[®], Multiskan GO) a 700 nm.

4.7.1. Obtenção do homogenato

Para obtenção do homogenato, 150 mg do tecido hepático foram homogeneizados em 1,5 mL de tampão fosfato e centrifugados a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi armazenado para as análises de MDA, ON, CAT, SOD, GST e proteínas totais. Já o pellet formado foi utilizado para quantificação de PC.

4.7.2. Atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi determinada a partir da sua habilidade em eliminar o radical livre superóxido e peróxido de hidrogênio, diminuindo, assim, a auto-oxidação do pirogalol (DIETERICH et al., 2000).

4.7.3. Atividade da catalase

A atividade da CAT foi determinada por meio da taxa de decaimento, durante 60 segundos, do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por espectrofotometria a 240 nm. (AEBI, 1984).

4.7.4. Atividade da glutatona S-transferase

A atividade da GST foi medida com base na sua habilidade de metabolizar o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), conjugado com a glutatona reduzida (GSH) por

espectrofotometria a 340 nm. A leitura da absorbância foi verificada em diferentes momentos até serem completados 90 segundos de reação (HABIG e JAKOBY, 1981).

4.7.5. Malondialdeído

A peroxidação lipídica foi medida por meio dos níveis de MDA. Este é considerado um dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico que, quando aquecido em meio ácido, forma um produto de coloração rósea. A concentração de MDA foi determinada usando a curva padrão de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMPO) (WALLIN et al., 1993).

4.7.6. Óxido nítrico

A produção de ON foi estimada pela produção de NO₂/NO₃ pela reação padrão de Griess (TSIKAS, 2007). Foram incubados 50 µL de sobrenadantes de cada amostra e 100 µL de solução AB (1% sulfanilamida, 0,1% N-(1-Naftil) etilenodiamina e 2,5% H₃PO₄) à temperatura ambiente, por 10 minutos. A conversão da absorbância em concentrações micromolares de NO foi obtida a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (0–125 µM) e expressa em concentrações de NO (µmol/L). A leitura foi realizada em espectrofotometro a 570 nm.

4.7.7. Proteína carbonilada

A concentração de proteínas carboniladas foi medida utilizando o procedimento 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com base nos grupos carbonil que reagem com DNPH (LEVINE et al., 1990).

4.8. Análises histológicas

Fragmentos do fígado de todos os animais foram removidos e fixados em formaldeído em temperatura ambiente. Após fixação, os tecidos foram desidratados em gradiente crescente de etanol (70 % até absoluto) e incluídos em resina contendo endurecedor (Leica, Histoiresin[®]). Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com 3

um de espessura em micrótomo automático Leica[®] utilizando-se navalha de vidro, e submetidos à coloração pela técnica Hematoxilina/Eosina. As lâminas (Precision[®]) foram montadas com Entellan (Merck[®]) e analisadas em microscópio de luz (LEICA DM750).

As imagens das secções histológicas foram capturadas com a objetiva de 20X por meio da câmera digital LEICA MC170 HD. A partir de 10 fotos por animal, foram quantificadas as áreas contendo vesículas lipídicas e infiltrado inflamatório por meio do aplicativo ImagePro-Plus[®] versão 4.5 (Media Cybernetics) por meio da contagem manual de pontos sobre o tecido (SABARENSE et al., 2012). A análise histomorfométrica considerou a inserção de 1230 pontos sobre a imagem.

O grau de esteatose foi avaliado de acordo com uma escala de 5 graus: grau 0, se o percentual de gordura fosse ausente ou menor que 5%; Grau 1, se $\geq 5\%$ e $<25\%$; Grau 2, se $\geq 25\%$ e $<50\%$; Grau 3, se $\geq 50\%$ e $<75\%$; e grau 4, se $\geq 75\%$ (TURLIN et al., 2001)

As análises foram realizadas nos laboratórios de Patologia Experimental (DBA/UFV) e Biologia Estrutural (DBG/UFV).

4.9. Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. As comparações entre dois grupos (grupo que não realizou o teste x grupo que foi submetido ao teste em natação) foram realizadas por meio do teste t ou mann whitney a depender da normalidade. As comparações entre todos os grupos foram realizadas pela análise de variância, ANOVA one way, seguida do teste post hoc de Tukey para os dados com distribuição paramétrica, enquanto que, para os dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn's*.

O processamento e análise estatística dos dados foram realizados utilizando o software SPSS versão 20 para Windows (SPSS INC. Chicago, IL. USA) e STATA versão 13, sendo adotado como nível de significância estatística um α de 5%. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão para resultados com distribuição paramétrica e mediana \pm mínimo e máximo para resultados não paramétricos.

Para a construção dos gráficos utilizou-se o software GraphPad Prism, versão 6 para Windows (GraphPad Prism Inc, EUA).

4.10. Aspectos Éticos

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), sob o número de protocolo 72/2018 (Anexo II).

5. RESULTADOS

5.1. Composição centesimal do concentrado proteico de soro de leite

O WP desenvolvido e utilizado nesse estudo foi obtido por meio de uma secagem por atomização (spray drying) e foi do tipo concentrado, apresentando teor proteico de quase 88% (Tabela 2).

Tabela 2. Composição centesimal do concentrado proteico de soro de leite.

| Composição centesimal (%) | |
|----------------------------------|--------|
| Umidade | 5,90 |
| Lipídios | 0 |
| Cinzas totais | 2,61 |
| Proteínas | 87,61 |
| Carboidratos totais | 0,04 |
| VET kcal | 350,60 |
| DE | 3,5 |

Valores expressos em base seca. VET: valor energético total, DE: densidade energética.

5.2. Concentração dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do concentrado proteico de soro de leite, curcumina e concentrado proteico de soro de leite adicionado de curcumina

A CCM apresentou maiores concentrações de fenólicos totais e maior capacidade antioxidante em comparação ao WPC ($p < 0,05$) (Figura 2). Não se encontrou diferença significativa nas concentrações de fenólicos e na capacidade antioxidante do WPC+CCM em relação à CCM e ao WPC puros.

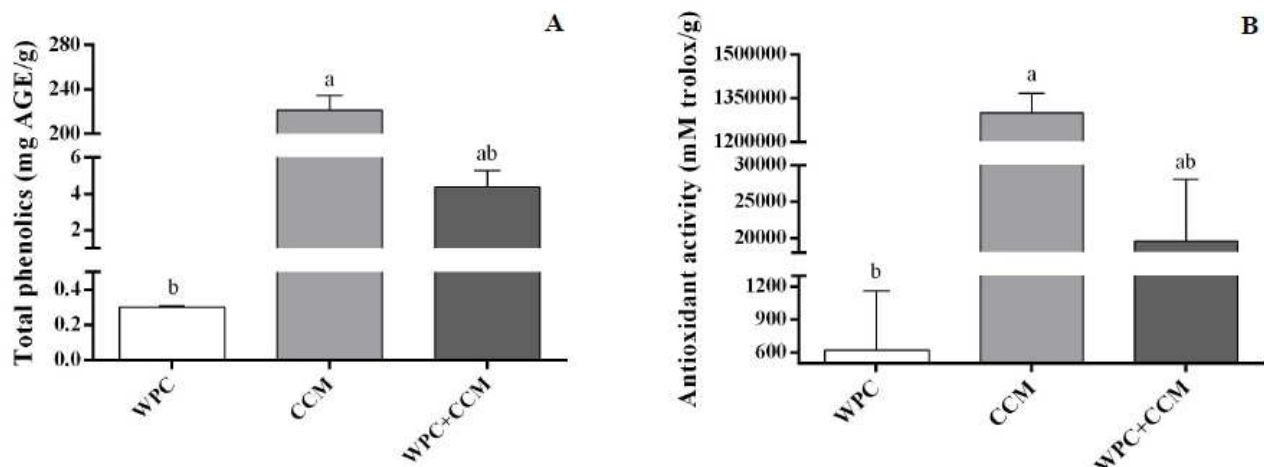


Figura 2. Fenólicos totais (A) e capacidade antioxidante (B) do whey protein concentrado (WPC), curcumina (CCM) e whey protein concentrado adicionado de curcumina (WPC+ CCM). Dados expressos em mediana (mínimo-máximo). Medianas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's.

5.3. Medidas biométricas e de consumo alimentar

O consumo de WPC+CCM, bem como da CCM isolada, não alterou as medidas biométricas e de consumo alimentar dos animais ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Medidas biométricas e de consumo alimentar de ratos sedentários que foram ou não submetidos a teste exaustivo em natação.

| Parâmetros | AIN-93 M | AIN-93 M TE | WPC+CCM | VPC+CCM TE | CCM | CCM TE |
|-------------------|-----------------|--------------------|-----------------|-------------------|----------------|----------------|
| Peso inicial | 306,54±30,96 | 338,30±32,61 | 332,87±43,53 | 335,36±32,95 | 334,36±31,62 | 334,82± 31,69 |
| Peso final | 374,87±34,16 | 397,95±42,50 | 380,290±61,30 | 391,54±36,57 | 389,88±41,43 | 388,99±35,38 |
| Ganho de peso | 68,32±20,35 | 59,65±22,97 | 53,37±24,22 | 56,17±10,95 | 55,52±13,37 | 54,17±16,06 |
| PC inicial | 17 (15-18) | 17 (16,5-18) | 16,75 (15-18,5) | 16,5 (15,5-18) | 16,5 (15,5-18) | 17 (15-18) |
| PC final | 18 (16,5-20) | 18,5 (18-20,5) | 19 (18-20,5) | 18,5 (18-19,5) | 18,5 (18-20,5) | 18 (17,5-19,5) |
| Ganho PC | 1,78±1,03 | 1,64±1,02 | 2,37±0,95 | 1,92±0,34 | 2,18±0,75 | 1,50±0,59 |
| CAT | 593,77±58,66 | 653,61±80,54 | 596,46±42,32 | 627,05±50,03 | 607,78±61,49 | 635,11±55,81 |
| IMC | 0,57±0,03 | 0,59±0,03 | 0,57±0,03 | 0,55±0,04 | 0,57±0,05 | 0,61±0,03 |
| CEA | 11,48±3,09 | 8,96±2,58 | 10,27±2,17 | 9,01±1,95 | 9,06±1,67 | 8,50±2,28 |

Dados expressos em média ± DP ou mediana (mínimo-máximo). Médias ou medianas sem letra significa que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) pelo teste t ou mann whitney e ANOVA one way, seguida do teste post hoc de Tukey ou teste de Kruskal Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. AIN-93M: grupo dieta padrão; AIN-93M TE: grupo dieta padrão submetido a teste de exaustão; WPC+CCM: grupo whey protein concentrado adicionado de curcumina; WPC+CCM TE: grupo WPC + CCM submetido a teste de exaustão; CCM: grupo curcumina; CCM TE: grupo CCM submetido a teste de exaustão. PC: perímetro da cintura; CAT: consumo alimentar total; IMC: índice de massa corporal; CEA: coeficiente de eficiência alimentar; (n=8).

5.4. Variáveis bioquímicas

Observou-se que o WPC+CCM foi capaz de reduzir a glicemia dos animais quando comparados aos grupos AIN-93 M TE e CCM TE ($p < 0,05$). Ainda, também se nota que no grupo controle, os animais que foram submetidos ao teste de exaustão (AIN-93 M TE) apresentaram maiores valores de AST quando comparados aos animais que não realizaram o exercício (AIN-93 M) ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Variáveis bioquímicas de ratos sedentários que foram ou não submetidos a teste exaustivo em natação.

| Variáveis | AIN-93 M | AIN-93 M TE | WPC+CCM | WPC+CCM TE | CCM | CCM TE | VR |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------|
| Bilirrubina total (mg/dL) | 0,11 (0,10- 0,14) | 0,10 (0,08- 0,12) | 0,11 (0,09-0,13) | 0,10 (0,09-0,14) | 0,11 (0,09-0,13) | 0,11 (0,09-0,14) | 0,02 – 0,18 |
| Bilirrubina direta (mg/dL) | 0,05 (0,03-0,07) | 0,05 (0,03-0,05) | 0,06 (0,05-0,06) | 0,05 (0,04-0,07) | 0,05 (0,04-0,07) | 0,05 (0,03-0,07) | 0,01 – 0,10 |
| Bilirrubina indireta (mg/dL) | 0,06 (0,04-0,08) | 0,06 (0,04-0,07) | 0,05 (0,03-0,07) | 0,05 (0,04-0,07) | 0,05 (0,03-0,08) | 0,06 (0,05-0,09) | 0,00 – 0,30 |
| Ácido úrico (mg/dL) | 1,00 (0,60-1,50) | 1,20 (0,60-1,60) | 0,65 (0,40-0,90) | 0,70 (0,60-1,50) | 1,10 (0,70-2,10) | 1,20 (1,10-1,40) | 1,0 – 3,2 |
| Fosfatase alcalina (U/L) | 112,66±18,00 | 125,71±24,86 | 112±9,53 | 135,14±31,61 | 130,00±15,97 | 136,62±21,98 | 56 – 153 |
| Glicose (mg/dL) | 194,71±26,52 ^{Aab} | 215,14±29,38 ^{Aa} | 169,63±23,20 ^{Ab} | 189,43±29,05 ^{Aab} | 195,63±36,73 ^{Aab} | 213,13±22,81 ^{Aa} | 72 – 193 |
| Proteínas totais (g/dL) | 6,20 (5,80-6,50) | 6,30 (5,70-6,60) | 6,10 (5,80-6,30) | 6,00 (5,60-6,70) | 6,30 (6,10-6,70) | 6,35 (5,80-7,30) | 4,0 – 6,9 |
| Albumina (g/dL) | 3,07±0,17 | 2,97±0,16 | 3,00±0,27 | 2,98±0,26 | 3,21±0,22 | 3,22±0,20 | 2,0 – 3,5 |
| Globulina (g/dL) | 3,10 (2,80-3,30) | 3,20 (3,00-3,60) | 3,00 (2,80-3,70) | 3,10 (2,80-3,30) | 3,05 (2,90-3,50) | 3,05 (2,80-4,00) | 2,10 – 5,40 |
| Relação A/G | 1,00 (0,90-1,10) | 0,90 (0,80-1,00) | 1,00 (0,60-1,10) | 1,00 (0,80-1,00) | 1,00 (0,90-1,20) | 1,05 (0,80-1,10) | - |
| AST (U/L) | 93 (40-124) ^{Ba} | 135 (98-200) ^{Aa} | 110,5 (82-222) ^{Aa} | 130 (71-157) ^{Aa} | 87 (68-160) ^{Aa} | 148 (83-465) ^{Aa} | 61– 210 |
| ALT (U/L) | 25 (21-40) | 27 (23-32) | 29 (20-70) | 25 (17-33) | 26,5 (19-45) | 29 (23-62) | 38 – 82 |

Fonte: Lima et al., 2014. Dados expressos em média±DP ou mediana (mínimo-máximo). Média ou mediana seguida pela mesma letra na mesma linha não diferem entre si. As letras minúsculas indicam comparações entre os todos os grupos pela ANOVA one way, seguida do teste post hoc de Tukey ou teste de Kruskal Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. As letras maiúsculas indicam comparações entre o mesmo grupo (animais que não foram submetidos ao teste x animais que foram submetidos ao teste em natação) pelo teste t ou mann whitney. Médias ou medianas sem letra significa que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). AIN-93M: grupo dieta padrão; AIN-93M TE: grupo dieta padrão submetido a teste de exaustão; WPC+CCM: grupo whey protein concentrado adicionado de curcumina; WPC+CCM TE: grupo WPC + CCM submetido a teste de exaustão; CCM: grupo curcumina; CCM TE: grupo CCM submetido a teste de exaustão. Relação A/G: relação albumina/globulina; AST: aspartato amino transferase; ALT: alanina amino transferase. VR: valor de referência; (n=8).

5.5. Expressão gênica de TNF- α , IL-6 e IL-10

No presente estudo, foi verificado que a expressão gênica de TNF- α e IL-6 foi maior no grupo controle submetido ao teste de exaustão (AIN-93 TE) quando comparada aos demais ($p < 0,05$). A expressão de IL-10 foi maior no grupo WPC+CCM em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), exceto em relação ao grupo WPC+CCM TE, que não apresentou diferenças significativas (Figura 3).

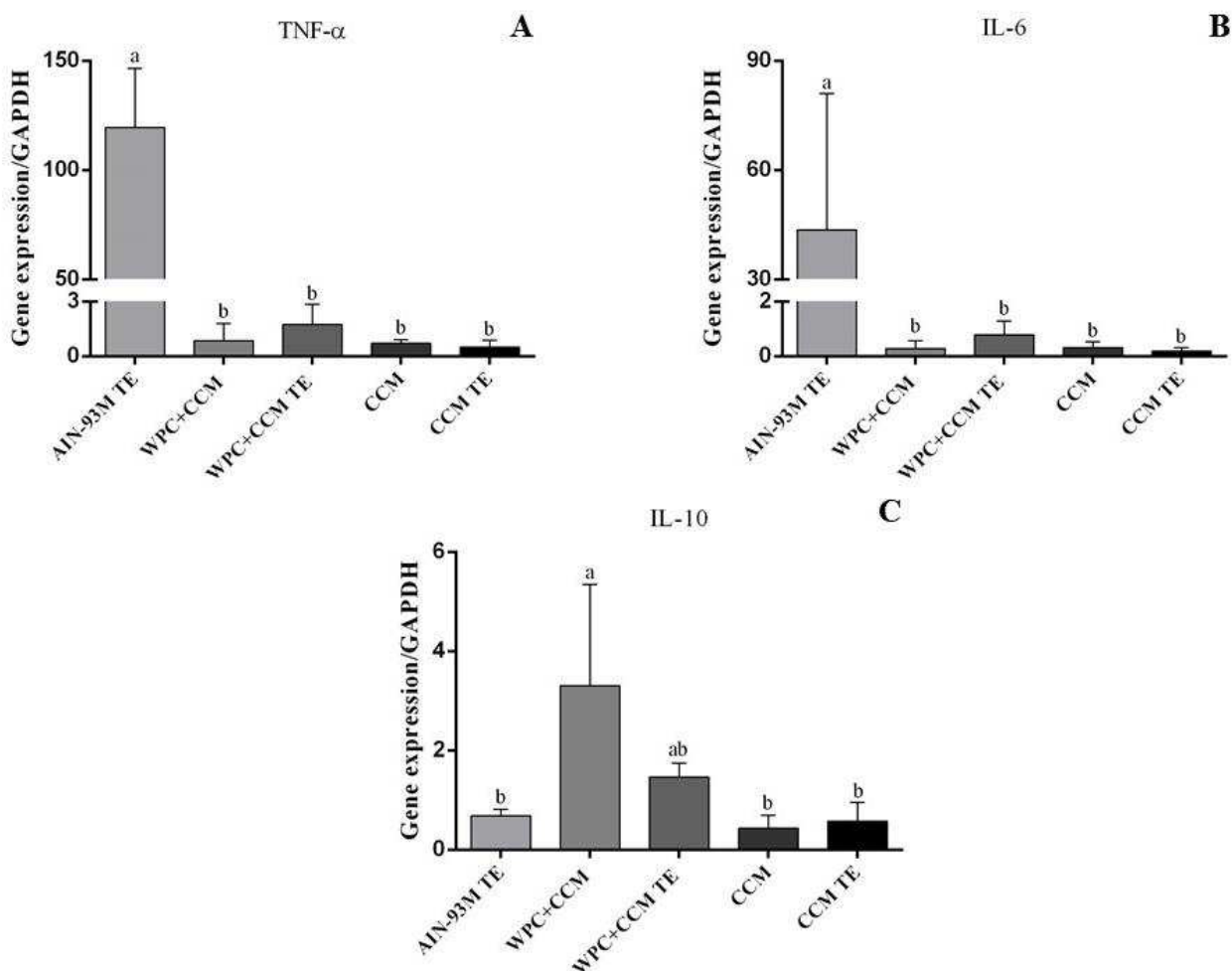


Figura 3. Níveis de expressão gênica de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (A), interleucina 6 (IL-6) (B) e interleucina 10 (IL-10) (C), no fígado de ratos sedentários que foram ou não submetidos a teste exaustivo em natação. Dados expressos em média \pm DP. Médias seguidas pela mesma não diferem entre si pela ANOVA one way, seguida do teste post hoc de Tukey. AIN-93M TE: grupo dieta padrão submetido a teste de exaustão; WPC + CCM: grupo whey protein concentrado adicionado de curcumina; WPC + CCM TE: grupo WPC + CCM submetido a teste de exaustão; CCM: grupo curcumina; CCM TE: grupo CCM submetido a teste de exaustão; (n=5).

5.6. Estresse oxidativo

Observou-se que os animais do grupo CCM e CCM TE apresentaram menores concentrações de MDA, em relação aos grupos AIN93-M e AIN93-M TE, respectivamente ($p < 0,05$). O grupo AIN93-M também apresentou maiores valores de MDA, em comparação ao grupo AIN93-M TE ($p < 0,05$) (Figura 4).

Os animais do grupo WPC+CCM e CCM também apresentaram menores concentrações de PCN, quando comparados aos animais dos grupos AIN93-M ($p < 0,05$). Dentre os animais que foram submetidos ao teste de exaustão, o grupo AIN-93M TE foi o que apresentou os maiores valores de PCN, seguido do grupo WPC+CCM TE e CCM TE ($P < 0,05$). O grupo WPC+CCM TE também apresentou maiores concentrações de PCN em comparação ao grupo WPC+CCM ($p < 0,05$) (Figura 4).

Dentre os animais que realizaram o teste exaustivo em natação, nota-se que o WPC+CCM TE foi capaz de reduzir a concentração de NO, quando comparado aos grupos AIN-93 TE e CCM TE ($p < 0,05$). Já entre os que não nadaram, o WPC+CCM foi capaz de aumentar a concentração de NO, enquanto que o grupo CCM apresentou menores valores, quando comparados aos grupos WPC+CCM TE e CCM TE respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 4).

Quanto aos níveis de CAT, observou-se que os que consumiram a dieta AIN93-M apresentaram maiores concentrações da enzima, quando comparados aos que consumiram CCM ($p < 0,05$). Entretanto, entre os que nadaram, o grupo CCM foi o que apresentou maiores concentrações de CAT em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). O grupo AIN93-M apresentou maiores valores de CAT, enquanto que o grupo CCM apresentou menores valores, quando comparados aos grupos AIN93-M TE e CCM TE, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 4).

Em relação à SOD, o grupo AIN93-M TE apresentou menores valores em relação ao seu controle que não realizou o teste em natação (AIN93-M) ($p < 0,05$). Ainda, os animais do grupo AIN93-M TE apresentaram menores valores de SOD em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 4).

Entretanto, o mesmo não foi observado quanto à GST, visto que, entre os animais que nadaram, o grupo AIN93-M TE apresentou maiores concentrações em relação ao grupo que recebeu WPC+CCM TE ($p < 0,05$) (Figura 4).

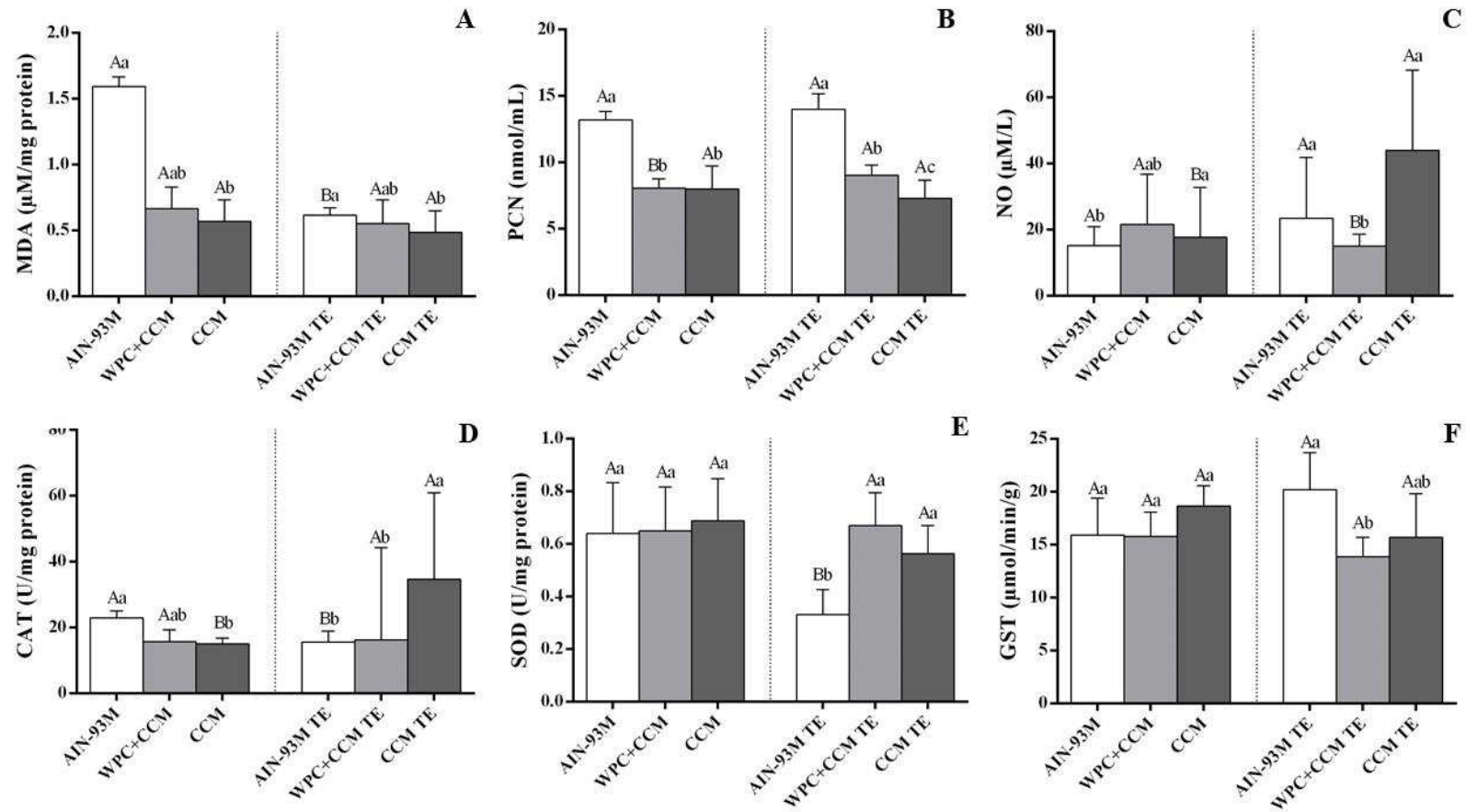


Figura 4. Valores de malondialdeído (MDA) (A), proteína carbonilada (PCN) (B), óxido nítrico (NO) (C), catalase (CAT) (D), superóxido dismutase (SOD) (E) e glutationa S-transferase (GST) (F) no fígado de ratos sedentários que foram ou não submetidos a um teste exaustivo em natação. Dados expressos em média \pm DP ou mediana (mínimo-máximo). As letras minúsculas indicam comparações entre os todos os grupos pela ANOVA one way, seguida do teste post hoc de Tukey ou teste de Kruskal Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's. As letras maiúsculas indicam comparações entre o mesmo grupo (sedentário x natação) pelo teste t ou mann whitney. AIN-93M: grupo dieta padrão; AIN-93M TE: grupo dieta padrão submetido a teste de exaustão; WPC+CCM: grupo whey protein concentrado adicionado de curcumina; WPC+CCM TE: grupo WPC + CCM submetido a teste de exaustão; CCM: grupo curcumina; CCM TE: grupo CCM submetido a teste de exaustão; (n=8).

5.7. Histologia

Verificou-se que os animais do grupo CCM TE apresentaram maiores quantidades de gotículas de gordura quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$), exceto em relação ao grupo CCM ($p > 0,05$). Quanto ao infiltrado inflamatório, os animais do grupo WPC+CCM TE apresentaram menores áreas de inflamação quando comparado ao grupo AIN-93 M TE ($p < 0,05$), corroborando com os resultados encontrados por meio da análise de expressão gênica de citocinas inflamatórias (Tabela 5) (Figura 5). Isto demonstra que o WPC+CCM foi capaz de reduzir a inflamação causada pelo exercício exaustivo.

Observa-se que todos os grupos apresentaram grau I de esteatose, ou seja, apresentaram percentual de gordura $\geq 5\%$ e $< 25\%$ (Tabela 5).

Tabela 5. Histomorfometria do fígado de ratos sedentários que foram ou não submetidos a teste exaustivo em natação.

| Grupos | Esteatose (%) | Infiltrado inflamatório (%) |
|-------------|---------------------------|-----------------------------|
| AIN-93 M | 7,94±2,86 ^{Ab} | 2,19±0,65 ^{Aab} |
| AIN-93 M TE | 7,36±3,25 ^{Ab} | 2,98±0,59 ^{Aa} |
| WPC+CCM | 11,28±6,51 ^{Ab} | 2,12±0,61 ^{Aab} |
| WPC+CCM TE | 10,59±8,14 ^{Ab} | 1,97±0,36 ^{Ab} |
| CCM | 11,82±4,04 ^{Aab} | 2,23±0,41 ^{Aab} |
| CCM TE | 23,55±6,28 ^{Aa} | 2,18±0,40 ^{Aab} |

Dados expressos em média±DP. Média seguida pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si. As letras minúsculas indicam comparações entre os todos os grupos pela ANOVA one way, seguida do teste post hoc de Tukey. As letras maiúsculas indicam comparações entre o mesmo grupo (animais que não foram submetidos ao teste x animais que foram submetidos ao teste em natação) pelo teste t. AIN-93M: grupo dieta padrão; AIN-93M TE: grupo dieta padrão submetido a teste de exaustão; WPC+CCM: grupo whey protein concentrado adicionado de curcumina; WPC+CCM TE: grupo WPC + CCM submetido a teste de exaustão; CCM: grupo curcumina; CCM TE: grupo CCM submetido a teste de exaustão; (n=6).

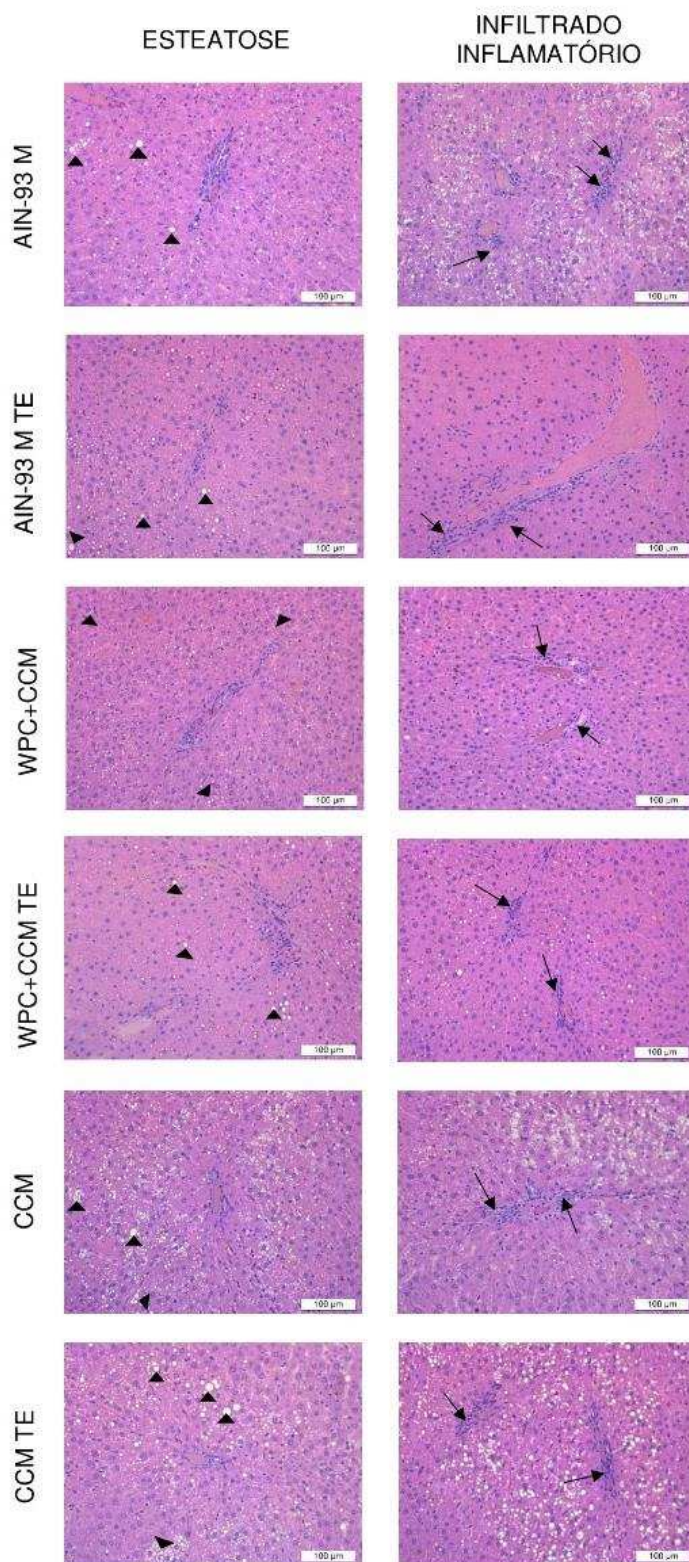


Figura 5. Fotomicrografias do fígado de ratos sedentários que foram ou não submetidos a teste exaustivo em natação. AIN-93M: grupo dieta padrão; AIN-93M TE: grupo dieta padrão submetido a teste de exaustão; WPC+CCM: grupo whey protein concentrado adicionado de curcumina; WPC+CCM TE: grupo WPC + CCM submetido a teste de exaustão; CCM: grupo curcumina; CCM TE: grupo CCM submetido a teste de exaustão. Glóbulos de gordura (►); Infiltrado inflamatório (→); Escala=100µm; Coloração Hematoxilina-Eosina; (n=6).

6. DISCUSSÃO

O estresse é uma condição induzida por diversos estímulos que desequilibram a homeostase do organismo (ŞAHIN e GÜMÜŞLÜ, 2007). Em nosso estudo, induzimos o estresse nos animais por meio de um protocolo de exercício exaustivo, e avaliamos o impacto da associação da CCM ao WPC, no controle metabólico, inflamação e estresse oxidativo de ratos Wistar que foram submetidos a esse teste.

A CCM foi adicionada ao WPC de modo que se obtivesse uma concentração de 0,8 g de CCM em cada 100 g de WPC, sendo este obtido por spray drying, uma das técnicas mais utilizadas no encapsulamento de produtos, visto que apresenta baixo custo e é a mais viável do ponto de vista industrial (TALÓN et al., 2019). A composição centesimal encontrada está dentro do esperado (SILVA E SOUZA, 2016).

Visto que a incorporação de compostos fenólicos em alimentos é considerada uma abordagem eficaz para melhorar o desempenho antioxidante e a bioatividade dos alimentos (CAO e XIONG, 2017), foi avaliada a concentração de fenólicos totais e a atividade antioxidante da CCM, do WPC e do WPC adicionado de CCM. A CCM apresentou maiores concentrações de fenólicos totais e maior capacidade antioxidante em comparação ao WPC, o que já era esperado, visto que a CCM é um composto fenólico biologicamente ativo isolado da CUR que exerce um potente efeito antioxidante (YOUSEFIAN et al., 2019).

Para combater os riscos potenciais de dano oxidativo (nesse caso, causados pelo exercício físico exaustivo), o consumo alimentar de fenólicos pode ser considerado como uma linha de defesa contra tóxicos altamente reativos (AKTER et al., 2019). Também é cientificamente estabelecido que o WPC possui atividade antioxidante (apesar de essa ser menor em relação à CCM), visto que está relacionado à quelatação de metais pela lactoferrina, à eliminação de radicais livres por aminoácidos contendo enxofre e aumento do nível de glutathione peroxidase. Ainda, a lactoferrina e a caseína podem inibir a peroxidação lipídica, a geração de radicais peróxidos, a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a captação de radicais livres de oxigênio e óxido de ferro (KHAN et al., 2019).

Quanto ao WPC+CCM, observamos que a adição de CCM no WPC equiparou as concentrações encontradas na CCM. Propriedades funcionais melhoradas das proteínas pela interação com compostos fenólicos têm sido amplamente relatadas. Proteínas de soro de leite modificadas com fenólicos exibem capacidade emulsificante aprimorada (WANG et al., 2014), pois são capazes de produzir espumas estáveis, bem como manter a atividade anti-inflamatória

dos polifenóis aprisionados nessas partículas (SCHNEIDER et al., 2016), além de protegerem outros compostos bioativos sensíveis (YI et al., 2014).

Em relação às medidas biométricas e de consumo alimentar dos animais, o consumo de WPC+CCM, bem como da CCM isolada, não foi capaz de alterar tais parâmetros, o que representa um resultado positivo, visto que alterações nessas variáveis poderiam influenciar as demais, como os dados bioquímicos e histológicos.

O consumo de WP está associado à diminuição da fome e da ingestão de alimentos em comparação a caseína ou soja e albumina de ovo (VELDHORST et al., 2009). Ainda, uma dieta rica em proteínas pode desempenhar um papel importante na regulação do gasto energético ou do apetite central (HALTON e HU, 2004). Entretanto, ressalta-se que, no presente estudo, ocorreu apenas substituição da proteína da dieta pelo WPC e não uma suplementação, corroborando com os resultados encontrados.

As concentrações plasmáticas dos produtos do metabolismo hepático, bem como as enzimas hepáticas, também foram determinadas para verificar a existência de uma possível toxicidade, visto que o fígado está intensamente envolvido no metabolismo e síntese de todos os macronutrientes e apresenta funções endócrinas e exócrinas altamente relevantes (PULIDO-MORAN et al., 2016). Os animais que foram submetidos ao teste de exaustão apresentaram maiores concentrações de aspartato aminotransferase (AST) quando comparados aos animais que não realizaram o exercício, conforme já esperado, visto que a atividade hepática da AST é citosólica e observa-se seu maior aumento em relação à alanina aminotransferase (ALT) em lesões hepáticas (TIETZ et al., 2008).

Ainda, o WPC+CCM foi capaz de reduzir a glicemia dos animais quando comparados aos grupos AIN-93 M e CCM que foram submetidos ao teste de exaustão. Está bem estabelecido que, durante exercícios prolongados de intensidade moderada a alta, o carboidrato é utilizado principalmente para apoiar o metabolismo energético devido a sua rápida eficiência e disponibilidade (ALGHANNAM et al., 2014).

Os níveis mais altos de glicose observados nos grupos que os animais foram submetidos ao teste de exaustão podem ter sido ocasionados devido à liberação de hormônios catabólicos, como o cortisol, visto que um estressor específico conhecido por modificar drasticamente a concentração circulante de cortisol no corpo humano é o exercício físico HILL et al., 2008). Por outro lado, os baixos níveis de glicose observados nos animais que consumiram WPC+CCM se devem a capacidade que a proteína de soro de leite tem de diminuir a glicemia pós-prandial por meio de vários mecanismos interligados, tais como: aumento da secreção de

incretina e insulina, retardamento do esvaziamento gástrico, redução no apetite e no consumo de energia (MIGNONE et al., 2015), aumento da síntese de glicogênio e a atividade da AMPK (ICHINOSEKI-SEKINE et al., 2015), bem como ativação da mTOR (MITCHELL et al., 2015). Em relação à CCM, esta também tem recebido considerável atenção por demonstrar ser eficaz na redução da glicemia visto que também pode elevar o nível de insulina no plasma (SEO et al., 2008).

O exercício exaustivo também está relacionado à ocorrência de estresse oxidativo, lesão tecidual, além de alterações do equilíbrio sistêmico das citocinas, que são sinalizadores celulares relacionados ao estresse oxidativo (KERASIOTI et al., 2013). Nossos resultados demonstram que o WPC+CCM foi capaz de reduzir a expressão gênica de citocinas inflamatórias, como o TNF- α e IL-6, e aumentar a expressão gênica de IL-10, considerada uma importante citocina anti-inflamatória.

A magnitude da resposta inflamatória depende da intensidade, duração e cronicidade do exercício (KERASIOTI et al., 2013; LIU et al., 2017). Até o momento, apenas alguns estudos relataram os efeitos do exercício agudo sobre vias inflamatórias no fígado (HEINRICH et al., 2003; HE e KARIN, 2011; HUANG et al., 2013; BARCELOS et al., 2016). Entretanto, sabe-se que ocorre uma grande comunicação entre o fígado e o músculo esquelético durante o exercício, modulando a resposta inflamatória. A IL-6 derivada da contração muscular desencadeia a produção de várias citocinas e vias de sinalização anti-inflamatória e é considerada um mediador chave dos efeitos agudos do exercício. Contudo, durante a inflamação crônica, a IL-6 ativa monócitos e macrófagos por meio da estimulação do TNF- α , além de permanecer elevada durante e após o exercício atingindo vários tecidos, incluindo o fígado (PILLON BARCELOS et al., 2017)

O consumo de CCM isolada é eficaz para reduzir a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias, uma vez que pode regular negativamente as enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclo-oxigenase-2 (COX-2), lipoxigenase e atividade da xantina oxidase, suprimindo a ativação do NF-kB (KOCAADAM e SANLIER, 2017), que é um fator de transcrição que controla a expressão gênica de muitas proteínas inflamatórias, crescimento celular e apoptose, além de ser ativado de maneira sensível ao estresse oxidativo durante a contração muscular devido ao aumento da produção de radicais livres (SAHIN et al., 2016).

Naturalmente, o NF-kB é mantido no citosol. A exposição a estímulos inflamatórios resulta na liberação dos dímeros NF-kB (p50 e p65), que agora podem ser translocados para o

núcleo onde a transcrição do gene alvo é induzida (DAVIS et al., 2007). A CCM, portanto, pode agir bloqueando a ativação do NF- κ B (PAN et al., 2000).

Também, foi relatado que a CCM suprime a COX-2, uma enzima chave na formação de prostaglandinas, uma família de compostos derivados do ácido araquidônico. Apesar dos mecanismos ainda não terem sido totalmente elucidados, acredita-se que seja mediado por seus efeitos sobre NF- κ B e AP-1 (DAVIS et al., 2007), devido aos grupos hidroxila e metoxi em sua estrutura (BOARESCU et al., 2019).

Quanto ao papel anti-inflamatório do WPC, este provavelmente se deve ao seu conteúdo de peptídeos bioativos (MA et al., 2016). Estudos também demonstram a capacidade anti-inflamatória da lactoferrina em modelos animais por meio da regulação de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-10 e pró-Th1) (KIMBER et al., 2002; SHIMIZU et al., 2006). Já sobre a glutamina, o aminoácido mais abundante do WPC, também se tem demonstrado seus efeitos protetores por meio de múltiplos mecanismos, incluindo proteção direta de células e tecidos contra lesões, atenuação da inflamação e preservação da função metabólica (WEITZEL et al., 2010).

Ainda, visto que o fígado desempenha um papel importante no status redox (PILLON BARCELOS et al., 2017), avaliamos o estresse oxidativo induzido pelo exercício sobre os produtos de oxidação e enzimas antioxidantes. Observamos que, dentre os animais que realizaram ou não o teste exaustivo, o consumo de CCM foi capaz de reduzir as concentrações de MDA, bem como o consumo de WPC+CCM e CCM isolada também foram capazes de reduzir as concentrações de PCN em relação ao grupo controle. Dentre os animais que nadaram, o WPC+CCM foi capaz de reduzir a concentração de NO, quando comparado aos grupos controle e CCM.

O MDA é um dos estágios finais dos produtos da peroxidação lipídica e é um indicador do estresse oxidativo nas células e tecidos, indicando um aumento nas lesões de membrana (REN et al., 2017). O NO, por sua vez, apesar de possuir um elétron não emparelhado e estar relacionado à produção de muitos intermediários reativos, é uma molécula lipofílica de curta duração gerada a partir de l-arginina pela NO sintase (NOS) e está envolvido com a vasodilatação, neurotransmissão, inibição da agregação plaquetária, defesa imunológica e sinalização intracelular (MENON e SUDHEER, 2007).

A administração de CCM pode diminuir significativamente o MDA devido a sua capacidade de reduzir a peroxidação lipídica induzida por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e inibir a atividade da NOS reduzindo a produção de NO (BOARESCU et al., 2019).

O exercício exaustivo está relacionado ao aumento da produção desses compostos oxidantes, conforme o encontrado em nossos resultados, devido ao elevado consumo de oxigênio durante o exercício, que pode aumentar em até 200 vezes (MAZANI et al., 2018), aumentando a atividade mitocondrial e à incapacidade do organismo de equilibrar sua demanda de energia, causando desequilíbrio e consequente dano metabólico. O fato de esses compostos apresentarem elétrons desemparelhados os torna muito reativos a qualquer outro tipo de molécula como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (VALE et al., 2018).

Já em relação às enzimas antioxidantes, dentre os animais que não realizaram o teste, os que consumiram a dieta controle apresentaram maiores concentrações de CAT quando comparados aos que consumiram CCM.

O exercício exaustivo foi capaz de diminuir a concentração de CAT e SOD nos animais do grupo controle, enquanto se observou o contrário com o grupo que consumiu CCM, em relação aos níveis de CAT.

Ainda, entre os animais que nadaram, a CCM foi capaz de aumentar mais rapidamente o pool de CAT após o exercício exaustivo em relação aos demais grupos, enquanto que em relação às concentrações de SOD, tanto o WPC+CCM quanto a CCM isolada também foram capazes de aumentar a concentração dessa enzima antioxidante. A CCM é capaz de induzir indiretamente a expressão de proteínas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) e g-glutamyl cisteína ligase (gGCL) (SAMARGHANDIAN et al., 2017 e HU, 2018).

O mesmo não foi observado quanto à GST, visto que, o grupo controle foi o que apresentou os maiores teores dessa enzima em relação aos demais grupos. Além do mecanismo enzimático, as células desenvolveram várias defesas não enzimáticas compostas pelos antioxidantes exógenos, componentes da dieta, para aliviar os efeitos deletérios causados por estresse oxidativo (REN et al., 2017). As vitaminas C e E, os carotenoides e os fenólicos são atualmente considerados os principais antioxidantes exógenos (FALLAHI et al., 2015). Portanto, a não observação de aumento de GST e CAT nos grupos WPC+CCM e CCM; e CCM respectivamente, indica que, devido à ingestão de CCM, o sistema de defesa não enzimático foi suficiente para combater o estresse oxidativo, não sendo necessária a demanda do sistema enzimático.

Por fim, com o intuito de analisar se as funções teciduais hepáticas permaneceram preservadas com a ingestão do WPC+CCM ou CCM isolada, após o exercício físico exaustivo

em natação, foram avaliados, por meio da análise histológica, as áreas referentes ao depósito de gordura e infiltrado inflamatório. Observamos que todos os grupos apresentaram grau I de esteatose, e que o grupo que recebeu CCM e que foi submetido ao teste em exaustão foi o que apresentou maiores quantidades de gotículas de gordura.

O exercício agudo não parece afetar o conteúdo de gordura hepática (BROUWERS et al., 2016). Entretanto, as dietas experimentais formuladas de acordo com as recomendações AIN-93M, propostas pelo American Institute of Nutrition (1993), podem ter contribuído para o quadro de esteatose observado no presente estudo, visto que, nessa formulação, 70% das calorias são advindas de carboidratos. Sabe-se que o aumento da ingestão de dietas ricas em gorduras e carboidratos faz com que a ocorrência de DHGNA torne-se cada vez mais comum.

O desenvolvimento inicial da esteatose hepática pode estar relacionado ao desbalanço de mediadores que regulam o acúmulo de lipídios hepáticos, tais como: aumento da lipogênese de novo e da importação de lipídios, bem como a diminuição da exportação e oxidação de ácidos graxos (BROWNING e HORTON 2004).

Apesar de não ter sido verificado em nosso estudo o efeito hepatoprotetor da CCM, provavelmente devido à baixa dose testada (3 mg/kg/dia) e a duração do experimento (4 semanas), este pode estar relacionado à via do sinal Nrf2 e à atenuação do estresse oxidativo induzido pelo aumento do depósito lipídico e secreção de citocinas pró-inflamatórias (HE et al., 2012). Os genes antioxidantes indutores de Nrf2 são considerados importantes mecanismos de defesa antioxidante (GAO et al., 2013) e, por isso, estão relacionados à diminuição do acúmulo de lipídios e à atenuação da lesão hepática.

Quanto ao infiltrado inflamatório, dentre os animais que nadaram, os que consumiram WPC+CCM apresentaram menores áreas de inflamação quando comparado ao grupo controle, corroborando com os resultados encontrados por meio da análise de expressão gênica de citocinas inflamatórias, demonstrando que o WPC+CCM é capaz de reduzir a inflamação causada pelo exercício exaustivo.

7. CONCLUSÃO

O WP utilizado nesse estudo é do tipo concentrado e a CCM foi adicionada ao WPC de modo que se obtivesse um produto com a concentração de 0,8 g de CCM em cada 100 g de WPC. A CCM apresentou elevadas concentrações de fenólicos totais e capacidade antioxidante, conferindo ao WPC um aprimoramento de suas características nutricionais devido ao seu potencial antioxidante e nutricional.

O consumo do WPC+CCM, bem como da CCM isolada, não alterou as medidas biométricas, o consumo alimentar dos animais e a função hepática e renal, bem como o balanço proteico dos animais, o que o torna um produto seguro, viável e de eficácia comprovada.

Ainda, o WPC+CCM reduziu a glicemia em relação aos grupos AIN-93 M e CCM que foram submetidos ao teste de exaustão e a expressão gênica de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6, além de aumentar a expressão de IL-10 (citocina anti-inflamatória) em comparação aos demais grupos. Também, reduziu a concentração de óxido nítrico quando comparado aos grupos controle e CCM, e proteína carbonilada em relação ao grupo controle, além de aumentar as concentrações de superóxido dismutase em relação ao grupo controle.

Apesar de todos os grupos terem apresentado grau I de esteatose hepática, possivelmente devido a dieta consumida, os animais do grupo WPC+CCM TE apresentaram menores áreas de infiltrado inflamatório hepático em relação ao grupo AIN-93 M TE, conforme demonstrado na análise histomorfométrica.

Portanto, o WPC adicionado de CCM, pode e deve ser considerado como uma alternativa de bebida a ser disponibilizado aos consumidores de whey protein, pois representa uma estratégia capaz de diminuir a glicemia e os danos oxidativos e inflamatórios hepáticos causados pelo exercício físico exaustivo em natação.

São necessários mais estudos que avaliem os efeitos benéficos da associação da CCM ao WPC, por meio de análises em outros órgãos, como o músculo esquelético, bem como desenvolver estudos em humanos, de maneira a tentar elucidar as vias e mecanismos moleculares responsáveis pelos resultados encontrados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Oxygen radicals in biological systems. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121-126, 1984.

AFTAB, N.; VIEIRA, A. Antioxidant activities of curcumin and combinations of this curcuminoid with other phytochemicals. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 24, n. 4, p. 500-502, 2010.

AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 1, p. 40-59, 2009.

AGGARWAL, B. B.; SURH, Y. J.; SHISHODIA, S. (Ed.). **The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease**. Springer Science & Business Media, 2007.

AKPOLAT, M. et al. Kanser tedavisinde curcuminin yeri. **Yeni Tıp Dergisi**, v. 27, n. 3, p. 142, 2010.

AKTER, J.; HOSSAIN, M. A.; TAKARA, K.; ISLAM, M. Z.; HOU, D. X. Antioxidant activity of different species and varieties of turmeric (*Curcuma* spp): Isolation of active compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 215, p. 9-17, 2019.

ALAMDARI, N.; O'NEAL, P.; HASSELGREN, P. O. Curcumin and muscle wasting—A new role for an old drug?. **Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 125-129, 2009.

ALEXANDRE, T. S. et al. Sarcopenia according to the European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) versus dynapenia as a risk factor for disability in the elderly. **J Nutr Health Aging**, v. 18, n. 5, p. 547-553, 2014.

ALGHANNAM, A. F.; TSINTZAS, K.; THOMPSON, D.; BILZON, J.; BETTS, J. A. Exploring mechanisms of fatigue during repeated exercise and the dose dependent effects of carbohydrate and protein ingestion: study protocol for a randomised controlled trial. **Trials**, v. 15, n. 95, p. 1-12, 2014.

ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807-818, 2007.

ANTHONY, J. C. et al. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 10, p. 2413-2419, 2000.

ARBER, N.; LEV-ARI, S.; LICHTENBERG, D. Compositions for treatment of cancer and inflammation. **Recent patents on anti-cancer drug discovery**, v. 3, n. 1, p. 55-62, 2008.

ARETA, J. L. et al. Reduced resting skeletal muscle protein synthesis is rescued by resistance exercise and protein ingestion following short-term energy deficit. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 306, n. 8, p. E989-E997, 2014.

ASCENSÃO, A.; MARTINS, M. J.; SANTOS-ALVES, E.; GONÇALVES, I. O.; PORTINCASA, P.; OLIVEIRA, P. J.; MAGALHÃES, J. Modulation of hepatic redox status and mitochondrial metabolism by exercise: therapeutic strategy for liver diseases. **Mitochondrion**, v. 13, n. 6, p. 862-870, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 19th ed. Gaithersburg, MD, USA, 2012.

ATAIE, A. et al. An investigation of the neuroprotective effects of Curcumin in a model of Homocysteine-induced oxidative stress in the rat's brain. **Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 18, n. 2, p. 128, 2010.

BARCELOS, R. P.; BRESCIANI, G.; RODRIGUEZ-MIGUELEZ, P.; CUEVAS, M. J.; SOARES, F. A. A.; BARBOSA, N. V.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Diclofenac pretreatment effects on the toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B-mediated inflammatory response to eccentric exercise in rat liver. **Life sciences**, v. 148, p. 247-253, 2016.

BARCLAY, L. R. C.; VINQVIST, M. R.; MUKAI, K.; GOTO, H.; HASHIMOTO, Y.; TOKUNAGA, A.; UNO, H. On the antioxidant mechanism of curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity. **Organic letters**, v. 2, n. 18, p. 2841-2843, 2000.

BATISTA, M. A. et al. Desenvolvimento, caracterização e análise sensorial de formulações alimentares com proteínas do soro de leite ou albumina para crianças/Development, characterization and sensory analysis of food preparations for children containing whey proteins or albumin. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 1, p. 31, 2015.

BAYRAM, T. et al. Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. **Talanta**, v. 75, n. 3, p. 705-709, 2008.

BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. In: LESTER, P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. 335, p. 2-14, 2001.

BOARESCU, P. M.; BOARESCU, I.; BOCŞAN, I. C.; GHEBAN, D.; BULBOACĂ, A. E.; NICULA, C.; POP, R. M.; RÂJNOVEANU, R. M.; BOLBOACĂ, S. D. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Curcumin Nanoparticles on Drug-Induced Acute Myocardial Infarction in Diabetic Rats. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 504, 2019.

BORGES, P. F. Z. et al. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, n. 52, p. 1-8, 2001.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRADFORD, P. G. Curcumin and obesity. **Biofactors**, v. 39, n. 1, p. 78-87, 2013.
- BRANS, G. B. P. W. et al. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, n. 1-2, p. 263-272, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2017.
- BROUWERS, B., HESSELINK, M. K., SCHRAUWEN, P., & SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B. Effects of exercise training on intrahepatic lipid content in humans. **Diabetologia**, v. 59, n. 10, p. 2068-2079, 2016.
- BROWN, M. A.; STEVENSON, E. J.; HOWATSON, G. Whey protein hydrolysate supplementation accelerates recovery from exercise-induced muscle damage in females. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 43, n. 4, p. 324-330, 2017.
- BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 2, p. 147-152, 2004.
- CAI, X. et al. Bioavailability of quercetin: problems and promises. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 20, p. 2572-2582, 2013.
- CAO, Y.; XIONG, Y. L. Interaction of whey proteins with phenolic derivatives under neutral and acidic pH conditions. **Journal of food science**, v. 82, n. 2, p. 409-419, 2017.
- CAPUTO, F.; VEGLIANTE, R.; GHIBELLI, L. Redox modulation of the DNA damage response. **Biochemical pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 1292-1306, 2012.
- CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 157, p. 1 - 11, 2009.
- CERMAK, N. M. et al. Protein supplementation augments the adaptive response of skeletal muscle to resistance-type exercise training: a meta-analysis-. **The American journal of clinical nutrition**, v. 96, n. 6, p. 1454-1464, 2012.
- CHUN, K. S. et al. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF- κ B activation. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 9, p. 1515-1524, 2003.
- CONAGIN, A. Determinação do número de repetições no planejamento de experimentos. **BRAGANTIA - Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo**, v. 18, n. 2, 1959.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Resolução Normativa nº 37, de 2018. **Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA**. Brasília, DF, fev. 2018.

CORROCHANO, A. R. et al. Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 6, p. 4747-4761, 2018.

DA SILVA, B. P.; DIAS, D. M.; MOREIRA, M. E. C.; TOLEDO, R. C. L.; DA MATTA, S. L. P.; DELLA LUCIA, C. M.; MARTINO, H. S. D.; PINHEIRO-SANTANA, H. M. Chia Seed Shows Good Protein Quality, Hypoglycemic Effect and Improves the Lipid Profile and Liver and Intestinal Morphology of Wistar Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 225–230, 2016.

DAVIES, R. W.; CARSON, B. P.; JAKEMAN, P. M. The effect of whey protein supplementation on the temporal recovery of muscle function following resistance training: A systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 221, 2018.

DAVIS, J. M.; MURPHY, E. A.; CARMICHAEL, M. D.; ZIELINSKI, M. R.; GROSCHWITZ, C. M.; BROWN, A. S.; GANGEMI, J. D.; GHAFFAR, A.; MAYER, E. P. Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 6, p. R2168-R2173, 2007.

DAWSON, C.A., HORVARTH, S.M. Swimming in small laboratory animals. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 2, p. 51-78, 1970.

DEOGADE, S.; GHATE, S. Curcumin: Therapeutic Applications In Systemic And Oral Health. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 4, p. 281-290, 2015.

DEVASSY, J. G.; NWACHUKWU, I. D.; JONES, P. J. H. Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. **Nutrition reviews**, v. 73, n. 3, p. 155-165, 2015.

DEVRIES, M. C.; PHILLIPS, S. M. Supplemental protein in support of muscle mass and health: advantage whey. **Journal of food science**, v. 80, n. S1, p. A8-A15, 2015.

DI PIERRO FRANCESCO, R. G. et al. Comparative evaluation of the pain-relieving properties of a lecithinized formulation of curcumin (Meriva®), nimesulide, and acetaminophen. **Journal of pain research**, v. 6, p. 201, 2013.

DIETERICH, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-39, 2000.

DROBNIC, F. et al. Reduction of delayed onset muscle soreness by a novel curcumin delivery system (Meriva®): a randomised, placebo-controlled trial. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 31, 2014.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DULBECCO, P.; SAVARINO, V. Therapeutic potential of curcumin in digestive diseases. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 48, p. 9256, 2013.

EPSTEIN, J.; SANDERSON, I. R.; MACDONALD, T. T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. **British journal of nutrition**, v. 103, n. 11, p. 1545-1557, 2010.

ESATBEYOGLU, T. et al. Curcumin—from molecule to biological function. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 22, p. 5308-5332, 2012.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Refined exposure assessment for curcumin (E 100). **EFSA Journal**, v. 12, n. 10, p. 3876, 2014.

FALLAHI, S.; RAJAEI, M.; MALEKZADEH, K.; KALANTAR, S. M. Would Phoenix dactylifera Pollen (palm seed) be considered as a treatment agent against males infertility? A systematic review. **Electronic Physician Journal**, v. 7, n. 8, p. 1590-1596, 2015.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 466-488, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives. Geneva, p.18-22, 2004. Disponível em:<
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42849/1/WHO_TRS_922.pdf>. Acesso em: 14 out. 2019.

GAFFEY, A. et al. The effects of curcumin on musculoskeletal pain: a systematic review protocol. **JBI database of systematic reviews and implementation reports**, v. 13, n. 2, p. 59-73, 2015.

GAO, S.; DUAN, X.; WANG, X.; DONG, D.; LIU, D.; LI, X.; SUN, G.; LI, B. Curcumin attenuates arsenic-induced hepatic injuries and oxidative stress in experimental mice through activation of Nrf2 pathway, promotion of arsenic methylation and urinary excretion. **Food and chemical toxicology**, v. 59, p. 739-747, 2013.

GEIRSDOTTIR, O. G. et al. Dietary protein intake is associated with lean body mass in community-dwelling older adults. **Nutrition research**, v. 33, n. 8, p. 608-612, 2013.

GHOSH, S.; BANERJEE, S.; SIL, P. C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 111-124, 2015.

- GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 787-809, 2008.
- GOLDFARB, A. H. et al. Effects of a fruit/berry/vegetable supplement on muscle function and oxidative stress. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 43, n. 3, p. 501-508, 2011.
- GOUNDER, S. S. et al. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. **PLoS one**, v. 7, n. 9, p. e45697, 2012.
- GUILLET, C.; BOIRIE, Y.; WALRAND, S. An integrative approach to in-vivo protein synthesis measurement: from whole tissue to specific proteins. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 7, n. 5, p. 531-538, 2004.
- HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 218-231, 1981.
- HALTON, T. L.; HU, F. B. The effects of high protein diets on thermogenesis, satiety and weight loss: a critical review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 5, p. 373-385, 2004.
- HARAGUCHI, F. K. et al. Whey protein modifies gene expression related to protein metabolism affecting muscle weight in resistance-exercised rats. **Nutrition**, v. 30, n. 7-8, p. 876-881, 2014.
- HARAGUCHI, F. K. et al. Whey protein precludes lipid and protein oxidation and improves body weight gain in resistance-exercised rats. **European journal of nutrition**, v. 50, n. 5, p. 331-339, 2011.
- HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev Nutr**, v. 19, n. 4, p. 479-88, 2006.
- HAYAKAWA, H. et al. Development of a molecular marker to identify a candidate line of turmeric (*Curcuma longa* L.) with a high curcumin content. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 01, p. 15, 2011.
- HE, G.; KARIN, M. NF- κ B and STAT3—key players in liver inflammation and cancer. **Cell research**, v. 21, n. 1, p. 159-168, 2011.
- HE, H. J.; WANG, G. Y.; GAO, Y.; LING, W. H.; YU, Z. W.; JIN, T. R. Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. **World journal of diabetes**, v. 3, n. 5, p. 94-104, 2012.
- HE, Y. et al. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked?. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9183-9213, 2015.

- HEINRICH, P. C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANN, H. M.; MÜLLER-NEUEN, G.; SCHAPER, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochemical journal**, v. 374, n. 1, p. 1-20, 2003.
- HILL, E. E.; ZACK, E.; BATTAGLINI, C.; VIRU, M.; VIRU, A.; HACKNEY, A. C. Exercise and circulating cortisol levels: the intensity threshold effect. **Journal of endocrinological investigation**, v. 31, n. 7, p. 587-591, 2008.
- HOLDER, G. M.; PLUMMER, J. L.; RYAN, A. J. The metabolism and excretion of curcumin (1, 7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3, 5-dione) in the rat. **Xenobiotica**, v. 8, n. 12, p. 761-768, 1978.
- HU, R. W. et al. Curcumin in hepatobiliary disease: Pharmacotherapeutic properties and emerging potential clinical applications. **Annals of hepatology**, v. 16, n. 6, p. 835-841, 2018.
- HUANG, C. C.; HUANG, W. C.; YANG, S. C.; CHAN, C. C.; LIN, W. T. Ganoderma tsugae hepatoprotection against exhaustive exercise-induced liver injury in rats. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1741-1754, 2013.
- HUANG, K. C. et al. Effects of freshwater clam extract supplementation on time to exhaustion, muscle damage, pro/anti-inflammatory cytokines, and liver injury in rats after exhaustive exercise. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 3825-3838, 2013.
- HUANG, W. C. et al. Effect of curcumin supplementation on physiological fatigue and physical performance in mice. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 905-921, 2015.
- HYBERTSON, B. M. et al. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular aspects of medicine**, v. 32, n. 4-6, p. 234-246, 2011.
- ICHINOSEKI-SEKINE, N.; KAKIGI, R.; MIURA, S.; NAITO, H. Whey peptide ingestion suppresses body fat accumulation in senescence-accelerated mouse prone 6 (SAMP6). **European journal of nutrition**, v. 54, n. 4, p. 551-556, 2015.
- JÄGER, R. et al. Comparative absorption of curcumin formulations. **Nutrition journal**, v. 13, n. 1, p. 11, 2014.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; MURTHY, K. N. C.; PATIL, B. S. Enhanced colon cancer chemoprevention of curcumin by nanoencapsulation with whey protein. **European journal of pharmacology**, v. 789, p. 291-300, 2016.
- JECFA. (2004). Curcumin. (Prepared by Ivan Stankovic). Chemical and Technical Assessment Compendium Addendum 11/Fnp 52 Add.11/29; Monographs 1 Vol.1/417.
- JERVIS, S. et al. Effect of bleaching whey on sensory and functional properties of 80% whey protein concentrate. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 6, p. 2848-2862, 2012.
- JURENKA, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of Curcuma longa: a review of preclinical and clinical research. **Alternative medicine review**, v. 14, n. 2, 2009.

KERASIOTI, E.; STAGOS, D.; JAMURTAS, A.; KISKINI, A.; KOUTEDAKIS, Y.; GOUTZOURELAS, N.; POURNARAS, S.; TSATSAKIS, A. M.; KOURETAS, D. Anti-inflammatory effects of a special carbohydrate–whey protein cake after exhaustive cycling in humans. **Food and chemical toxicology**, v. 61, p. 42-46, 2013.

KHAN, I. T.; NADEEM, M.; IMRAN, M.; ULLAH, R.; AJMAL, M.; JASPAL, M. H. Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. **Lipids in health and disease**, v. 18, n. 41, p. 1-14, 2019.

KIMBER, I.; CUMBERBATCH, M.; DEARMAN, R. J.; HEADON, D. R.; BHUSHAN, M.; GRIFFITHS, C. E. Lactoferrin: influences on Langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation. **Biochemistry and cell biology**, v. 80, n. 1, p. 103-107, 2002.

KIZHAKKEDATH, R. Clinical evaluation of a formulation containing *Curcuma longa* and *Boswellia serrata* extracts in the management of knee osteoarthritis. **Molecular medicine reports**, v. 8, n. 5, p. 1542-1548, 2013.

KOCAADAM, B.; ŞANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2889-2895, 2017.

LANIER, A. B. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs following exercise-induced muscle injury. **Sports Medicine**, v. 33, n. 3, p. 177-186, 2003.

LAO, C. D. et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 6, n. 1, p. 10, 2006.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 464-478, 1990.

LI, M. et al. Absorption mechanism of whey-protein-delivered curcumin using Caco-2 cell monolayers. **Food chemistry**, v. 180, p. 48-54, 2015.

LIMA, C. M.; LIMA, A. K.; MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ALBUQUERQUE-JÚNOR, R. L. C.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

LIN, X.; JIANG, C.; LUO, Z.; QU, S. Protective effect of Erythropoietin on renal injury induced in rats by four weeks of exhaustive exercise. **BMC nephrology**, v. 14, n. 1, p. 130, 2013.

LIU, L.; WU, X.; ZHANG, B.; YANG, W.; LI, D.; DONG, Y.; YIN, Y.; CHEN, Q. Protective effects of tea polyphenols on exhaustive exercise-induced fatigue, inflammation and tissue damage. **Food & nutrition research**, v. 61, n. 1, p. 1333390, 2017.

LOPES, D. C. F. et al. Development of a milk drink added of conjugated linoleic acid: use of a sensory evaluation. **American Journal of Food Technology, New York**, v. 4, n. 5, p. 210-217, 2009.

MA, Y.; LIU, J.; SHI, H.; YU, L. L. Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from whey protein. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 9, p. 6902-6912, 2016.

MADADLOU, A.; ABBASPOURRAD, A. Bioactive whey peptide particles: An emerging class of nutraceutical carriers. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 9, p. 1468-1477, 2018.

MAITHILIKARPAGASELVI, N. et al. Preventive effect of curcumin on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in high-fat fed obese rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 13, n. 2, p. 137-143, 2016.

MANGANO, K. M.; SAHNI, S.; KERSTETTER, J. E. Dietary protein is beneficial to bone health under conditions of adequate calcium intake: an update on clinical research. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 17, n. 1, p. 69, 2014.

MANTZOROU, M. et al. Effects of curcumin consumption on human chronic diseases: A narrative review of the most recent clinical data. **Phytotherapy Research**, 2018.

MAZANI, M.; NEMATI, A.; BAGHI, A. N.; AMANI, M.; HAEDARI, K.; ALIPANAH-MOGADAM, R. The effect of probiotic yoghurt consumption on oxidative stress and inflammatory factors in young females after exhaustive exercise. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 68, n. 12, p. 1748-1754, 2018.

MCPHERSON, R. A.; HARDY, G. Clinical and nutritional benefits of cysteine-enriched protein supplements. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 14, n. 6, p. 562-568, 2011.

MENON, V. P.; SUDHEER, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. In: *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*. Springer, Boston, MA, p. 105-125, 2007.

MERRELL, J. G. et al. Curcumin-loaded poly (ϵ -caprolactone) nanofibres: Diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, n. 12, p. 1149-1156, 2009.

MERRILL, A. L.; WATT, B. K. Energy value of foods-basis and derivation, 74th ed. Washinston: U.S. Department of Agriculture, 1955.

MEYDANI, M.; HASAN, S. T. Dietary polyphenols and obesity. **Nutrients**, v. 2, n. 7, p. 737-751, 2010.

MIGNONE, L. E.; WU, T.; HOROWITZ, M.; RAYNER, C. K. Whey protein: The “whey” forward for treatment of type 2 diabetes?. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 14, p. 1274, 2015.

- MITCHELL, C. J.; MCGREGOR, R. A.; D'SOUZA, R. F.; THORSTENSEN, E. B.; MARKWORTH, J. F.; FANNING, A. C.; POPPITT, S. D.; CAMERON-SMITH, D. Consumption of milk protein or whey protein results in a similar increase in muscle protein synthesis in middle aged men. **Nutrients**, v. 7, n. 10, p. 8685-8699, 2015.
- MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- MOORE, D. R. et al. Beyond muscle hypertrophy: why dietary protein is important for endurance athletes. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 39, n. 9, p. 987-997, 2014.
- MOREIRA, R. W. M.; MADRONA, G. S.; BRANCO, I. G.; BERGAMASCO, R.; PEREIRA, N. C. Avaliação sensorial e reológica de uma bebida achocolatada elaborada a partir de extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 435-438, 2010.
- MORTON, R. W. et al. A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of protein supplementation on resistance training-induced gains in muscle mass and strength in healthy adults. **Br J Sports Med**, p. bjsports-2017-097608, 2017.
- MURPHY, C. H.; HECTOR, A. J.; PHILLIPS, S. M. Considerations for protein intake in managing weight loss in athletes. **European journal of sport science**, v. 15, n. 1, p. 21-28, 2015.
- MYTHRI, R. B; BHARATH, M. M. S. Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 1, p. 91-99, 2012.
- NABUCO, H. C. G. et al. Effects of Whey Protein Supplementation Pre-or Post-Resistance Training on Muscle Mass, Muscular Strength, and Functional Capacity in Pre-Conditioned Older Women: A Randomized Clinical Trial. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 563, 2018.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS). **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids**. Washington, DC: National Academy of Sciences, Inst. of Medicine, Food and Nutrition Board, 2005.
- NEHRA, S. et al. Chronic hypobaric hypoxia induces right ventricular hypertrophy and apoptosis in rats: therapeutic potential of nanocurcumin in improving adaptation. **High altitude medicine & biology**, v. 17, n. 4, p. 342-352, 2016.
- NGUYEN, T. A.; FRIEDMAN, A. J. Curcumin: a novel treatment for skin-related disorders. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 12, n. 10, p. 1131-1137, 2013.
- NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory animals**, v. 41, n. 1, p. 111-119, 2007.
- OLIVEIRA, A. R. D. **Medicina Preventiva: saúde versus doenças**. Rio de Janeiro:Biologia e Saúde, 2002.

- ONO, T. et al. Curcumin ameliorates skeletal muscle atrophy in type 1 diabetic mice by inhibiting protein ubiquitination. **Experimental physiology**, v. 100, n. 9, p. 1052-1063, 2015.
- PADDON-JONES, D.; RASMUSSEN, B. B. Dietary protein recommendations and the prevention of sarcopenia: protein, amino acid metabolism and therapy. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 12, n. 1, p. 86, 2009.
- PAN, M. H.; HUANG, T. M.; LIN, J. K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug metabolism and disposition**, v. 27, n. 4, p. 486-494, 1999.
- PAN, M. H.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of I κ B kinase and NF κ B activation in macrophages. **Biochemical pharmacology**, v. 60, n. 11, p. 1665-1676, 2000.
- PANZHINSKIY, E. et al. Novel curcumin derivative CNB-001 mitigates obesity-associated insulin resistance. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 349, n. 2, p. 248-257, 2014.
- PARK, C. W. et al. The effect of acidification of liquid whey protein concentrate on the flavor of spray-dried powder. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 7, p. 4043-4051, 2014.
- PASIAKOS, S. M. Metabolic advantages of higher protein diets and benefits of dairy foods on weight management, glycemic regulation, and bone. **Journal of food science**, v. 80, n. S1, p. A2-A7, 2015.
- PASIAKOS, S. M.; MCCLUNG, J. P. Supplemental dietary leucine and the skeletal muscle anabolic response to essential amino acids. **Nutrition reviews**, v. 69, n. 9, p. 550-557, 2011.
- PATIL, B. S. et al. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8142-8160, 2009.
- PELEGRINE, D. H. G.; GASPARETTO, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 77-80, 2005.
- PEREIRA, S. S.; TEIXEIRA, L. G.; AGUILAR, E. C.; MATOSO, R. O.; SOARES, F. L.; FERREIRA, A. V.; ALVAREZ-LEITE, J. I. **Animal Science Journal**, v. 83, p. 549-555, 2012.
- PERRONE, I. T. et al. Influence of pilot spray dryer settings on moisture and water activity of whole milk powder. **Revista do Instituto De Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, p. 5-9, 2013.
- PESCUMA, M. et al. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 73-81, 2010.
- PETERNELJ, T. T. e COOMBES, J. S. Antioxidant supplementation during exercise training. **Sports medicine**, v. 41, n. 12, p. 1043-1069, 2011.

- PHILLIPS, S. M. A brief review of higher dietary protein diets in weight loss: a focus on athletes. **Sports medicine**, v. 44, n. 2, p. 149-153, 2014.
- PHILLIPS, S. M. Physiologic and molecular bases of muscle hypertrophy and atrophy: impact of resistance exercise on human skeletal muscle (protein and exercise dose effects). **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, v. 34, n. 3, p. 403-410, 2009.
- PHILLIPS, S. M.; CHEVALIER, S.; LEIDY, H. J. Protein “requirements” beyond the RDA: implications for optimizing health. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 41, n. 5, p. 565-572, 2016.
- PHILLIPS, S. M.; VAN LOON, L. J. C. Dietary protein for athletes: from requirements to optimum adaptation. **Journal of sports sciences**, v. 29, n. sup1, p. S29-S38, 2011.
- PILLON BARCELOS, R.; FREIRE ROYES, L. F.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; BRESCIANI, G. Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise. **Free radical research**, v. 51, n. 2, p. 222-236, 2017.
- PIMENTA, F. M. V.; ABECIA-SORIA, M. I.; AULER, F.; AMAYA-FARFAN, J. Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. **International dairy journal**, v. 16, n. 9, p. 984-991, 2006.
- POWERS, S. K.; NELSON, W. B.; HUDSON, M. B. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 942-950, 2011.
- PRASAD, S. et al. Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 6, p. 1053-1064, 2014.
- PULIDO-MORAN, M.; MORENO-FERNANDEZ, J.; RAMIREZ-TORTOSA, C.; RAMIREZ-TORTOSA, M. Curcumin and health. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 264, 2016.
- RAHMANI, A. H. et al. Role of Curcumin in Disease Prevention and Treatment. **Advanced biomedical research**, v. 7, 2018.
- RAY, A. et al. Improved bioavailability of targeted curcumin delivery efficiently regressed cardiac hypertrophy by modulating apoptotic load within cardiac microenvironment. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 290, p. 54-65, 2016.
- RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular signalling**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **American Institute of Nutrition**, n. 123, p.1939-51, 1993.

REN, G.; YI, S.; ZHANG, H.; WANG, J. Ingestion of soy–whey blended protein augments sports performance and ameliorates exercise-induced fatigue in a rat exercise model. **Food & function**, v. 8, n. 2, p. 670-679, 2017.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

SAHEBKAR, A. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials investigating the effects of curcumin on blood lipid levels. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 3, p. 406-414, 2014.

ŞAHİN, E.; GÜMÜŞLÜ, S. Immobilization stress in rat tissues: alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 144, n. 4, p. 342-347, 2007.

SAHIN, K.; PALA, R.; TUZCU, M.; OZDEMIR, O.; ORHAN, C.; SAHIN, N.; JUTURU, V. Curcumin prevents muscle damage by regulating NF- κ B and Nrf2 pathways and improves performance: an in vivo model. **Journal of inflammation research**, v. 9, p. 147-154, 2016.

SALEM, N. I. S.; NOSHY, M. M.; SAID, A. A. Modulatory effect of curcumin against genotoxicity and oxidative stress induced by cisplatin and methotrexate in male mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 370-376, 2017.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 223-229, 2017.

SANTOS-ALVES, E.; MARQUES-ALEIXO, I.; COXITO, P.; BALÇA, M. M.; RIZO-ROCA, D.; ROCHA-RODRIGUES, S. et al. Exercise mitigates diclofenac-induced liver mitochondrial dysfunction. **European journal of clinical investigation**, v. 44, n. 7, p. 668-677, 2014.

SCHAFFER, M.; SCHAFFER, P. M.; BAR-SELA, G. An update on Curcuma as a functional food in the control of cancer and inflammation. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 18, n. 6, p. 605-611, 2015.

SCHNEIDER, M.; ESPOSITO, D.; LILA, M. A.; FOEGEDING, E. A. Formation of whey protein–polyphenol meso-structures as a natural means of creating functional particles. **Food & function**, v. 7, n. 3, p. 1306-1318, 2016.

SCHOENFELD, B. J.; ARAGON, A. A. How much protein can the body use in a single meal for muscle-building? Implications for daily protein distribution. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 10, 2018.

SCIBERRAS, J. N. et al. The effect of turmeric (Curcumin) supplementation on cytokine and inflammatory marker responses following 2 hours of endurance cycling. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 12, n. 1, p. 5, 2015.

SEO, K. I.; CHOI, M. S.; JUNG, U. J.; KIM, H. J.; YEO, J.; JEON, S. M.; LEE, M. K. Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic db/db mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 9, p. 995-1004, 2008.

SETHI G. et al. The Multifaceted Role of Curcumin in Cancer Prevention and Treatment. **Molecules**, Suíça, v.20, n. 2, p.2728-2729, 2015.

SGARBIERI, V. C. et al. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, 2004.

SHAW, D. M. et al. T-cells and their cytokine production: the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of strenuous exercise. **Cytokine**, 2017.

SHEHZAD, A.; REHMAN, G.; LEE, Y. S. Curcumin in inflammatory diseases. **Biofactors**, v. 39, n. 1, p. 69-77, 2013.

SHEIKHOESLAMI, D. V.; AHMADI, F. K. G. Changes in antioxidant status and cardiovascular risk factors of overweight young men after six weeks supplementation of whey protein isolate and resistance training. **Appetite**, v. 59, n. 3, p. 673-678, 2012.

SHIMIZU, N.; DAIRIKI, K.; OGAWA, S.; KANEKO, T. Dietary whey protein hydrolysate suppresses development of atopic dermatitis-like skin lesions induced by mite antigen in NC/Nga mice. **Allergology International**, v. 55, n. 2, p. 185-189, 2006.

SILVA, K.; BOLINI, H. M. A.; ANTUNES, A. J. Soro de leite bovino em sorvete. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 187-196, 2004.

SILVA, L. V.; SOUZA, S. V. C. D. Qualidade de suplementos proteicos: avaliação da composição e rotulagem. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, n. 1703, p. 1-17, 2016.

SINGH, S. From exotic spice to modern drug?. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 765-768, 2007.

SINGLETON, V. L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIQUEIRA, A. M. O.; MACHADO, E. C. L.; STAMFORD, T. L. M. Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 9, p. 1693-1700, 2013.

SMITH, T. J. et al. High protein diet maintains glucose production during exercise-induced energy deficit: a controlled trial. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 1, p. 26, 2011.

STROBEL, N. A. et al. Antioxidant supplementation reduces skeletal muscle mitochondrial biogenesis. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 6, p. 1017-24, 2011.

SUDA, J. Y. et al. Desenvolvimento de leite de vida de prateleira estendido pelo uso de tecnologia de microfiltração. **Rev. Indústr. Laticínios**, p. 139-143, 2011.

SUNAMI, Y.; LEITHÄUSER, F.; GUL, S.; FIEDLER, K.; GÜLDIKEN, N.; ESPENLAUB, S. et al. Hepatic activation of IKK/NFκB signaling induces liver fibrosis via macrophage-mediated chronic inflammation. **Hepatology**, v. 56, n. 3, p. 1117-1128, 2012.

SVANBORG, S. et al. The composition and functional properties of whey protein concentrates produced from buttermilk are comparable with those of whey protein concentrates produced from skimmed milk. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 9, p. 5829-5840, 2015.

SYED, H. K. et al. Stability indicating HPLC–UV method for detection of curcumin in Curcuma longa extract and emulsion formulation. **Food chemistry**, v. 170, p. 321-326, 2015.

TAKAHASHI, M. et al. Effects of curcumin supplementation on exercise-induced oxidative stress in humans. **International journal of sports medicine**, v. 35, n. 06, p. 469-475, 2014.

TALÓN, E.; LAMPI, A. M.; VARGAS, M.; CHIRALT, A.; JOUPPILA, K.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Encapsulation of eugenol by spray-drying using whey protein isolate or lecithin: Release kinetics, antioxidant and antimicrobial properties. **Food chemistry**, v. 295, p. 588-598, 2019.

TANABE, Y. et al. Attenuation of indirect markers of eccentric exercise-induced muscle damage by curcumin. **European journal of applied physiology**, v. 115, n. 9, p. 1949-1957, 2015.

TANG, M.; O'CONNOR, L. E.; CAMPBELL, W. W. Diet-induced weight loss: the effect of dietary protein on bone. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 114, n. 1, p. 72-85, 2014.

TEIXEIRA, K. R. et al. Whey protein increases muscle weight gain through inhibition of oxidative effects induced by resistance exercise in rats. **Nutrition Research**, v. 36, n. 10, p. 1081-1089, 2016.

TIETZ, N. W.; BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. Fundamentos de Química Clínica, 6 ed., Elsevier, 2008.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, v. 851, n. 1-2, p. 51-70, 2007.

TURLIN, B. et al. Histologic features of the liver in insulin resistance–associated iron overload. A Study of 139 Patients. **American Journal of Clinical Pathology**, v.116, n.2, p.263-270, 2001.

VALE, A. F.; FERREIRA, H. H.; BENETTI, E. J.; REBELO, A. C. S.; FIGUEIREDO, A. C. R.; BARBOSA, E. C.; SIMÕES, K. Antioxidant effect of the pequi oil (Caryocar brasiliense) on the hepatic tissue of rats trained by exhaustive swimming exercises. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 2, p. 257-262, 2018.

- VELÁZQUEZ-ALVA, M. C. et al. The relationship between sarcopenia, undernutrition, physical mobility and basic activities of daily living in a group of elderly women of Mexico City. **Nutricion hospitalaria**, v. 28, n. 2, 2013.
- VELDHORST, M. A.; NIEUWENHUIZEN, A. G.; HOCHSTENBACH-WAELEN, A.; VAN VUGHT, A. J.; WESTERTERP, K. R.; ENGELEN, M. P.; BRUMMER, R. J. M.; DEUTZ, N. E. P.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Dose-dependent satiating effect of whey relative to casein or soy. **Physiology & behavior**, v. 96, n. 4-5, p. 675-682, 2009.
- VENDETTI, P.; Di MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 331, p. 63-68, 1996.
- WAHLSTRÖM, B.; BLENNOW, G. A study on the fate of curcumin in the rat. **Acta pharmacologica et toxicologica**, v. 43, n. 2, p. 86-92, 1978.
- WALLIN, B. et al. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 208, n. 1, p. 10-15, 1993.
- WANG, J. et al. The pharmacokinetics and tissue distribution of curcumin and its metabolites in mice. **Biomedical Chromatography**, p. e4267, 2018.
- WANG, X.; ZHANG, J.; LEI, F.; LIANG, C.; YUAN, F.; GAO, Y. Covalent complexation and functional evaluation of (-)-epigallocatechin gallate and α -lactalbumin. **Food chemistry**, v. 150, p. 341-347, 2014.
- WAWRZYNIAK, A. et al. α -Tocopherol, ascorbic acid, and β -carotene protect against oxidative stress but reveal no direct influence on p53 expression in rats subjected to stress. **Nutrition research**, v. 33, n. 10, p. 868-875, 2013.
- WEITZEL, L. R. B.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine in critical illness: the time has come, the time is now. **Critical care clinics**, v. 26, n. 3, p. 515-525, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, United Nations Univ. **Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation**. WHO Technical Report Series 935. Geneva, Switzerland, 2011.
- WRÓBLEWSKA, B. et al. The effects of whey and soy proteins on growth performance, gastrointestinal digestion, and selected physiological responses in rats. **Food & function**, v. 9, n. 3, p. 1500-1509, 2018.
- WU, G. L.; CHEN, Y. S.; HUANG, X. D.; ZHANG, L. X. Exhaustive swimming exercise related kidney injury in rats—Protective effects of acetylbritannilactone. **International journal of sports medicine**, v. 33, n. 01, p. 1-7, 2012.
- XU, R. et al. Antioxidative effects of whey protein on peroxide-induced cytotoxicity. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 8, p. 3739-3746, 2011.

YI, J.; ZHANG, Y.; LIANG, R.; ZHONG, F.; MA, J. Beta-carotene chemical stability in nanoemulsions was improved by stabilized with beta-lactoglobulin–catechin conjugates through free radical method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 1, p. 297-303, 2014.

YOUSEFIAN, M.; SHAKOUR, N.; HOSSEINZADEH, H.; HAYES, A. W.; HADIZADEH, F.; KARIMI, G. The natural phenolic compounds as modulators of NADPH oxidases in hypertension. **Phytomedicine**, v. 55, p. 200-213, 2019.

ZANDI, K. et al. Evaluation of antiviral activities of curcumin derivatives against HSV-1 in Vero cell line. **Natural product communications**, v. 5, n. 12, p. 1935-1938, 2010.

ZBINDEN-FONCEA, H.; RAYMACKERS, J. M.; DELDICQUE, L.; RENARD, P.; FRANCAUX, M. TLR2 and TLR4 activate p38 MAPK and JNK during endurance exercise in skeletal muscle. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 44, n. 8, p. 1463-1472, 2012.

ZHANG, Q. X. et al. Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 11, p. 2001-2006, 2012.

ZIEGLER, F. L. F. et al. Caracterização químico-nutricional de um isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. **Revista de Nutrição**, 2009.

ZOU, L. et al. Designing excipient emulsions to increase nutraceutical bioavailability: emulsifier type influences curcumin stability and bioaccessibility by altering gastrointestinal fate. **Food & function**, v. 6, n. 8, p. 2475-2486, 2015.

9. ANEXOS

9.1. Anexo I – Composição centesimal da Theracurmin®

Value creation through innovation



THERAVALUES CORPORATION

1F, Kioicho Building,3-12, Kioicho, Chiyoda-ku,Tokyo 102-0094,Japan
<http://theravalues.com/english/index.html>

NUTRITIONAL DATA ANALYSIS

Sample Theracurmin CR-033P

| Test Item | Result | Detection Limit | Note | Method |
|---|--------------|-----------------|------|------------------------------------|
| Water | 3.1g/100g | - | | Heat under Reduced Pressure Method |
| Protein | 0.6g/100g | - | 1 | Kjeldahl Method |
| Lipid | 1.4 g/100g | - | | Thermal Decomposition Method |
| Ash | 0.3 g/100g | - | | Direct Ashing Method |
| Carbohydrate | 94.6 g/100g | - | 2 | - |
| Energy | 393kcal/100g | - | 3 | - |
| Sodium | 7.2mg/100g | - | | Atomic Absorption Method |
| Nacl equivalent | 0.018g/100g | - | 4 | - |
| Fe | 0.32mg/100g | - | | ICP Atomic Emission Spectroscopy |
| Ca | 95.2mg/100g | - | | ICP Atomic Emission Spectroscopy |
| Vitamin A (Retinol Activity Equivalent) | | | 5 | |
| Retinol | Not Detected | 3µg/100g | | HPLC |
| α-Carotene | Not Detected | 6µg/100g | | HPLC |
| β-Carotene | Not Detected | 6µg/100g | 6 | HPLC |
| Total Ascorbic Acid | Not Detected | 1mg/100g | 7 | HPLC |
| Fructose | Not Detected | 0.05g/100g | | HPLC |
| Glucose | 1.62/100g | - | | HPLC |
| Sucrose | Not Detected | 0.05g/100g | | HPLC |
| Maltose | 25.5g/100g | - | | HPLC |
| Lactose | Not Detected | 0.05g/100g | | HPLC |
| Galactose | Not Detected | 0.05g/100g | | HPLC |
| Saturated Fatty acid | Not Detected | 0.01g/100g | | GC |
| Trans Fatty Acid | Not Detected | 0.05g/100g | 8 | GC |
| Cholesterol | Not Detected | 1mg/100g | | GC |
| Total Fat | 1.4g/100g | 0.01g/100g | | ICP |
| Potassium | 57mg/100g | 1mg/100g | | ICP |
| Vitamin D | 0µg/100g | 1000mcg/100g | | GC |
| Added Sugars | 38g/100g | 0.1g/100g | 9 | GC |

Note1. Nitrogen-protein Scale Factor:6.25

Note2. Calculation Formula (The Food Labelling Standard, 2015 Cabinet Office Ordinance No.10): 100-(water+Protein+Lipid+Ash)

Note3. Calculation Formula (The Food Labelling Standard, 2015 Cabinet Office Ordinance No.10): 100-(water+Protein+Lipid+Ash+Dietary)

Note4. Calculation Formula $Na \times 2.54$

Note5. Not calculated due to not detected

Note6. By The Food Labelling Standard, 2015 Cabinet Office Ordinance No.10)

Note7. Modified by hydrazine, first.

Note8. Measurement Object: Carbon 14-22 monounsaturated fatty acid and carbon 18 di- and tri-trans fatty acid (Ref. AOAC 996.06, AOCS Co)

Note9. Including Maltose 30% (Composition ratio)

For and Behalf of : THERAVALUES CORPORATION
 Position : Director

Signature : 
 Kim Young Min.

Date : ...July 31, 2018.....

9.2. Anexo II – Certificado de Aprovação no CEUA/UFV

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 72/2018, intitulado **“Whey protein concentrado adicionado de cúrcuma: efeitos sobre parâmetros bioquímicos inflamatórios, antioxidantes e histológicos de ratos Wistar submetidos a exercício exaustivo”**, coordenado pela professora Ceres Mattos Della Lucia do Departamento de Nutrição e da Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 12/11/2018, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 72/2018, named **“Whey protein concentrate added to turmeric: effects on inflammatory, antioxidant and histological biochemical parameters of Wistar rats undergoing exhaustive exercise”**, is in agreement with the a actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on November 12, 2018 valid for 12 months.



Prof.ª Átima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV