

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

CLÁUDIA CANTELLI DAUD BORDIN

---

---

**EFICÁCIA ALIMENTAR E QUALIDADE PROTEICA DE  
MISTURAS DE CASEÍNA COM GELATINA EM DIETAS  
COM BAIXOS TEORES DE PROTEÍNA**

---

---

Goiânia  
2012

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS  
TESES E  
DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**    ☒ **Dissertação**    ☐ **Tese**

## 2. Identificação da Tese ou Dissertação

|                                                                                                                             |        |                                                                                                 |                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Autor (a):                                                                                                                  |        | Cláudia Cantelli Daud Bordin                                                                    |                          |
| E-mail:                                                                                                                     |        | ccdaudnut@yahoo.com.br                                                                          |                          |
| Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não         |        |                                                                                                 |                          |
| Vínculo empregatício do autor                                                                                               |        | Secretaria Municipal de Saúde - Goiânia                                                         |                          |
| Agência de fomento:                                                                                                         |        |                                                                                                 | Sigla: SMS Goiânia       |
| País:                                                                                                                       | Brasil | UF:GO                                                                                           | CNPJ: 25.141.524/0001-23 |
| Título: Eficácia alimentar e qualidade proteica de misturas de caseína com gelatina em dietas com baixos teores de proteína |        |                                                                                                 |                          |
| Palavras-chave:                                                                                                             |        | Caseína, colágeno hidrolisado, gelatina, proteína, ratos, utilização biológica.                 |                          |
| Título em outra língua:                                                                                                     |        | Food and protein efficiency mixtures of gelatin with casein in diets with low levels of protein |                          |
| Palavras-chave em outra língua:                                                                                             |        | casein, collagen hydrolysate, gelatin, protein, rats, biological utilization                    |                          |
| Área de concentração:                                                                                                       |        | Nutrição                                                                                        |                          |
| Data defesa: (dd/mm/aaaa)                                                                                                   |        | 03/02/2012                                                                                      |                          |
| Programa de Pós-Graduação:                                                                                                  |        | Nutrição e Saúde                                                                                |                          |
| Orientador (a):                                                                                                             |        | Dra. Maria Margareth Veloso Naves                                                               |                          |
| E-mail:                                                                                                                     |        | mnaves@fanut.ufg.br                                                                             |                          |

### 3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura do (a) autor (a)

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

CLÁUDIA CANTELLI DAUD BORDIN

---

**EFICÁCIA ALIMENTAR E QUALIDADE PROTEICA DE  
MISTURAS DE CASEÍNA COM GELATINA EM DIETAS  
COM BAIXOS TEORES DE PROTEÍNA**

---

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Nutrição e Saúde da  
Faculdade de Nutrição da Universidade  
Federal de Goiás, como exigência para  
obtenção do Título de Mestre em Nutrição  
e Saúde.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Margareth  
Veloso Naves

Linha de pesquisa: Qualidade de alimentos  
e dietas

Goiânia  
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**GPT/BC/UFG**

B729e Bordin, Cláudia Cantelli Daud.  
Eficácia alimentar e qualidade proteica de misturas de caseína com gelatina em dietas com baixos teores de proteína [manuscrito] / Cláudia Cantelli Daud Bordin. - 2012.  
60 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Margareth Veloso Naves.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Nutrição, 2012.  
Bibliografia.  
Anexos.

1. Dietas – Eficácia alimentar – Qualidade. 2. Caseína.  
4. Gelatina. I. Título.

CDU:613.24

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

**Aluno(a): Cláudia Cantelli Daud Bordin**

---

**Orientador(a): Profª Drª Maria Margareth Veloso Naves**

### **Membros:**

**1. Maria Margareth Veloso Naves – presidente da banca**

**2. Alceu Afonso Jordão Junior**

**3. Maria Sebastiana Silva**

### **Membros suplentes**

Caroline Dário Capitani

Maria Luiza Ferreira Stringhini

**Data: 03/02/2012**

*Dedico este trabalho aos anjos que fizeram parte da minha vida por um curto período de tempo, mas que trouxe mais amor que eu poderia acreditar que existia...*

## **AGRADECIMENTOS**

---

A Deus.

Ao meu esposo, Gabriel Mariotto Bordin, que sempre me apoiou, pela força e amor.

Aos meus pais, Romeu Daud e Ercília Cantelli Daud, pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, pelo incentivo e compreensão de minhas ausências.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Margareth Veloso Naves, pela excelente orientação que me prestou e pelo apoio nas diferentes fases que ocorreram nesse período.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mara Reis Silva (Faculdade de Nutrição - UFG), pela orientação sempre quando precisei.

Aos demais membros da banca, pela solicitude em contribuir neste trabalho.

Às minhas colegas de mestrado, pelos momentos de descontração, troca de experiências e dificuldades.

À nutricionista e mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Daniela Canuto Fernandes, pelo apoio na análise estatística.

Às acadêmicas em Nutrição Natália Aparecida de Souza, Gabriela Lima Santiago e Renata de Paula Ribeiro, pelo apoio no ensaio biológico.

Ao técnico Tiago Dias, do Laboratório de Análise de Alimentos (LANAAL – FANUT/UFG), pelo apoio nas análises químicas.

Aos meus amigos e alunos na Universidade Paulista, que me apoiaram.

Aos meus colegas de trabalho na Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia, pelo apoio e incentivo.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

---

A gelatina é amplamente utilizada na alimentação humana, porém tem valor proteico limitado. Sua composição em aminoácidos essenciais é bastante atípica, uma vez que os teores de todos esses aminoácidos são inferiores ao padrão de referência do Comitê de Nutrição e Alimentos do Instituto de Medicina da Academia Nacional de Ciências dos EUA (Food and Nutrition Board – FNB, Institute of Medicine – IOM), com o agravante de não conter triptofano em sua composição. Este estudo avaliou a eficácia alimentar e a qualidade proteica de misturas de caseína com gelatina (4:1 em base proteica), em dietas com baixos teores de proteína. Foi realizado um estudo experimental em modelo animal com 36 ratos albinos da linhagem Wistar, machos, recém-desmamados (21 a 23 dias de idade), divididos em seis grupos de seis animais cada. Foram alimentados com as seguintes dietas: C<sub>10</sub>: 10% proteína (caseína); C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>: 10% proteína (8% caseína; 2% gelatina); C<sub>12,5</sub>: 12,5% proteína (caseína); C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub>: 12,5% proteína (10% caseína; 2,5% gelatina); G<sub>10</sub>: 10% proteína (gelatina); AP: aprotéico. A duração do experimento foi de 28 dias para os grupos C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>, C<sub>12,5</sub> e C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub> e de 14 dias para os grupos G<sub>10</sub> e AP. A eficácia alimentar das dietas contendo a mistura caseína:gelatina foi influenciada pela gelatina, segundo o Fator de Conversão Alimentar, ao nível proteico de 10% (C<sub>10</sub> = 3,35 ± 0,19 versus C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> = 3,91 ± 0,34) e na suplementação com gelatina (C<sub>10</sub> = 3,35 ± 0,19 versus C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub> = 3,86 ± 0,32). A eficácia proteica foi reduzida tanto ao nível proteico de 10% (C<sub>10</sub> = 2,90 ± 0,17 versus C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> = 2,41 ± 0,22) quanto ao nível proteico de 12,5% (C<sub>12,5</sub> = 2,32 ± 0,19 versus C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub> = 2,03 ± 0,16) e na suplementação com gelatina (C<sub>10</sub> = 2,90 ± 0,17 versus C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub> = 2,03 ± 0,16) segundo o PER (Protein Efficiency Ratio). Os animais que consumiram gelatina (G<sub>10</sub>) apresentaram perda de peso corpóreo, semelhante aos do grupo aprotéico. A gelatina em misturas de caseína com gelatina (4:1 em base proteica), em dietas com baixo teor de proteína, reduz a eficácia alimentar e proteica da caseína.

Palavras-chave: caseína, colágeno hidrolisado, gelatina, proteína, ratos, utilização biológica.



## ABSTRACT

---

Gelatin is widely used in human feed, but has limited protein value. The composition in essential amino acids is quite atypical, since the levels of all the amino acids are below the benchmark of Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine of the National Academy of Sciences of USA (FNB/IOM), with the aggravating not contain tryptophan in its composition. This study evaluated the effectiveness of food and the quality of protein mixtures of casein with gelatin (4:1 protein-based), in diets with low protein levels. An experimental study on animal model using 36 weaning male Wistar rats (21 to 23 days of age), divided into six groups of six animals each. The following were fed with diets: C<sub>10</sub>: 10% protein (casein); C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>: 10% protein (8% casein; 2% gelatin); C<sub>12.5</sub>: 12.5% protein (casein); C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub>: 12.5% protein (10% casein; 2.5% gelatin); G<sub>10</sub>: 10% protein (gelatin); AP: protein-free. The duration of the experiment was 28 days for groups C<sub>10</sub>; C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>; C<sub>12.5</sub> e C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub> and 14 days for groups G<sub>10</sub> e AP. The effectiveness of food diets containing mixing casein:gelatin was influenced by the gelatin, according to the Food Conversion Ratio to protein level of 10% (C<sub>10</sub> = 3.35 ± 0.19 versus C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> = 3.91 ± 0.34) and in supplementation with gelatin (C<sub>10</sub> = 3.35 ± 0.19 versus C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub> = 3.86 ± 0.32). The protein effectiveness was reduced in the protein level of 10% (C<sub>10</sub> = 2.90 ± 0.17 versus C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> = 2.41 ± 0.22), in protein level of 12.5% (C<sub>12.5</sub> = 2.32 ± 0.19 versus C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub> = 2.03 ± 0.16) and supplementation with gelatin (C<sub>10</sub> = 2.90 ± 0.17 versus C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub> = 2.03 ± 0.16) according PER (Protein Efficiency Ratio). The animals that consumed gelatin (G<sub>10</sub>) had similar weight loss to the protein-free group. Gelatin in mixtures of casein with gelatin (4:1 protein-based), in diets with low protein content, reduces the effectiveness of food protein of casein.

**Keywords:** casein, collagen hydrolysate, gelatin, protein, rats, biological utilization

## SUMÁRIO

---

|          |                                                    |           |
|----------|----------------------------------------------------|-----------|
|          | <b>CAPÍTULO 1 .....</b>                            | <b>9</b>  |
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                            | <b>9</b>  |
| 1.1      | QUALIDADE PROTEICA DA GELATINA.....                | 9         |
| 1.2      | USO DA GELATINA NA PRÁTICA CLÍNICA.....            | 11        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                              | <b>14</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL.....                                | 14        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                         | 14        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                    | <b>15</b> |
| 3.1      | TIPO DE ESTUDO.....                                | 15        |
| 3.2      | ENSAIO BIOLÓGICO.....                              | 15        |
| 3.3      | ANÁLISES QUÍMICAS.....                             | 19        |
| 3.4      | DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA ALIMENTAR E PROTEICA..... | 21        |
| 3.5      | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                           | 22        |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                            | <b>23</b> |
|          | <b>CAPÍTULO 2 - Artigo Científico.....</b>         | <b>26</b> |
|          | <b>CAPÍTULO 3 - Considerações finais.....</b>      | <b>48</b> |
|          | <b>ANEXOS.....</b>                                 | <b>49</b> |

## **CAPÍTULO 1**

---

### **1 INTRODUÇÃO**

#### **1.1 QUALIDADE PROTEICA DA GELATINA**

A gelatina ou colágeno parcialmente hidrolisado é uma mistura solúvel de polipeptídeos obtida a partir da degradação enzimática do colágeno, que é produzido em escala industrial a partir de matéria-prima animal. O colágeno é uma proteína animal insolúvel e o maior constituinte do tecido conectivo de animais (KARIM; BHAT, 2008).

Nutricionalmente, a gelatina é considerada uma proteína incompleta. Sua composição em aminoácidos indispensáveis (essenciais) é bastante atípica, uma vez que os teores de todos esses aminoácidos são inferiores ao padrão de referência do Comitê de Nutrição e Alimentos do Instituto de Medicina da Academia Nacional de Ciências dos EUA (Food and Nutrition Board – FNB, Institute of Medicine – IOM) (IOM, 2005), com o agravante de não conter triptofano em sua composição (Tabela 1). O único aminoácido essencial cuja concentração é próxima à do padrão é a lisina, sendo que o restante atinge aproximadamente 50% da necessidade de aminoácidos essenciais de crianças de um a três anos de idade (ANGELIS; TIRAPEGUI, 2007; OESSERT; SEIFERT, 2003).

Vale acrescentar que aminoácido essencial (indispensável) é aquele que o organismo não é capaz de sintetizar, ou seja, a capacidade endógena para a sua formação é assumido como sendo zero, mas é requerido para seu funcionamento. Para satisfazer a demanda metabólica, a proteína da dieta deve conter quantidades nutricionalmente adequadas e digestíveis de

aminoácidos indispensáveis (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) (WHO, 2007).

Desde o início do século 19, a gelatina vem sendo utilizada como fonte proteica. A partir de então, iniciaram os estudos sobre suas propriedades, que se estendem a pesquisas *in vitro* e *in vivo*, tanto em modelo animal quanto em humanos. Mais recentemente, a qualidade proteica da gelatina foi investigada por Ziengler e Sgarbieri (2009), que avaliaram a composição de aminoácidos e a qualidade proteica *in vivo* de um hidrolisado de colágeno bovino, um isolado proteico de soro de leite bovino, e de misturas dessas proteínas, em diferentes proporções. O perfil de aminoácidos essenciais confirmou que o hidrolisado de colágeno bovino apresenta deficiência de todos os aminoácidos essenciais, particularmente os sulfurados, e completa ausência de triptofano. Tal fato gera um escore de aminoácidos essenciais (EAE) igual a zero. No mesmo estudo, dados do ensaio biológico demonstrou que a limitação em aminoácidos essenciais da gelatina, pois o crescimento dos animais foi comprometido em dietas com maior teor de proteína proveniente da gelatina.

**Tabela 1.** Composição em aminoácidos da gelatina e do padrão de referência.

| Aminoácidos essenciais<br>(mg de aminoácidos/g de proteína) | Gelatina <sup>1</sup> | Padrão<br>FBN/IOM <sup>2</sup> |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Histidina                                                   | 9,8                   | 18,0                           |
| Isoleucina                                                  | 13,1                  | 25,0                           |
| Leucina                                                     | 27,6                  | 55,0                           |
| Lisina                                                      | 49,9                  | 51,0                           |
| Metionina + cistina                                         | 11,6                  | 25,0                           |
| Fenilalanina + tirosina                                     | 21,8                  | 47,0                           |
| Treonina                                                    | 17,5                  | 27,0                           |
| Triptofano                                                  | 0,0                   | 7,0                            |
| Valina                                                      | 17,3                  | 32,0                           |

<sup>1</sup> Fonte: Naves et al. (2006).

<sup>2</sup> Corresponde à necessidade de aminoácidos essenciais de crianças de um a três anos de idade (IOM, 2005).

A qualidade proteica da gelatina também foi avaliada por Naves et al. (2006), em estudo com ratos Wistar, recém-desmamados. Os animais foram tratados com dietas contendo 10% de proteína de diferentes fontes: caseína, formulado proteico, gelatina e misturas de caseína com formulado proteico e

caseína com gelatina, na proporção de 30% de gelatina. A gelatina, quando administrada em animais em crescimento como única fonte de proteína, induziu à perda de peso de forma semelhante ou até mais acentuada que uma dieta aprotéica. Além disso, obteve-se um efeito negativo da gelatina no crescimento dos ratos tratados com a mistura caseína-gelatina, em relação às demais fontes proteicas.

A gelatina, além de não ser uma boa fonte proteica, pode reduzir o consumo de dietas pelos animais, conforme observado no estudo de Naves et al. em que os animais tratados somente com gelatina consumiram dieta em quantidades significativamente inferiores às dos demais grupos de ratos. A modulação do apetite de animais em função da qualidade proteica da dieta oferecida foi descrita por Gomes et al. (2003), tendo sido constatado que dietas restritas em proteínas ou deficientes em aminoácidos essenciais são rejeitadas pelo rato. Gietzen, Hao e Anthony (2007) observaram que esse comportamento é adaptável à contínua depleção de aminoácidos essenciais. Além disso, o rato ingere menos que sua necessidade energética, o que potencializa a falta de aminoácidos essenciais para seu crescimento. Nessa situação, ocorre uma redução da taxa de síntese proteica endógena, conduzindo a perdas de massa muscular e tecido gorduroso. Tal fato agrava a desnutrição proteica de animais que consomem dietas com baixa qualidade proteica, como as dietas com gelatina. Sendo assim, o consumo de gelatina é incompatível com a manutenção da síntese proteica endógena e sobrevivência.

## 1.2 USO DA GELATINA NA PRÁTICA CLÍNICA

A ação da gelatina como redutora de apetite tem sido usada em humanos com finalidade de emagrecimento, uma vez que, tem-se evidenciado que proteína deficiente em aminoácidos, como a gelatina, pode reduzir o apetite em humanos. A detecção no cérebro de uma deficiência de aminoácidos essenciais, e declínio desses aminoácidos em níveis séricos, podem levar a uma resposta comportamental de rejeição de dietas

desequilibradas, suprimindo assim a fome. Em humanos, a qualidade proteica da dieta e sua relação com a saciedade foi estudada por Veldhorst et al. (2009), em que compararam o efeito de diferentes fontes proteicas no jejum, em duas concentrações proteicas (10 e 25%), na subsequente saciedade e ingestão energética. Os autores observaram que, após o consumo de uma refeição contendo gelatina, o apetite diminuiu e a ingestão energética da refeição subsequente foi menor.

O mesmo efeito foi estudado por Hochstenbach-Waelen et al. (2009), que avaliaram em humanos, o consumo de caseína e gelatina como fontes proteicas, em dietas com 10% ou 25% do valor energético total advindo dessas proteínas. Houve menor apetite ao consumir dieta com gelatina, quando comparada com a caseína. Os autores justificam que, a diminuição da concentração plasmática de alguns aminoácidos essenciais pode levar a um efeito anorexígeno. Além disso, sugerem que quantidades insuficientes de certos aminoácidos essenciais constituem um fator limitante para a síntese pós-prandial, resultando em uma maior oxidação de aminoácidos livres.

Outro mecanismo que pode explicar o efeito anorexígeno da gelatina apontado na literatura, é que os aminoácidos também estimulam a secreção de insulina, podendo assim potencializar a ação da glicose, o que resulta na diminuição ou manutenção dos níveis sanguíneos de glicose. Além disso, o catabolismo de aminoácidos advindos da gelatina aumenta a energia gasta para síntese de ATP. Com isso, tem-se a hipótese de que o consumo de gelatina pode exercer um aumento no gasto energético (BOIRIE et al., 1997; HAO et al., 2005; MAURIN et al., 2005).

A gelatina também é utilizada como agente terapêutico na osteoartrite e osteoporose, por causa de sua capacidade evidenciada de estimular a síntese endógena de cartilagens, quando utilizada por tempo prolongado (MOSKOWITZ, 2000). Em contrapartida, a prática do consumo de gelatina com objetivos estéticos na prevenção do envelhecimento e no crescimento e fortalecimento capilar e das unhas, se baseia no senso comum, sem evidências científicas, pois não há na literatura registros que comprovem a efetividade desta prática.

Além disso, a gelatina é um alimento frequentemente usado em dietas hospitalares restritivas, as quase são nutricionalmente inadequadas em todos os nutrientes e indicadas para o preparo e o pós-operatório de cirurgias do trato gastrointestinal, bem como no início da realimentação via oral, quando essa via foi suspensa por período prolongado (MARTINS et al., 2001). Neste caso, a gelatina pode ser prejudicial, pois a resposta fibroblástica às feridas é reduzida pela depleção de proteínas e energia, resultando em uma cicatrização mais lenta. Com essa depleção, ocorre a inibição da proliferação fibroblástica, prolongamento da fase inflamatória, redução da síntese de colágeno, redução da força tênsil da ferida e consequente aumento da taxa de infecção (WAITZBERG, 2009). Portanto, a utilização de gelatina como uma das principais fontes proteicas em dietas restritivas poderia comprometer a cicatrização e aumentar o risco de infecção pós-cirúrgica.

Considerando a ampla utilização da gelatina na alimentação humana e seu valor proteico praticamente nulo, é relevante investigar sua influência no aproveitamento de uma proteína de alto valor biológico, em dietas com baixos teores de proteína, para simular as dietas restritivas hospitalares, que contém aproximadamente 20% de proteína proveniente da gelatina do teor proteico total.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia alimentar e qualidade proteica de misturas de caseína com gelatina em dietas com baixos teores de proteína, em ratos Wistar.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia alimentar de misturas de caseína com gelatina em dietas com baixos teores de proteína.
- Analisar a qualidade proteica e digestibilidade da proteína de misturas de caseína com gelatina em dietas com baixos teores de proteína.
- Comparar a qualidade proteica de misturas de caseína com gelatina em dietas com diferentes teores de proteína.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

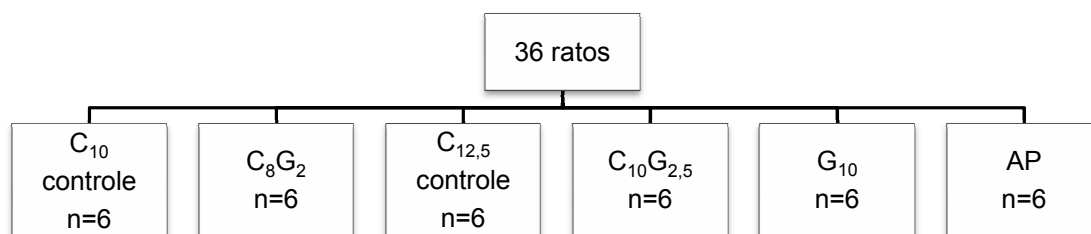
O estudo foi do tipo experimental, em modelo animal. Foi realizado um ensaio biológico com ratos Wistar para determinação da eficácia alimentar e qualidade proteica de misturas de caseína com gelatina, em dietas com baixos teores de proteína.

#### 3.2 ENSAIO BIOLÓGICO

Para realização do experimento, foram utilizados 36 ratos albinos da linhagem Wistar, machos, recém-desmamados (21 a 23 dias de idade), provenientes do biotério de criação do Bioagri Laboratórios Ltda (Planaltina-DF). Os animais foram distribuídos em 6 grupos segundo delineamento por blocos casualizados, resultando em pesos médios, por grupo, entre 51,8 e 54,6 gramas. Foram formados 6 blocos contendo 6 animais cada, em ordem crescente de pesos e, em seguida, foi sorteado um animal de cada bloco para compor cada um dos 6 tratamentos com 6 repetições. Os tratamentos foram: C<sub>10</sub>: 10% proteína (caseína); C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>: 10% proteína (8% caseína; 2% gelatina); C<sub>12,5</sub>: 12,5% proteína (caseína); C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub>: 12,5% proteína (10% caseína; 2,5% gelatina); G<sub>10</sub>: 10% proteína (gelatina) e AP: aprotéico (Figura 1). Comparando as dietas experimentais (C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> e C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub>) às controles (C<sub>10</sub> e C<sub>12,5</sub>), considera-se complementação quando foram substituídos 20% da proteína da caseína por proteína da gelatina (C<sub>10</sub> versus C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> e C<sub>12,5</sub> versus C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub>) e considera-se suplementação quando foram acrescentados 25% da proteína da caseína por proteína da gelatina (C<sub>10</sub> versus C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub>).

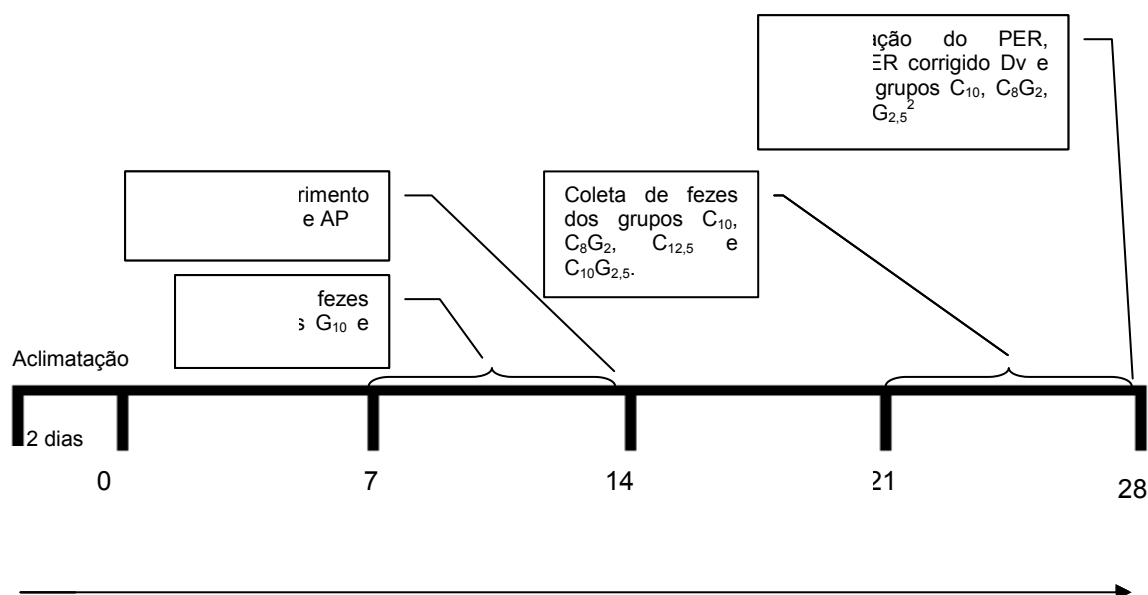
A duração do experimento foi de 30 dias para os grupos C<sub>10</sub>; C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>; C<sub>12,5</sub> e C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub>, e de 16 dias para os grupos G<sub>10</sub> e AP, sendo os dois primeiros dias de aclimação dos animais às condições ambientais da pesquisa (Figura 2).

Os ratos dos grupos AP e G<sub>10</sub> foram mantidos por 2 semanas, por causa da acentuada perda de peso que ocorreu nestes animais, sendo o prolongamento da desnutrição destes ratos desnecessário para os resultados do estudo em questão.



**Figura 1.** Representação esquemática da distribuição de ratos Wistar em 6 tratamentos contendo diferentes fontes e teores de proteína<sup>1</sup>

<sup>1</sup> C<sub>10</sub>: 10% proteína (caseína); C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>: 10% proteína (8% caseína; 2% gelatina); C<sub>12,5</sub>: 12,5% proteína (caseína); C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub>: 12,5% proteína (10% caseína; 2,5% gelatina); G<sub>10</sub>: 10% proteína (gelatina) e AP = aprotéico.



**Figura 2.** Representação esquemática do desenho experimental dos diferentes grupos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> C<sub>10</sub>: 10% proteína (caseína); C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>: 10% proteína (8% caseína; 2% gelatina); C<sub>12,5</sub>: 12,5% proteína (caseína); C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub>: 12,5% proteína (10% caseína; 2,5% gelatina); G<sub>10</sub>: 10% proteína (gelatina) e AP = aprotéico.

<sup>2</sup> FCA: Fator de conversão alimentar; PER: Coeficiente de eficácia proteica; RPER: PER relativo; Dv: Digestibilidade verdadeira.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, de metal galvanizado, no Laboratório de Nutrição Experimental (Lanute) da Faculdade

de Nutrição da Universidade Federal de Goiás (FANUT/UFG). As condições ambientais foram padronizadas de acordo com De Luca et al. (1996), sendo: luminosidade mantida por luz artificial (fluorescente) durante 12h/dia (ciclo claro) e alternada por 12 horas sem luz (ciclo escuro), controlada com timer; umidade relativa do ar entre 40 e 70%, controlada por termômetro contendo bulbo seco e úmido e estimada por meio de tabela de conversão; temperatura entre 20 e 22°C, mantida por aparelho de ar condicionado com termostato para quente e frio; ventilação controlada por exaustão aberta do aparelho de ar condicionado, proporcionando trocas frequentes de ar, evitando-se odores fortes, como o amoniacal, prejudicial aos animais. Os ruídos na sala de experimentação foram evitados o máximo possível, para não provocar estresse dos animais. Durante todo o experimento, os animais receberam água (filtrada) e dieta *ad libitum*.

As dietas foram preparadas com base na formulação preconizada pelo *American Institute of Nutrition* (AIN 93G) (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR., 1993), para ratos em crescimento, exceto quanto ao teor proteico, que foi reduzido para 10%, que é o teor proteico utilizado para avaliação da qualidade proteica, 12,5% e 0% de proteína (dieta aprotéica). Nas dietas experimentais C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> e C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub> foram substituídos 20% da proteína da caseína por proteína da gelatina, e na dieta G<sub>10</sub> a gelatina foi utilizada como única fonte proteica.

Para confecção das dietas, foram utilizados os seguintes ingredientes: caseína em pó pura, gelatina em pó neutra, L-cistina, celulose, mistura salina e vitamínica (adquiridos na Rhoster, SP), óleo de soja refinado e amido de milho (adquiridos no mercado local).

As dietas foram elaboradas conforme técnica padronizada no Lanute/UFG. Os ingredientes foram pesados em ordem crescente de peso, em balança digital (Gehaka, BG 8000), e em seguida homogeneizados e peneirados. O óleo foi acrescentado por último na mistura, que foi peneirada mais cinco vezes, a fim de se obter uma melhor homogeneização.

A composição das dietas e os respectivos teores de proteínas e lipídios estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Formulação de dietas com diferentes concentrações e fontes de proteína para o ensaio biológico

| Ingrediente <sup>1</sup> | Dietas (g/100g) <sup>2</sup> |                               |                   |                                  |                 |      |
|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------|----------------------------------|-----------------|------|
|                          | C <sub>10</sub>              | C <sub>8</sub> G <sub>2</sub> | C <sub>12,5</sub> | C <sub>10</sub> G <sub>2,5</sub> | G <sub>10</sub> | AP   |
| Caseína                  | 11,0                         | 8,8                           | 13,7              | 11,0                             | -               | -    |
| Gelatina                 | -                            | 2,3                           | -                 | 2,8                              | 11,4            | -    |
| L-cistina                | 0,2                          | 0,1                           | 0,2               | 0,2                              | -               | -    |
| Óleo de soja             | 6,7                          | 6,8                           | 6,6               | 6,7                              | 7,0             | 7,0  |
| Celulose                 | 5,0                          | 5,0                           | 5,0               | 5,0                              | 5,0             | 5,0  |
| Mistura salina           | 3,5                          | 3,5                           | 3,5               | 3,5                              | 3,5             | 3,5  |
| Mistura vitamínica       | 1,0                          | 1,0                           | 1,0               | 1,0                              | 1,0             | 1,0  |
| Bitartarato de colina    | 0,3                          | 0,3                           | 0,3               | 0,3                              | 0,3             | 0,3  |
| Amido de milho           | 72,4                         | 72,2                          | 69,6              | 69,7                             | 71,8            | 83,2 |

<sup>1</sup> Composição segundo AIN93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR., 1993). Caseína: 91,1% ± 0,29 de proteína e 2,9% ± 0,21 de lipídio; gelatina: 88,0% ± 0,63 de proteína e 0,1% ± 0,01 de lipídio. L-cistina: 0,3g para cada 20g de caseína.

<sup>2</sup> C<sub>10</sub>: 10% proteína (caseína); C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>: 10% proteína (8% caseína; 2% gelatina); C<sub>12,5</sub>: 12,5% proteína (caseína); C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub>: 12,5% proteína (10% caseína; 2,5% gelatina); G<sub>10</sub>: 10% proteína (gelatina) e AP = apteico.

O consumo das dietas foi controlado semanalmente e registrado em formulário próprio, conforme a seguir: foi realizada a pesagem em balança eletrônica (Gehaka, BG 8000) da quantidade de dieta oferecida a cada período de sete dias, pesando-se e descartando-se as sobras e os rejeitos de dieta de cada período. Os animais foram pesados três vezes por semana, na mesma balança mencionada anteriormente, sendo seus pesos registrados. Para análise do teor de proteínas, as fezes dos animais foram colhidas durante um período de sete dias: para os grupos G<sub>10</sub> e AP, na segunda semana do experimento, e para os demais grupos, na quarta semana (Figura 2). As fezes foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados e armazenados em freezer (-20°C) para análises.

Todos os procedimentos do ensaio biológico foram desenvolvidos no Lanute/UFG, e conduzidos de acordo com os princípios éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (DE LUCA et al., 1996). Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (Protocolo nº 381/10, Anexo 1).

### 3.3 ANÁLISES QUÍMICAS

Os teores de aminoácido da gelatina e da caseína foram determinados no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A composição dos aminoácidos totais foi determinada nas amostras com HCl 6N contendo fenol 0,01%, ponto de ebulição constante, por 22h, a 110°C. As amostras hidrolisadas foram secas em evaporador rotatório (SpeedVac), ressuspensas em água MilliQ, centrifugadas a 5000 rpm e ressuspensas em 1,0mL de água Milli-Q. Alíquotas de 50µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de ensaio, secos e submetidas à reação de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag, Waters, 3,9x150mm) com monitoração em comprimento de onda em 254nm. A quantificação da amostra foi baseada na área de cada pico de aminoácido, tomando-se como referência a área do pico do padrão de aminoácidos com concentração conhecida, sendo que o padrão foi derivado nas mesmas condições e, ao mesmo tempo, que as amostras (BIDLINGMEYER; COHEN; TARVIN, 1984).

A fim de garantir que a gelatina usada no presente estudo seja considerada similar à gelatina consumida por humanos, foram analisados também os teores de aminoácidos de uma gelatina em pó incolor, sem sabor, comercializada para alimentação humana, de uma marca nacionalmente difundida, a fim de comparação com a gelatina utilizada.

O escore de aminoácidos essenciais (EAE) foi estimado a partir dos resultados das análises de aminoácidos. O EAE corresponde a proporção do aminoácido mais limitante (primeiro limitante) do alimento teste em relação às necessidades de aminoácidos essenciais de crianças de um a três anos de idade (pré-escolares), usadas como padrão de referência de acordo com o Comitê de Nutrição e Alimentos do Instituto de Medicina dos EUA (IOM, 2005).

Analizou-se o teor de nitrogênio (N) da caseína, da gelatina, das dietas, bem como das fezes dos ratos, segundo método de micro-kjeldahl.

Para a conversão em proteína bruta, utilizou-se os fatores 6,38 para caseína, 5,55 para gelatina e 6,25 para fezes (AOAC, 1990).

A composição centesimal das dietas foi determinada, conforme apresentado na Tabela 3.

Os teores de umidade, cinzas, lipídios, proteína e carboidratos foram analisados em triplicata. Os teores de umidade e cinzas das dietas foram analisados conforme técnicas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2005). O teor de lipídios totais, da caseína, da gelatina e das dietas foi analisado pelo método Bligh e Dyer (1959). Os carboidratos foram estimados por diferença, subtraindo-se de cem os valores obtidos de umidade, proteína, lipídios e cinzas. O Valor Energético Total (VET) foi estimado por meio dos fatores de conversão de Atwater de 4, 4 e 9 para proteína, carboidrato e lipídio, respectivamente (MERRIL; WATT, 1973). As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Análise de Alimentos da FANUT/UFG.

**Tabela 3.** Composição centesimal aproximada e valor energético das dietas usadas no ensaio biológico

| Dieta <sup>1</sup>               | Composição centesimal (g/100g) <sup>2</sup> |          |          |                                     |        | VET<br>(kcal) |
|----------------------------------|---------------------------------------------|----------|----------|-------------------------------------|--------|---------------|
|                                  | Umidade                                     | Proteína | Lipídios | Carboidratos<br>totais <sup>3</sup> | Cinzas |               |
| C <sub>10</sub>                  | 9,77                                        | 10,33    | 7,00     | 70,59                               | 2,31   | 386,68        |
| C <sub>8</sub> G <sub>2</sub>    | 8,82                                        | 10,74    | 6,95     | 70,22                               | 2,27   | 386,39        |
| C <sub>12,5</sub>                | 9,90                                        | 12,77    | 7,03     | 68,02                               | 2,28   | 386,43        |
| C <sub>10</sub> G <sub>2,5</sub> | 9,86                                        | 12,78    | 7,14     | 68,06                               | 2,16   | 387,62        |
| G <sub>10</sub>                  | 10,43                                       | 10,82    | 6,31     | 70,33                               | 2,11   | 381,39        |
| AP                               | 10,45                                       | 0,23     | 6,18     | 81,06                               | 2,08   | 380,78        |

<sup>1</sup> C<sub>10</sub>: 10% proteína (caseína); C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>: 10% proteína (8% caseína; 2% gelatina); C<sub>12,5</sub>: 12,5% proteína (caseína); C<sub>10</sub>G<sub>2,5</sub>: 12,5% proteína (10% caseína; 2,5% gelatina); G<sub>10</sub>: 10% proteína (gelatina) e AP: aprotéico.

<sup>2</sup> Valores constituem médias de três repetições, com exceção dos carboidratos (CHO), que foram estimados por diferença e do valor energético total (VET), estimado por meio dos fatores de conversão de 4, 4 e 9 para proteínas, carboidratos e lipídios respectivamente (MERRIL; WATT, 1973).

<sup>3</sup> Incluindo fibra adicionada à dieta (celulose a 5%).

### 3.4 DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA ALIMENTAR E PROTEICA

A qualidade nutricional das dietas foi avaliada por meio dos parâmetros descritos a seguir (PELLETT; YOUNG, 1980).

- Ganho de peso dos animais (GP), que é estimado a partir da diferença entre peso final e peso inicial dos animais.

- Fator de Conversão Alimentar, ou FCR (Food Conversion Ratio), que representa a eficácia com que o animal converte o alimento consumido em ganho de peso. Assim, quanto menor o seu valor, melhor a capacidade da dieta em promover o crescimento:

$$\frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso do alimento consumido}}$$

- Coeficiente de Eficácia Proteica, ou PER (Protein Efficiency Ratio), que baseia-se na variação de peso corporal e consumo de proteína durante o período de quatro semanas, e avalia a capacidade da proteína-teste em promover o crescimento:

$$\frac{\text{Ganho de peso (g)} \times 100}{\text{Consumo de proteína (g)}}$$

- Coeficiente de Eficácia Proteica relativo, ou RPER (Relative Protein Efficiency Ratio), que compara a eficiência da proteína-teste com a eficiência da proteína-controle:

$$\frac{\text{PER da proteína teste}}{\text{PER da proteína controle}} \times 100$$

- Coeficiente de Eficácia Proteica corrigido, que é estimado a partir do PER da proteína teste, ajustado para o valor de 2,5 (valor padronizado de PER da caseína estimado em dietas com 10% de proteína):

$$\frac{\text{PER da proteína teste} \times 2,5}{\text{PER da caseína}}$$

- Digestibilidade verdadeira da proteína (Dv), avaliada pelo quociente do nitrogênio absorvido em relação ao nitrogênio ingerido na dieta, expressa em porcentagem. É determinada pela obtenção da quantidade ingerida de nitrogênio pelos ratos (I), da quantidade excretada de nitrogênio nas fezes pelo grupo de ratos mantidos com dieta proteica (F), e da quantidade excretada de nitrogênio fecal metabólico nas fezes, pelo grupo de ratos com dieta aprotéica (Fe) (FAO, 1991):

$$\frac{(I - \frac{F \times Fe}{I})}{I} \times 100$$

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises químicas e do ensaio biológico foram expressos sob forma de média e desvio-padrão, sendo os dados submetidos à análise de variância (Anova). Quando indicado, as médias foram comparadas entre si por meio do teste Tukey, considerando-se diferença significativa quando  $p < 0,05$ . Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do programa Excel-versão 2007 e do programa Statistica – Stat Soft Inc., versão 7 (Tulsa, EUA, 2004).



## REFERÊNCIAS

- ANGELIS, R. C.; TIRAPEGUI, J. **Fisiologia da nutrição humana**: aspectos básicos, aplicados e funcionais. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2007. 565p.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC, 1995.
- BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.336, n.1, p.93-104, 1984.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, Toronto, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M. P.; MAUBOIS, J. L.; BEAUFRERE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 26, p.14930-14935, 1997.
- DE LUCA, R. R.; ALEXANDRE, S. R.; MARQUES, T.; SOUZA, N. L. MERUSSE, J. L. B.; NEVES, S. P. (Ed.). **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: Winner Graph, 1996. 259p.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Protein and amino acid requirements in human nutrition**. FAO: Geneva, 2007. 284p. (FAO Food and Nutrition paper n. 935).
- GIETZEN, D. W.; HAO, S.; ANTHONY, T. G. Mechanisms of food intake repression in indispensable amino acid deficiency. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 27, n. 3, p.63-78, 2007.
- GOMES, M. R.; OLIVEIRA PIRES, I. S.; CASTRO, I. A.; TIRAPEGUI, J. Effect of protein restriction on plasma and tissue levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in adult rats. **Nutrition Research**, New York, v. 23, n. 9, p. 1239-1250, 2003.
- HAO, S.; SHARP, J. W.; ROSS-INTA, C. M.; MCDANIEL, B. J.; ANTHONY, T. G.; WEK, R. C.; CAVENER, D. R.; MCGRATH, B. C.; RUDELL, J. B. Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. **Science**, Washington, v. 307, n. 5716, p. 1776-1778, 2005.
- HOCHSTENBACH-WAELEN, A.; WESTERTEP-PLANTENGA, M. S.; VELDHORST, M. A. B.; WESTERTEP, K. R. Single-Protein casein and gelatin diets affect energy expenditure similarly but substrate balance and appetite differently in adults. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 139, n. 12, p.2285-2292, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2005, 1018 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

IOM – Institute of Medicine. Food and Nutrition Board (FNB). Protein and aminoacids. In:\_\_\_\_\_. **Dietary references intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients)**. Washington, D.C.: USA National Academies, 2005. cap. 10, p. 589-768.

KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 3, p.563-576, 2008.

MARTINS, C.; MEYER, L. R.; SAVI, F.; MARIMOTO, I. M. **Manual de dietas hospitalares**. Curitiba: Nutroclínica, 2001, 278 p.

MAURIN, A. C.; JOUSSE, C.; AVEROUS, J.; PARRY, L.; BRUHAT, A.; CHERASSE, Y.; ZENG, H.; ZHANG, Y.; HARDING, H. P. The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 1, n. 4, p. 273-277, 2005.

MERRIL, A. L.; WATT, B. K. **Energy value of foods**: basis and derivation. Washington: United States Departament of Agriculture, 1973. 105p.

MOSKOWITZ, R. W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, New York, v. 30, n. 2 p. 87-99, 2000.

NAVES, M. M. V.; FERREIRA, C. C. C.; FREITAS, C. S.; SILVA, M. S. Avaliação da qualidade proteica de dois suplementos alimentares em ratos wistar. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 1, p. 35-42, 2006.

OESSER, S.; SEIFERT, J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 311, n. 3, p.393-399, 2003.

PELLETT, P. L.; YOUNG, V. R. **Nutritional evaluation of protein foods**. Tokyo: The Unites Nations University, 1980. 154p.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, 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. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

VELDHORST, M. A. B.; NIEUWENHUIZEN, A. G.; HOCHSTENBACH-WAELEN, A.; WESTERTERP, K. R.; ENGELEN. M. P. K. J.; BRUMMER, R. J. M.; DEUTZ, N. E. P.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. A breakfast with alpha-lactalbumin, gelatin, or gelatin + TRP lowers energy intake at lunch compared with a breakfast with casein, soy, whey, or whey-GMP. **Clinical Nutrition**, Oxford, v. 28, n. 2, p.147-155, 2009.

WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. v. 1. 1289p.

ZIEGLER, F. L. F.; SGARBIERI, V. C. Caracterização químico-nutricional de um isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 61-71, 2009.

## **CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO**

---

O artigo científico foi submetido para publicação no periódico Nutrition Research. Este periódico possui qualificação Qualis B1 (Anexo 2) na área de Medicina II da Capes e as normas de elaboração do artigo estão descritas no Anexo 3.

## **Gelatin decreases food and protein efficiency in mixtures with high quality protein in rats**

Cláudia Cantelli D. Bordin <sup>1</sup>, Maria Margareth V. Naves<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Experimental Nutrition, Faculty of Nutrition, Federal University of Goiás (Universidade Federal de Goiás-UFG), Goiás, Brazil.

Corresponding author: Maria Margareth Veloso Naves, Laboratório de Nutrição Experimental, Faculdade de Nutrição, UFG, Rua 227, Quadra 68, CEP: 74605-080, Goiânia, GO, Brasil. E-mail address: [mnaves@fanut.ufg.br](mailto:mnaves@fanut.ufg.br). Tel.: +55-62-32096270/214; fax: +55-62-32096273.

## **Abbreviations**

|      |                                              |
|------|----------------------------------------------|
| AAS  | Indispensable Amino Acid Score;              |
| FCR  | Food Conversion Ratio;                       |
| PER  | Protein Efficiency Ratio;                    |
| RPER | Relative Protein Efficiency Ratio;           |
| FBN  | Food and Nutrition Board;                    |
| IOM  | Institute of Medicine;                       |
| AIN  | American Institute of Nutrition;             |
| PF   | Protein Free;                                |
| N    | Nitrogen;                                    |
| AOAC | Association of Official Analytical Chemists. |

## **Abstract**

Gelatin is an incomplete protein that is deficient in all of the indispensable amino acids. Despite its low quality, gelatin is commonly used in protein-restricted diets, such as the diets used before and after surgeries of the gastrointestinal tract. This study investigated the food efficiency and protein quality of mixtures of casein with gelatin in diets with low protein content in Wistar rats. The assay was carried out with 36 weanling male Wistar rats distributed in 6 groups (n=6), and treated with protein-restricted diets (10.0% and 12.5% of protein) containing casein, mixtures of casein with gelatin (4:1 of protein content) and gelatin as sources of protein, and a protein-free diet. The assay period was 14 days for the gelatin and protein-free groups, and 28 days for the other groups. The indispensable amino acid score (AAS), Food Conversion Ratio (FCR), Protein Efficiency Ratio (PER), Relative Protein Efficiency Ratio (RPER), Corrected PER and true protein digestibility were estimated. The casein and casein:gelatin groups showed similar weight gain, and the FCR and PER with the mixtures were lower ( $p < .05$ ) than those of the casein groups. This study shows that gelatin decreases food efficiency and protein bioavailability in mixtures with high-quality protein when it represents 20% of the total protein content in protein-restricted diets. Therefore, gelatin should not be used in clinical situations that involve protein catabolism and low protein diets.

**Keywords:** gelatin, casein, protein, amino acids, bioavailability, rats

## 1. Introduction

Gelatin is a soluble mix of polypeptides that is generated from the partial hydrolysis of collagen. Collagen is an insoluble protein of animal origin that serves to hold together organs and tissues and gives strength to tendons among other biological functions [1,2]. In nutritional terms, gelatin is an incomplete protein because its amino acid composition is quite atypical and deficient in all of the indispensable (essential) amino acids recognized by the Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine of the US National Academy of Sciences (FNB/IOM) [3]. In particular it is notable that gelatin does not contain tryptophan [4,5].

Gelatin is used in some clinical conditions, as in the treatment of osteoarthritis and osteoporosis, because it has demonstrated a capacity to stimulate endogenous synthesis of cartilage when administered over a long period [3]. Additionally, studies have shown that gelatin can inhibit appetite and promote satiety, and, for this reason, it has been used to promote weight loss [6,7]. However, the use of gelatin in a protein-restricted diet, like a liquid diet, which is used mainly before and after surgeries of the gastrointestinal tract [8-10], could be a potential nutritional risk. Insufficient protein intake (in terms of both quantity and quality) inhibits endogenous metabolism of proteins, prolongs the inflammatory phase of the healing process, decreases fibroblast proliferation, angiogenesis and collagen synthesis, and impairs tissue repair [9]. Therefore, the use of gelatin in a protein-deficient diet could impair post-surgery recovery of patients. Other examples of protein-



restricted diets are those used to promote weight loss and in the treatment of chronic renal insufficiency.

Considering the uses of gelatin in protein-restricted diets, this study investigated the food efficiency and protein quality of mixtures of casein (a complete protein) with gelatin in diets with low contents of protein administered to Wistar rats.

## **2. Methods and materials**

### *2.1. Materials and experimental protocol*

The biological assay was carried out with 36 weanling male Wistar rats (21-23 days old), from Bioagri Laboratories Experimental Animal Center (Planaltina, Federal District, Brazil). According to a randomized block design, the animals were distributed in six groups with six animals each, and the mean body weights of the groups were between 51.8 g and 54.6 g. The rats were kept in individual cages and under standard environmental conditions [11] (12-h light/dark cycle, relative humidity between 40-70%, temperature between 20-23°C). The rats were fed diets formulated according to American Institute of Nutrition (AIN-93G) [12] (Table 1), containing different sources of protein and reduced protein contents, as follows: C<sub>10</sub> - 10% protein (casein); C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> - 10% protein (8% casein and 2% gelatin); C<sub>12.5</sub> - 12.5% protein (casein); C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub> - 12.5% protein (10% casein and 2.5% gelatin), G<sub>10</sub> - 10% protein (gelatin) and PF - protein free. In C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> and C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub> diets, 20% of the casein protein was replaced with gelatin protein to simulate the proportion of gelatin in a protein-restricted diet, representing protein complementation (C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> diet) and supplementation (C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub> diet) compared to the C<sub>10</sub> diet

(control). The diets ranged in protein content from approximately 0% (protein free) to 10% (C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> and G<sub>10</sub>) and 12.5% (C<sub>12.5</sub> and C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub>), and all protein diets had similar energy values (Table 1).

#### Table 1

Diet and water (filtered) were provided to the animals *ad libitum* over 30 days (2 days of acclimatization and 28 days of experiment) for the groups C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>, C<sub>12.5</sub> and C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub>, and over 16 days (14 days of experiment) for the groups G<sub>10</sub> and PF. Food intake was monitored daily, and the acceptance of each diet was assessed by the percentage of the amount of food consumed compared to the amount of food offered. The animals were weighed three times a week. For analysis of protein content, the animal feces were collected over 7 days, during the second (G<sub>10</sub> and PF) or the fourth week (all other groups) of the experiment (Figure 1).

The experiment was approved by the Ethics Committee in Research of the Federal University of Goiás (Protocol n° 381/10).

#### Figure 1

### 2.2. Chemical analysis

The amino acid contents of gelatin and casein were determined after hydrolysis of the protein in an acid solution using an amino acid analyzer (Nicolas V, Ribeirão Preto, Brazil) and colorimetric detection post-column with ninhydrin [14]. The amino acid profile of a powdered, unflavored gelatin (from a common brand sold in Brazilian markets) was also analysed to

ensure that the gelatin used in the study diets was similar to gelatin used for human consumption. The indispensable amino acid score (AAS) was estimated from the results of the analysis of amino acids, by comparing them to the requirement pattern of indispensable amino acids proposed by the FNB/IOM [3] as follows:  $AAS = [(mg \text{ of amino acids in } 1 \text{ g of protein test} / mg \text{ of amino acids in standard}) \times 100]$ .

The nitrogen (N) content of casein, gelatin, the experimental diets and the rat feces were analyzed by the micro-Kjeldahl method, using the factors 6.38 for casein, 5.55 for gelatin and 6.25 for feces, for conversion to crude protein [15]. Lipids were analyzed using the method described by Bligh and Dyer [16], moisture and ash were analyzed by the methods defined by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [15], and the total carbohydrate content (including fiber) of the diets were estimated by the difference of weight remaining after subtracting the contents of protein, lipids, moisture and ash.

### *2.3. Evaluation of food and protein efficiency*

The biological utilization of the diets was evaluated by using the following parameters: curve of growth and weight gain of the animals; Food Conversion Ratio (FCR), which represents the efficiency of food intake in promoting weight gain; Protein Efficiency Ratio (PER), which is based on body weight gain compared to protein intake over a period of four weeks; Relative Protein Efficiency Ratio (RPER); Corrected PER, which is estimated by the PER of the protein test adjusted for the value of 2.5 (standard value

for casein PER, estimated in diets with 10% protein); and true protein digestibility, assessed by the ratio between nitrogen absorbed and nitrogen intake, expressed as a percentage [17,18].

#### *2.4. Statistical analysis*

The results of the chemical analyses and biological assay were expressed as means and standard deviations, and the data were submitted to an analysis of variance (ANOVA) and test of differences among means (Tukey test, with significance set at  $p < .05$ ).

### **3. Results**

The amino acid profiles of the gelatin used in the experimental diets and the commercial gelatin (for human consumption) were similar (Table 2). There is no tryptophan in gelatin, and gelatin is also deficient in other indispensable amino acids in relation to their requirements [3]. Furthermore, there are high amounts of alanine, arginine, glycine and proline in gelatin compared with casein. The casein:gelatin mixture (4:1 of protein content) more closely resembles the required pattern of amino acids (Table 2).

#### Table 2

The animals of the C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>, C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub> and C<sub>12.5</sub> groups all had similar body weights at the end of the study ( $p > 0.05$ ) (Figure 2). The G<sub>10</sub> and PF

groups of rats experienced similar weight loss during the feeding period ( $p > .05$ ) and low diet acceptance – lower than 50% ( $G_{10} = 42.4\% \pm 6.4$  and  $FP = 48.2\% \pm 6.7$ ) – when compared to the other groups after 14 days of the experiment ( $C_{10} = 85.6\% \pm 5.5$ ;  $C_8G_2 = 82.5\% \pm 11.8$ ;  $C_{10}G_{2.5} = 81.9\% \pm 11.2$  e  $C_{12.5} = 73.4\% \pm 9.6$ ). While weight gain and food intake were similar for the protein diets after 28 days of experiment, the Food Conversion Ratios of the experimental groups were higher than that of the 10% protein control group in the protein complementation ( $C_8G_2$  versus  $C_{10}$ ) and supplementation ( $C_{10}G_{2.5}$  versus  $C_{10}$ ) groups (Table 3).

#### Figure 2

The Protein Efficiency Ratio (PER) of the diets with the casein:gelatin mixtures ( $C_8G_2$  and  $C_{10}G_{2.5}$ ) were lower than those of the control diets ( $C_{10}$  and  $C_{12.5}$ ), as well as in the case of  $C_{10}G_{2.5}$  diet compared to  $C_{10}$  diet. The corrected PER of the  $C_8G_2$  diet was approximately 2.0 when adjusted to the standard value of casein PER. The True Protein Digestibility of the diets was approximately 95% (Table 3).

#### Table 3

### **4. Discussion**

Gelatin has lower contents of all the indispensable amino acids than those what are considered necessary for health [3]. Furthermore, gelatin does not contain tryptophan, therefore its amino acid score (AAS%) is zero.

On the other hand, some dispensable amino acids are present in gelatin in excessive amounts when compared to other proteins of animal origin [17,18], like casein (Table 2). This atypical and imbalanced amino acid profile in relation to human protein requirements suggests that gelatin should not be consumed by humans as a primary source of protein [3,4]. The amino acid profile of commercial gelatin is similar to that of gelatin used in this study (Table 2), which allows the extrapolation of the results of this study to the gelatin used for human consumption.

The animals in the gelatin group ( $G_{10}$ ) lost body weight in a similar way to the protein free group (Figure 2), which confirms results reported in other studies [19, 20]. This result can be explained by the low protein quality of gelatin, since the gelatin's deficiency in indispensable amino acids inhibits endogenous protein synthesis. Furthermore, there is evidence in the literature that rats reject diets that are deficient in indispensable amino acids, which results in a lower dietary consumption than their energy requirements [21]. This was confirmed in the present study, where the  $G_{10}$  group rejected more than half (57.6%) of the diet offered. The low energy intake coupled with the deficiency in indispensable amino acids reduced the ratio of endogenous protein synthesis further exacerbated the protein malnutrition of the animals [21].

The similar energy values (Table 1) and total food intake resulted in no differences in the weight gain among the casein and casein:gelatin groups (Figure 2, Table 3). This shows that the different protein sources did not influence the weight gain of the different animal groups, and proves that the

energy intake did not interfere in the dietary bioavailability of the different groups.

The Food Conversion Ratio was higher in the experimental groups than that of the control group, both regarding complementation ( $C_8G_2$  versus  $C_{10}$ ) and supplementation ( $C_{10}G_{2.5}$  versus  $C_{10}$ ) of casein with 20% gelatin (4:1 of protein content) (Table 3). Therefore, the food efficiency was decreased when gelatin was present in the diet, making a higher dietary intake of the casein:gelatin diet than the 10% protein control diet necessary to reach similar weight gains.

The protein quality of casein was reduced when complemented with gelatin at the two tested protein levels ( $C_8G_2$  versus  $C_{10}$  and  $C_{10}G_{2.5}$  versus  $C_{12.5}$ ), as well as when supplemented with gelatin ( $C_{10}G_{2.5}$  versus  $C_{10}$ ). The PER method is more sensitive for evaluating protein quality, since it uses growing animals, which have a higher protein requirement than adult animals. Furthermore, conducting a PER takes longer than other methods, such as NPR (Net Protein Ratio) (28 days versus 10-14 days, respectively). For these reasons, the PER is sensitive to small differences in protein quality [9,17,18,22,23].

The PER value of casein at 10% protein is higher than 2.5 [17,22] because the AIN-93G diet is supplemented with L-cystine (Table 1) in order to correct the casein's deficiency in sulfur-containing amino acids [12]. The reference value of 2.5 for casein is based on the diet of the AOAC official method [15], which does not include supplementation with sulfur-containing amino acids. The corrected PER (adjusted to 2.5) of the  $C_8G_2$  diet was lower

than that of casein ( $p < .05$ ) and close to 2.0, which is the minimum value expected for a good-quality protein [22].

The high protein digestibility of the diets (approximately 95%) indicates that gelatin did not influence the casein digestibility. This is because gelatin is a partially-hydrolyzed protein derived from collagen [2], which facilitates the absorption of its amino acids [22]. Therefore, we can conclude that the protein digestibility did not cause the decreasing in protein efficiency of the casein:gelatin mixture.

Considering that the casein:gelatin mixture (4:1 of protein content) has sufficient indispensable amino acid content (Table 2), as well as high digestibility (Table 3), this mixture could be expected to present a protein quality close to that of casein. However, this study showed that gelatin negatively influenced the protein quality of the casein:gelatin mixture. One possible explanation for this result could be the high contents of some dispensable amino acids in gelatin, like glycine (Table 2). During protein absorption inside the amino acid transport system, glycine, as other amino acids, has an affinity for more than one carrier in the intestinal brush border. For this reason, molecules with a similar chemical structure compete to use the same carrier [23]. As a result, the absorption of some indispensable amino acids can be impaired by the excess of dispensable amino acids, which reduces their bioavailability [24,25]. Thus, we suggest new investigations in order to clarify the mechanism that gelatin reduces the protein bioavailability when it is mixed with a high quality protein, for example, by means of the analysis of the fecal amino acid profile.



In this study using mixtures of casein with gelatin, 20% of the protein content derived from gelatin, and it was observed that gelatin decreases the efficiency of a high quality protein in protein-restricted diets. Therefore, gelatin, or partially-hydrolyzed collagen, should not be used in some clinical practices, mainly in situations that involve protein catabolism, since it could worsen the catabolic status, and consequently, impair the recovery of the patient.

## **5. Conclusion**

Gelatin decreases food efficiency and protein bioavailability in mixtures with high quality protein, when it represents 20% of total protein in protein-restricted diets.

## **Acknowledgement**

We acknowledge the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) for financial support.

## References

1. Poppe J. Gelatin. In: Imeson A, editor. Thickening and gelling agents for food. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic and Professional; 1997. p. 144-68.
2. Djagny KB, Wang Z, Xu S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. Crit Rev Food Sci Nutr 2001;41:481-92.
3. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Protein and amino acids. In: Institute of Medicine. Dietary references intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington, DC: The National Academies; 2005. p. 589-768.
4. Moskowitz RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. Semin Arthritis Rheum 2000;30:87-99.
5. Ten Have GA, Engelen MP, Soeters PB, Deutz NE. Absence of post-prandial gut anabolism after intake of a low quality protein meal. Clin Nutr 2012;31:273-82.
6. Veldhorst MA, Nieuwenhuizen AG, Hochstenbach-Waelen A, Westerterp KR, Engelen MP, Brummer RJ, Deutz NE, Westerterp-Plantenga MS. A breakfast with alpha-lactalbumin, gelatin, or gelatin + TRP lowers energy intake at lunch compared with a breakfast with casein, soy, whey, or whey-GMP. Clin Nutr 2009;28:147-55.
7. Hochstenbach-Waelen A, Westerterp-Plantenga MS, Veldhorst MA, Westerterp KR. Single-Protein casein and gelatin diets affect energy

- expenditure similarly but substrate balance and appetite differently in adults. *J Nutr* 2009;139:2285-92.
8. Hancock S, Cresci G, Martindale R. The clear liquid diet: when is it appropriate? *Curr Gastroenterol Rep* 2002;4:324-31.
  9. Mackay D, Miller AL. Nutritional support for wound healing. *Altern Med Rev* 2003;8:359-77.
  10. Brylinsky C. The nutrition care process. In: Mahan, K, Escott-Stump S, editors. *Krause's food, nutrition and diet therapy*, 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 2000. p. 431-51.
  11. National Research Council. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington, DC: National Research Council, National Academy Press; 1996.
  12. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr. GC. 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. *J Nutr* 1993;123:1939-51.
  13. Merrill AL, Watt BK. *Energy value of foods: basis and derivation*. Washington: United States Department of Agriculture; 1973.
  14. Bidlingmeyer BA, Cohen SA, Tarvin TL. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J Chromatogr* 1984;336:93-104.
  15. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis*. 16<sup>th</sup> ed. Arlington: AOAC International; 1995.
  16. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-7.

17. Pellett P L, Young VR. Nutritional evaluation of protein foods. Tokyo: The United Nations University; 1980.
18. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition (WHO Technical Report Series No. 935). Geneva: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2007.
19. Castro IA, Tirapegui J, Silva RS. Protein mixtures and their nutritional properties optimized by response surface methodology. Nutr Res 2000; 20:1341-53.
20. Naves MM, Ferreira CC, Freitas CS, Silva MS. Avaliação da qualidade proteica de dois suplementos alimentares em ratos wistar/Evaluation of the protein quality of two dietary supplements in Wistar rats. Aliment Nutr 2006; 17:35-42 [cited 2010 jun 12]. Available from: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/113/126>.
21. Gietzen DW, Hao S, Anthony TG. Mechanisms of food intake repression in indispensable amino acid deficiency. Annu Rev Nutr 2007; 27:63-78.
22. Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. J Agric Food Chem 1996;44:6-29.
23. Brody T. Protein. In: Brody T, editor. Nutritional biochemistry. 4<sup>th</sup> edition. San Diego: Academic Press; 1998. p. 421-90.
24. Matthews DM, Adibi SA. Peptide absorption. Gastroenterology 1976;71:151-61.
25. Silk DB, Grimble GK, Rees RG. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. Proc Nutr Soc 1985;44:63-72.¶

¶

¶

Table 1.

Ingredients and proximate composition of experimental diets with different contents and sources of protein

| Component                               | Diet*           |                               |                   |                                  |                 |       |
|-----------------------------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------|----------------------------------|-----------------|-------|
|                                         | C <sub>10</sub> | C <sub>8</sub> G <sub>2</sub> | C <sub>12.5</sub> | C <sub>10</sub> G <sub>2.5</sub> | G <sub>10</sub> | PF    |
| <u>Ingredient</u> <sup>†</sup> (g/100g) |                 |                               |                   |                                  |                 |       |
| Casein                                  | 11.0            | 8.8                           | 13.7              | 11.0                             | -               | -     |
| Gelatin                                 | -               | 2.3                           | -                 | 2.8                              | 11.4            | -     |
| L-cystine                               | 0.2             | 0.1                           | 0.2               | 0.2                              | -               | -     |
| Soybean oil                             | 6.7             | 6.8                           | 6.6               | 6.7                              | 7.0             | 7.0   |
| Cellulose                               | 5.0             | 5.0                           | 5.0               | 5.0                              | 5.0             | 5.0   |
| Mineral mix                             | 3.5             | 3.5                           | 3.5               | 3.5                              | 3.5             | 3.5   |
| Vitamin mix                             | 1.0             | 1.0                           | 1.0               | 1.0                              | 1.0             | 1.0   |
| Choline bitartrate                      | 0.3             | 0.3                           | 0.3               | 0.3                              | 0.3             | 0.3   |
| Corn starch                             | 72.4            | 72.2                          | 69.6              | 69.7                             | 71.8            | 83.2  |
| <u>Proximate composition</u>            |                 |                               |                   |                                  |                 |       |
| (g/100g) <sup>#</sup>                   |                 |                               |                   |                                  |                 |       |
| Moisture                                | 9.8             | 8.8                           | 9.9               | 9.9                              | 10.4            | 10.4  |
| Protein                                 | 10.3            | 10.7                          | 12.8              | 12.8                             | 10.8            | 0.2   |
| Lipids                                  | 7.0             | 7.0                           | 7.0               | 7.1                              | 6.3             | 6.2   |
| Total carbohydrates                     | 70.6            | 70.2                          | 68.0              | 68.1                             | 70.3            | 81.1  |
| Ash                                     | 2.3             | 2.3                           | 2.3               | 2.2                              | 2.1             | 2.1   |
| Energy value (kcal)                     | 386.7           | 386.4                         | 386.4             | 387.6                            | 381.4           | 308.8 |

\*C<sub>10</sub>: 10% protein (casein); C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>: 10% protein (8% casein and 2% gelatin); C<sub>12.5</sub>: 12.5% protein (casein); C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub>: 12.5% protein (10% casein and 2.5% gelatin), G<sub>10</sub>: 10% protein (gelatin) and PF: protein free.

<sup>†</sup>Formulation according to AIN-93G [12]. Casein: 91.1% ± 0.29 of protein and 2.9% ± 0.21 of lipids; gelatin: 88.0% ± 0.63 of protein and 0.1% ± 0.01 of lipids. L-cystine, 0.3 g for each 20 g of casein.

<sup>#</sup>Values are means of three replicates, with the exception of carbohydrates, estimated by difference, and energy value, estimated by means of conversion factors of 4, 4 and 9 kcal/g for protein, carbohydrates and lipids, respectively [13].

Table 2.

Amino acid composition of casein, gelatins, and amino acid score (AAS) according to the FNB/IOM requirement pattern

| Amino Acid           | Casein             | Gelatin<br>(used in<br>diets) | Commercial<br>gelatin | Casein:gelatin<br>(4:1 of protein<br>content)* | Requirement<br>pattern <sup>†</sup> |
|----------------------|--------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Indispensable</i> |                    |                               |                       |                                                |                                     |
| His                  | 28.8               | 11.1                          | 12.3                  | 25.3                                           | 18                                  |
| Ile                  | 38.2               | 15.1                          | 16.4                  | 33.6                                           | 25                                  |
| Leu                  | 90.6               | 30.4                          | 32.8                  | 78.6                                           | 55                                  |
| Lys                  | 82.7               | 47.7                          | 43.6                  | 75.7                                           | 51                                  |
| Met+Cys              | 32.7               | 10.6                          | 8.4                   | 28.3                                           | 25                                  |
| Phe+Tyr              | 104.8              | 30.7                          | 39.6                  | 90.0                                           | 47                                  |
| Thr                  | 45.1               | 16.9                          | 14.5                  | 39.5                                           | 27                                  |
| Trp                  | 16.1               | 0.0                           | 0.0                   | 12.9                                           | 7                                   |
| Val                  | 44.6               | 22.4                          | 26.5                  | 40.2                                           | 32                                  |
| Total                | 483.6              | 184.9                         | 194.1                 | 423.9                                          | 287                                 |
| AAS(%) <sup>#</sup>  | 130.8<br>(Met+Cys) | 0.0<br>(Trp)                  | 0.0<br>(Trp)          | 113.1<br>(Met+Cys)                             | 100                                 |
| <i>Dispensable</i>   |                    |                               |                       |                                                |                                     |
| Asp                  | 91.0               | 58.4                          | 62.5                  | 84.48                                          |                                     |
| Glu                  | 181.7              | 96.4                          | 108.6                 | 164.64                                         |                                     |
| Ala                  | 34.6               | 125.3                         | 94.3                  | 52.74                                          |                                     |
| Arg                  | 36.6               | 97.2                          | 87.8                  | 48.72                                          |                                     |
| Gly                  | 20.7               | 268.9                         | 299.0                 | 70.34                                          |                                     |
| Pro                  | 108.5              | 138.3                         | 126.6                 | 114.46                                         |                                     |
| Ser                  | 59.4               | 30.8                          | 27.2                  | 53.68                                          |                                     |
| Total                | 532.5              | 815.1                         | 806.0                 | 589.02                                         |                                     |

\*Estimated value, not analyzed.

<sup>†</sup>Requirement pattern of indispensable amino acids for preschool children (one to three years old) [3]. <sup>#</sup>AAS: amino acid score; (Met+Cys): first limiting amino acid.

Table 3.  
Weight gain, food and protein intakes and protein utilization in rats after twenty eight days of experiment

| Parameter                    | Diet*                       |                               |                             |                                  |
|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
|                              | C <sub>10</sub>             | C <sub>8</sub> G <sub>2</sub> | C <sub>12.5</sub>           | C <sub>10</sub> G <sub>2.5</sub> |
| Final weight (g)             | 168.1 ± 17.6 <sup>a</sup>   | 151.3 ± 15.7 <sup>a</sup>     | 159.1 ± 16.2 <sup>a</sup>   | 141.3 ± 16.2 <sup>a</sup>        |
| Weight gain (g)              | 114.0 ± 15.9 <sup>a</sup>   | 99.6 ± 14.7 <sup>a</sup>      | 106.3 ± 16.5 <sup>a</sup>   | 87.6 ± 16.1 <sup>a</sup>         |
| Total food intake (g)        | 379.4 ± 37.5 <sup>a</sup>   | 386.0 ± 38.8 <sup>a</sup>     | 357.8 ± 40.8 <sup>a</sup>   | 334.6 ± 41.4 <sup>a</sup>        |
| Total energy intake (kcal)   | 1467.0 ± 145.1 <sup>a</sup> | 1491.6 ± 149.8 <sup>a</sup>   | 1382.5 ± 157.7 <sup>a</sup> | 1296.8 ± 160.4                   |
| Daily food intake (g)        | 13.6 ± 1.3 <sup>a</sup>     | 13.8 ± 1.4 <sup>a</sup>       | 12.8 ± 1.5 <sup>a</sup>     | 12.0 ± 1.5 <sup>a</sup>          |
| Food intake (%) <sup>†</sup> | 81.5 ± 6.6 <sup>a</sup>     | 80.5 ± 7.4 <sup>a</sup>       | 78.3 ± 8.0 <sup>a</sup>     | 73.1 ± 7.5 <sup>a</sup>          |
| Total protein intake (g)     | 39.2 ± 3.9 <sup>a</sup>     | 41.3 ± 4.2 <sup>a</sup>       | 45.8 ± 5.2 <sup>a</sup>     | 42.8 ± 5.3 <sup>a</sup>          |
| FCR <sup>#</sup>             | 3.35 ± 0.19 <sup>c</sup>    | 3.91 ± 0.34 <sup>a</sup>      | 3.39 ± 0.28 <sup>b,c</sup>  | 3.86 ± 0.32 <sup>a,b</sup>       |
| PER <sup>#</sup>             | 2.90 ± 0.17 <sup>a</sup>    | 2.41 ± 0.22 <sup>b</sup>      | 2.32 ± 0.19 <sup>b</sup>    | 2.03 ± 0.16 <sup>c</sup>         |
| RPER <sup>#</sup>            | 100.0 <sup>a</sup>          | 83.6 ± 7.7 <sup>b</sup>       | 100.0 <sup>a</sup>          | 87.7 ± 6.9 <sup>b</sup>          |
| Corrected PER                | 2.50 <sup>a</sup>           | 2.08 ± 0.19 <sup>b</sup>      | -                           | -                                |
| True digestibility (%)       | 95.3 ± 1.0 <sup>a</sup>     | 94.9 ± 0.5 <sup>a</sup>       | 94.6 ± 1.2 <sup>a</sup>     | 94.3 ± 0.8 <sup>a</sup>          |

\*C<sub>10</sub>: 10% protein (casein); C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>: 10% protein (8% casein and 2% gelatin); C<sub>12.5</sub>: 12.5% protein (casein); C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub>: 12.5% protein (10% casein and 2.5% gelatin). Different letters in a row indicate significant differences within that row ( $p < .05$ ).

<sup>†</sup> [(diet offered - diet rejected)/ diet offered] x 100].

<sup>#</sup>FCR: Food Conversion Ratio; PER: Protein Efficiency Ratio; RPER: Relative PER.

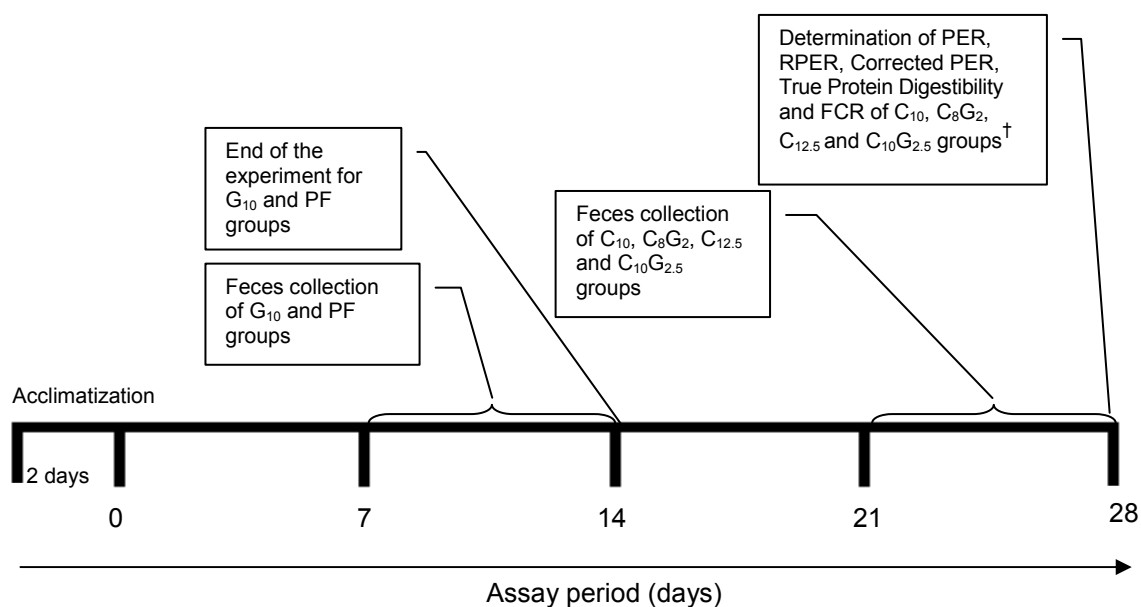


Fig. 1. Experimental design of the assay\*.

\*Diet: C<sub>10</sub> - 10% protein (casein); C<sub>8</sub>G<sub>2</sub> - 10% protein (8% casein and 2% gelatin); C<sub>12.5</sub> - 12.5% protein (casein); C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub> - 12.5% protein (10% casein and 2.5% gelatin); G<sub>10</sub> - 10% protein (gelatin); and PF - protein free.

<sup>†</sup>FCR: Food Conversion Ratio; PER: Protein Efficiency Ratio; RPER: Relative PER.



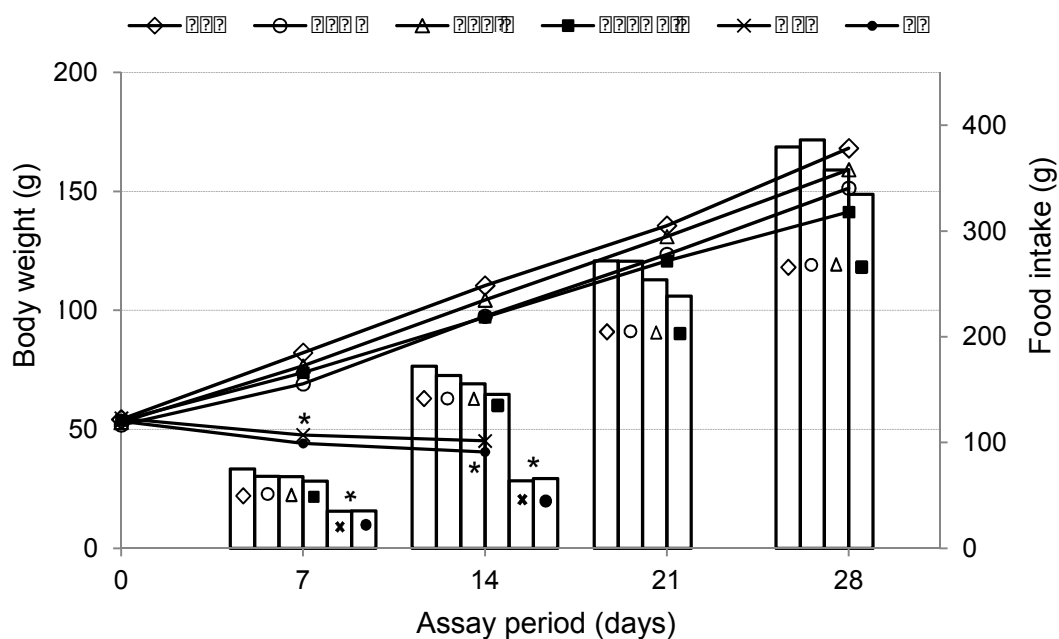


Fig 2. Body weight (lines) and food intake (bars) of rats treated with different diets for 14\* and 28<sup>#</sup> days of experiment.

\*G<sub>10</sub> (10% protein - gelatin) and PF (protein free). Significant differences among these groups and other groups for body weight and food intake on 7 and 14 days ( $p < .05$ ).

<sup>#</sup>C<sub>10</sub>: 10% protein (casein); C<sub>8</sub>G<sub>2</sub>: 10% protein (8% casein; 2% gelatin); C<sub>12.5</sub>: 12.5% protein (casein); C<sub>10</sub>G<sub>2.5</sub>: 12,5% protein (10% casein; 2.5% gelatin)

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

Os resultados desta pesquisa constituem dados relevantes para o risco da utilização da gelatina em casos de consumo restrito de proteína. Por ser uma proteína de baixa qualidade, pode comprometer o estado nutricional em termos proteicos.

Embora o consumo da gelatina tenha boa aceitação, mesmo entre indivíduos debilitados, sugerimos a retirada da gelatina de dietas hospitalares restritivas, como a dieta líquida restrita, e cautela na utilização da mesma em pessoas que apresentam baixa ingestão proteico-calórica, atentar, portanto, para caso em que há restrições alimentares para fins de emagrecimento cuja dieta inclui gelatina.

Recomendamos mais estudos para entender o mecanismo de ação em humanos, além de atenção aos profissionais de saúde na prescrição da gelatina.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO EM ANIMAIS

PROTOCOLO Nº  
381/10

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

**I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino):** PESQUISA

**II - Identificação:**

- ☐ **Título do projeto:** Influência da gelatina na eficácia protéica da caseína em ratos Wistar
- ☐ **Pesquisador Responsável:** Maria Margareth Veloso Naves
- ☐ **Instituição onde será realizado:** Faculdade de Nutrição da UFG – FANUT/UFG
- ☐ **Data de apresentação ao CEP:** 15/12/2010

**III - Objetivos e justificativa do projeto:** Avaliar a utilização protéica endógena de dietas contendo gelatina associada a proteína de alta qualidade (caseína), mediante diferentes parâmetros e índices biológicos.

**IV - Sumário do projeto:**

- ☐ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos:** método alternativo *in vitro* pouco utilizado devido à menor precisão dos resultados.
- ☐ **Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):** serão utilizados 48 ratos albinos da linhagem Wistar, machos, recém desmamados. Os animais serão distribuídos em oito blocos (seis animais/bloco), de acordo com seu peso.
- ☐ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade):** Os ratos serão mantidos em gaiolas individuais de metal galvanizado durante 44 dias (2 adaptação e 42 experimental). Serão mantidas as seguintes condições ambientais padronizadas (DE LUCA et al., 1996): luminosidade mantida por luz artificial (fluorescente) durante 12h/dia (ciclo claro) e alternada por 12 horas sem luz (ciclo escuro), controlada com timer; umidade relativa do ar entre 40 e 70%, controlada por meio de termômetro contendo bulbo seco e úmido e estimada através de tabela de conversão; temperatura entre 20 e 22°C, mantida por aparelho de ar condicionado com termostato para quente e frio e controlada por termômetro; ventilação controlada por exaustão aberta do aparelho de ar condicionado proporcionando trocas frequentes de ar, evitando-se odores fortes, como o amoniacal, prejudicial aos animais e ruídos serão evitados o máximo possível, para não provocar estresse aos animais.

*Handwritten signature: JL*

- ☐ **Alimentação/hidratação:** Durante o período de confinamento os animais receberão água (filtrada) e ração formuladas segundo American Institute of Nutrition (1993), nos níveis 10% e 12,5% de proteína, utilizando como fonte protéica a caseína ou a mistura caseína-gelatina.
- ☐ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada:** não se aplica
- ☐ **Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:** adequada
- ☐ **No caso de aulas, caracterização dos estudantes (curso/idade/conhecimento básico) e das atividades previstas (tipo de manipulação que farão):** não se aplica
- ☐ **Anestésico/analgésico utilizado, se pertinente:** não se aplica
- ☐ **Método de eutanásia (se for o caso):** os animais serão submetidos à eutanásia química, por inalação de CO<sub>2</sub> (40% em ar atmosférico, com administração lenta), antecedida de sedação prévia com xilazina (anestésico) e diazepam (psicotrópico), por ser este o método mais recomendado para minimizar o sofrimento dos animais.
- ☐ **Destino do animal (caso não seja submetido à eutanásia):** Após a eutanásia e dissecação dos animais para coleta de material biológico (fígado), as carcaças dos ratos serão direcionadas ao abrigo externo de lixo hospitalar do Hospital das Clínicas da UFG (HC/UFG). A Companhia de Urbanização de Goiânia (COMURG) será responsável por recolher este material e encaminhar ao aterro sanitário de Goiânia, para as devidas providências. Estes procedimentos serão adotados seguindo os critérios do Ministério da Saúde (2008).

#### IV – Comentários do relator frente às orientações do COBEA

- ☐ **Estrutura do protocolo:** ADEQUADA

##### a) Folha de rosto:

- Ficha de protocolo do projeto de pesquisa: **ADEQUADA**
- Termo de responsabilidade da FANUT/UFG e da equipe de pesquisa: **ADEQUADO**

##### b) Projeto de Pesquisa:

- Revisão de literatura consistente, projeto exequível no cronograma proposto.

- c) Currículo dos pesquisadores:** A equipe possui pesquisadores com experiência e capacitação comprovada para a condução do experimento.

d) **Termo de responsabilidade:** consta do projeto o Termo de Responsabilidade assinado por todos os pesquisadores participantes.

☐ **Análise do Termo de consentimento dos responsáveis por animais:** Não se aplica.

☐ **Análise de sofrimento imposto, métodos alternativos e benefícios:** Metodologia justificada.

☐ **Análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Adequado

☐ **Necessidade do número de animais:** Justificado pela literatura e adequado

☐ **Análise dos métodos de intervenção e eutanásia e destino do animal:** Adequado

**V - Parecer do CEEA/COEP: APROVADO**

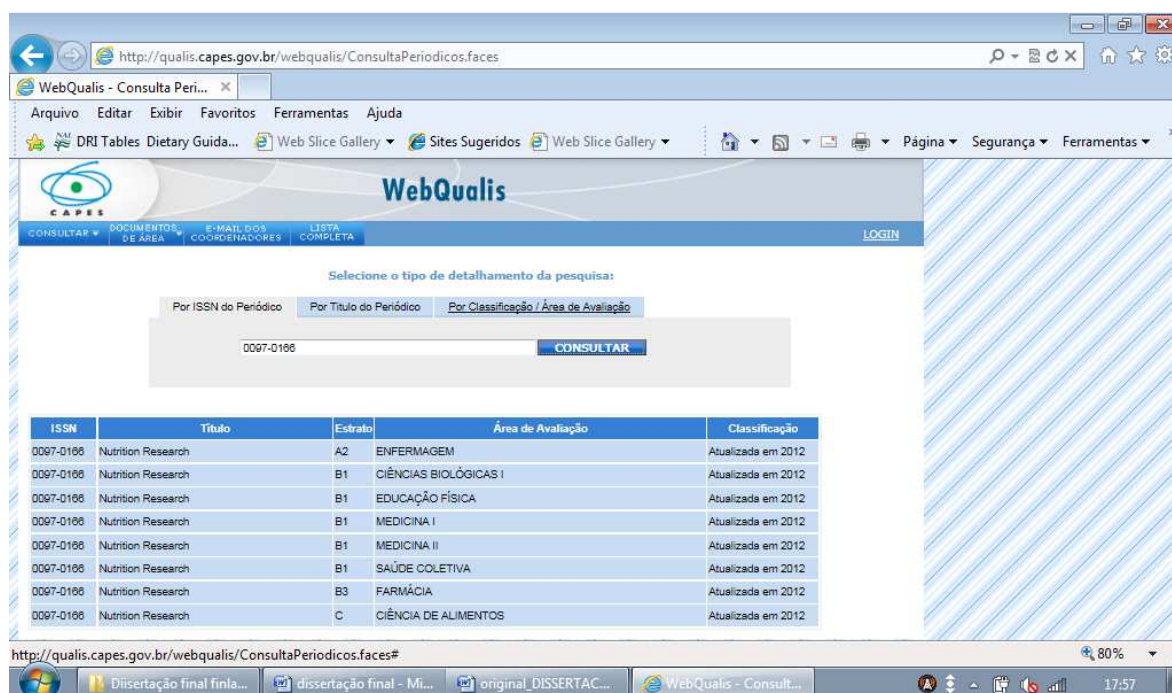
**VI - Data da reunião: 14/03/2011**

*Prof. João Carlos da Rocha Medrad*  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFG

Relatora do Parecer CEP

Coordenador do CEP/PRPPG/UFG

## ANEXO 2 – Comprovante atualizado Qualis Capes



WebQualis - Consulta Peri...

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

DRI Tables Dietary Guida... Web Slice Gallery Sites Sugeridos Web Slice Gallery

Página Segurança Ferramentas

WebQualis

CONSULTAR DOCUMENTOS DE ÁREA E-MAIL DOS COORDENADORES LISTA COMPLETA LOGIN

Selecione o tipo de detalhamento da pesquisa:

Por ISSN do Periódico Por Título do Periódico **Por Classificação / Área de Avaliação**

0097-0106 CONSULTAR

| ISSN      | Título             | Estrato | Área de Avaliação     | Classificação      |
|-----------|--------------------|---------|-----------------------|--------------------|
| 0097-0106 | Nutrition Research | A2      | ENFERMAGEM            | Atualizada em 2012 |
| 0097-0106 | Nutrition Research | B1      | CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I | Atualizada em 2012 |
| 0097-0106 | Nutrition Research | B1      | EDUCAÇÃO FÍSICA       | Atualizada em 2012 |
| 0097-0106 | Nutrition Research | B1      | MEDICINA I            | Atualizada em 2012 |
| 0097-0106 | Nutrition Research | B1      | MEDICINA II           | Atualizada em 2012 |
| 0097-0106 | Nutrition Research | B1      | SAÚDE COLETIVA        | Atualizada em 2012 |
| 0097-0106 | Nutrition Research | B3      | FARMÁCIA              | Atualizada em 2012 |
| 0097-0106 | Nutrition Research | C       | CIÊNCIA DE ALIMENTOS  | Atualizada em 2012 |

http://qualis.capes.gov.br/webqualis/ConsultaPeriodicos.faces#

80%

DiSSERTAÇÃO final fina... dissertação final - Mi... original DISSERTAC... WebQualis - Consult...

17:57

## **ANEXO 3 – Normas de publicação do Nutrition Research**

### **Nutrition Research**

An International Publication for Nutrition to Advance Food and Life Science Research

### **Guide for Authors**

**Nutrition Research** publishes original and review articles covering basic and applied research on all aspects of nutritional sciences. Subjects considered for publication include articles on nutritional biochemistry and metabolism; nutrient requirements in health and disease; digestion and absorption; nutritional anthropology and epidemiology; the influence of socioeconomic, cultural and political factors on nutrition of the individual and the community; the impact of nutrient intake on disease response, work performance and behavior; the consequences of nutritional deficiency on growth and development, endocrine and nervous systems, and immunity; food intolerance and allergy; nutrient-drug interactions; nutrition and aging; nutrition and chronic disease; obesity; and intervention programs.

Manuscripts on nutrition research in both humans and animals will be considered for publication. Issues of the Journal can contain research articles, clinical studies, communications, reviews of topical subjects, editorial commentaries, letters to the editor, and book reviews.

Contact Information:

Dr. Bruce A. Watkins, Editor-in-Chief  
Angela Ranalli-Curtis, Managing Editor

*Nutrition Research*  
Department of Nutritional Sciences  
Nutrition and Biosciences  
University of Connecticut  
Storrs, CT 06269-4017, USA  
E-mail [bruce.watkins@uconn.edu](mailto:bruce.watkins@uconn.edu)  
Tel.: (860) 486-0866

**General Guidelines:** All manuscripts must be submitted to the journal web site (  <http://ees.elsevier.com/nr> ). Authors must submit the text, tables, and artwork in electronic form (Word file) to this web address. All figures and graphic presentation of data must be of the highest quality. Any questions regarding the submission process and all other inquiries should be sent via e-mail to the contacts in the editorial office.

Manuscripts must be written in high quality American English. For assistance, go to the Author's section on the Elsevier website and refer to the Resource Center and Language editing services at:  
<http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/languagepolishing>

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere. In addition, the authors must respond to the questions related to the conflict of interest policy and scientific conduct and publication ethics.



The Journal will not consider for publication a manuscript or work that has already been reported in a publication or is described in a manuscript submitted or accepted for publication elsewhere. This rule does not refer to abstracts of communications presented at scientific meetings. When submitting a manuscript, an author should always make a full disclosure to the editor about all submissions that might be regarded as a duplicate publication of the same or similar work.

The editorial office reserves the right to reject manuscripts that do not comply with these requirements.

## **Authors**

All authors listed in a manuscript submitted to Nutrition Research must have contributed substantially to the work, participated in the writing of the manuscript, and seen and approved the submitted version. All individuals who have contributed to the writing of the manuscript must be listed as authors.

## **How to submit**

- Go to ➡ <http://ees.elsevier.com/nr/>.
- Click on the "register" link and enter the requested information.
- Follow the instructions to upload your files.

**Manuscript Guidelines:** Research articles and Reviews should generally not exceed 6000 words and Communications should not exceed 2,500.

Each manuscript submitted must provide a title page, list of abbreviations, abstract page, introduction, methods and materials, results, discussion, list of references, and appropriate presentation of data in tables and figures. In some cases, the results and discussion sections can be combined (e.g., communications).

Text must be in 12-point font (Times New Roman or Arial), double-spaced, with 1-inch margins. Consecutive line numbers must be included in the left margin, starting with the title page and ending with the reference section. Page numbers must be included in the bottom right-hand corner of each page. Text must be aligned to the left only and include 2 hard returns at the end of each paragraph, heading, and subheading.

Text should be clear and concise. Tables, figures and references must be cited in sequence in the text. Past tense should be used in reference to the work on which the paper is based, while present tense is normally limited to existing knowledge and prevailing concepts. Previous knowledge and new contributions should be clearly differentiated.

**File Submission and Arrangement:** Files must be uploaded in the following order: cover letter, revision letter (when applicable), checklist, text, tables, and figures. All manuscript files must be uploaded separately and in an editable format (cover letter, revision letter, and checklist may be in PDF form). PDF files are not accepted for the text, table, or figure files. After all the files are uploaded, a PDF file is generated automatically.

For assistance with the electronic submission process, please utilize the 'Author Information' links located at ➡ <http://ees.elsevier.com/nr/>.

***Cover letter must include the following:***



- Corresponding author contact information (must have a PhD or MD). Students in graduate programs are not considered corresponding authors.
- Statement that the manuscript has not been submitted elsewhere for publication.
- Signatures of all authors and statement that all authors have contributed to the work and agree to submit it for consideration to Nutrition Research.
- Manuscripts describing research on human subjects and animal models must include a statement that the research was approved by the appropriate committee of the institution. The author must also note the line and page number in which this is indicated in the manuscript text.

***Revision Letter must include the following:***

- Point by point response to each issue raised by the editorial office and peer reviewers (must include line numbers).
- Contact information and name of company/individual who edited the manuscript for American English (if applicable).

***Checklist***

- Download from EES Website.
- Must be completed and signed by Corresponding Author.

***Document File • Title page - page 1***

- Title - single, declarative statement, stating the major finding of the work.
- First name, Middle initial, and Last name of each author (no titles such as MD or PhD).
- The affiliations of each author noted with superscripts.
- Complete contact information for corresponding author.
- Running heads, word counts, and any other information other than that stated above should not be included.
- Abbreviations page - page 2
- Must include 1 abbreviation with meaning per line.
- Abbreviations should be listed first followed by a semicolon and then the meaning.
- Abbreviations must be spelled out when used in the text for the first time.
- Abstract page - page 3
- A single, double-spaced paragraph (250 word limit) that includes the hypothesis for the study, experimental design, use of the model for the study, major results, and conclusion.
- Do not include subheadings in this section.
- It must follow the same format as the rest of the text (alignment, spacing, line numbering, etc.).
- List of at least 5 keywords/phrases taken from the medical subject headings of the Index Medicus ( ➤ <http://www.nlm.nih.gov/mesh/> ) below the abstract. The model used in the study must be included in the keywords.

***Manuscript text***

- Main headings and subheadings must be numbered with Arabic numerals.
- Text must start on a new page and include the following main headings:
- Introduction - must state the hypothesis for the research and the supporting objectives to test the hypothesis. Must also state how this study advances human nutrition.
- Methods and materials - must explain the experimental design, control and treated groups; details of ingredient composition of diets should be presented in a table; all procedures and techniques must be explained and referenced; method of euthanasia for experimental animals must be stated; statistical analyses section must be complete with information on data presentation; must contain statistical tests and appropriate references; and must include an institutional statement of protocol approval for animal or human subjects (human consent is required).

- Results - must thoroughly describe the data presented in tables and figures.
- Discussion- should contain a specific description of the literature findings relevant to the results of the current investigation but not go beyond the data presented in the results. The limitations of the study should be included in this section.
- Acknowledgment (note spelling)
  - Technical or editorial assistance must be acknowledged.
  - Financial (grants or gifts) and other support as deemed as appropriate for the study must be indicated.
  - Do not include author contributions or individual titles (i.e., Dr., PhD, etc...) in this section.
  - If there is a conflict of interest, that must be stated in this section.
- References
  - Number consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
  - In-text citations and reference list numbers must be enclosed within brackets, e.g., [1,2].
  - The author should make certain that there is a strict one-to-one correspondence between references cited in the text and those in the reference list.
  - References should appear as follows:

#### Journal articles

- [1] Alzghoul MB, Gerrard D, Watkins BA, Hannon K. Ectopic expression of IGF-I and Shh by skeletal muscle inhibits disuse-mediated skeletal muscle atrophy and bone osteopenia in vivo. *FASEB J* 2004;18:221-3.
- [2] Friedman AN, Moe SM, Perkins SM, Li Y, Watkins BA. Fish consumption and omega-3 fatty acid status and determinants in long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2006;47:1064-71.
- [3] Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE. Therapeutic perspectives on the combination of  $\alpha$ -lipoic acid and vitamin E. *Nutr Res* 2006;26:1-5.

#### Books

- [4] Katz DL. Nutrition in clinical practice: a comprehensive, evidence-based manual for the practitioner. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

#### Book chapters

- [5] Hennig B, Toborek M, Ramadass P, Ludewig G, Robertson LW. Polychlorinated biphenyls, oxidative stress and diet. In: Preedy VR, Watson RR, editors. Reviews in food and nutrition toxicity. Vol. 3. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 93-128.

**Note that a supplement on proper use of tables and figures is provided online via the EES website.**

To properly submit digital artwork, please see "artwork guidelines" at <http://ees.elsevier.com/nr/> for details regarding format, dimensions, and format of your artwork.

#### **Tables\***

- Must be numbered consecutively with Arabic numerals.
- Start each table on its own page.
- Use minimal horizontal lines and no vertical lines.
- Must have a description so that reader can understand the table without referring to the text.
- Must have an explanation of the values and statistics used for analysis of the data and properly referenced.
- Tables must be in an editable (word) file.

\* All studies that include experimental diets must provide a table that lists the ingredients and enough detail for the nutrient content of those diets. Reference to

established diets (such as AIN 93G) is appropriate when the major ingredients are listed and the premix levels are provided (actual details of each vitamin and mineral source listed is not necessary in this case). Diets that are developed with different lipid sources should provide a fatty acid compositional analysis of the lipids. In addition, studies that test a botanical or phytochemical ingredient should provide enough chemical compositional analysis as well as the amount of the active compounds.

### **Figures**

- Must be numbered consecutively with Arabic numerals.
- Start each figure on its own page.
- Provide clear axes labels and scale.
- Use a simple space filling format (open, closed and hatched bars, etc.) for a clear and concise presentation of the data for easy interpretation.
- Must have a description that the reader can understand without referring to the text.
- Must have an explanation of the values and statistics used for analysis of the data.

**Statistical Methods:** Tests of statistical analysis must be fully described. Statements about statistical significance of results must be accompanied by indications of the level of significance. This information must be included where numerical and graphic presentation of data is made in the manuscript in footnotes to tables and in the captions of figures rather than in the text only. Also in the statistical methods section of the manuscript, indicate how the data are presented. For example, means - standard deviation must be shown. Always take special care to present only the significant figures for a measurement and appropriate sample size relevant to a power analysis.

**Institutional Approval:** Manuscripts describing research on human subjects must include a statement that the research was approved by the appropriate committee of the institution. For research on experimental animals, authors are expected to have followed the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals and indicate institutional approval. This statement must be included in the methods section of the manuscript and disclosed in the cover letter.

**Abbreviations, Symbols and Units of Measure:** Use only standard abbreviations (Scientific Style and Format, The CBE Style Manual for Authors, Editors, and Publishers, 6th ed. Council of Biology, Chicago IL 1994). Abbreviations should not be used in the title or major headings. The full term for which an abbreviation stands for should precede its first use in the text. The International System of Units (SI) should be used for all measurements.

**Footnotes:** Footnotes should be kept to a minimum and numbered consecutively throughout the text with superscript Arabic numerals. They should be double-spaced and not include displayed formulae or tables.

**Displayed Formulae:** Displayed formulae should be numbered consecutively throughout the manuscript as (1), (2), etc. against the right-hand margin of the page. In cases where the derivation of formulae has been abbreviated, it is of great help to the referees if the full derivation can be presented on a separate sheet not to be published.

**Conflict of Interest Policy:** The journal now has instituted requirements for authors of submitted manuscripts to indicate their individual contributions and conflict of

interest to the research. In doing so all authors must disclose all or any potential conflicts of financial or personal interest in a scientific project related to the publication. Financial support for the research must be included with the disclosed information. The conflict of interest must be included in the cover letter for the submitted manuscript. If a conflict of interest exists, the corresponding author must identify such in the acknowledgments section.

**Suggested Reviewers:** Authors must provide the names and complete contact information (including e-mail address, country, and affiliation) of up to 4 experts who may be called upon to review the manuscript. Authors should try to provide individuals from a global perspective.

**Copyright:** Upon acceptance of an article for publication, the author(s) will be asked to transfer copyright of the article to the publisher. As a journal author, you retain rights for a large number of author uses, including use by your employing institute or company. These rights are retained and permitted without the need to obtain specific permission from Elsevier. This transfer will ensure the widest possible dissemination of the information.

**Page Proofs:** Page proofs will be sent to the corresponding author via e-mail. Proofs should be corrected carefully; the responsibility for detecting errors lies with the author. Corrections should be restricted to instances in which the proof is at variance with the manuscript. Extensive changes (any significant change in text or tables and figures) will be charged to the corresponding author. Offprints can be ordered from the publisher.

**Scientific Integrity:** Nutrition Research has a policy to follow all aspects of publication ethics and depends on the authors of submitted manuscripts to provide complete information on conflict of interests for the execution of research and data collection. The editorial office and publishers of Nutrition Research rely on the authors and their respective institutions to follow the policies to preserve scientific integrity in research and support publication ethics.

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

*Updated November*

2010 [http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/525483/authorinstructions](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/525483/authorinstructions)

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>