



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

**EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E ENZIMÁTICO NA  
OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DO ISOLADO PROTÉICO DO  
SORO DE LEITE COM ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA**

Elizabete Lourenço da Costa  
Nutricionista  
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**CAMPINAS, SP**

**2004**

**ELIZABETE LOURENÇO DA COSTA**

**EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO E ENZIMÁTICO NA  
OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE SORO DE LEITE COM  
ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA**

**Profa. Dra. Flavia Maria Netto  
Orientadora**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração: Tecnologia Aplicada à Nutrição.

Campinas

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

C823e Costa, Elizabete Lourenço da  
Efeito do processamento térmico e enzimático na  
obtenção de hidrolisados do isolado protéico do soro de  
leite com atividade anti-hipertensiva / Elizabete Lourenço  
da Costa. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Flavia Maria Netto  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Proteínas. 2.Soro de Leite. 3.Peptídeos.  
4.Hipertensão. 5.Enzima conversora da angiotensina.  
I.Netto, Flavia Maria. II.Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
III.Título.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Flavia Maria Netto

---

Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco

---

Profa. Dra. Ursula Maria Lanfer Marquez

---

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán

---

Prof. Dr. José Antonio da Rocha Gontijo

---

Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

---

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

*Dedico este trabalho ao Leandro, uma das poucas pessoas que sabe o valor real que ele representa para mim e por ter dividido comigo uma grande parte dele, desde a empolgação até a ansiedade, sempre com muita paciência e amor.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Flavia, pela dedicada orientação e amizade que me ajudaram a transpor vários obstáculos durante o curso;

Agradeço a comissão examinadora pela correção da tese com valiosas sugestões;

Agradeço as amigas Sônia, Ivonete, Vera, Janai, Noemi e Adriane pelo agradável convívio, apoio e amizade;

Agradeço aos amigos Kelly, Marco Antonio e Fernando Von Zuben, pela prestatividade e incentivo;

Agradeço ao Prof. Dr. Gontijo por ter tornado possível a realização do experimento biológico, bem como à bióloga Amanda Roberta, que me auxiliou de maneira imprescindível nos experimentos de função renal;

Agradeço ao Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan por permitir a utilização do aparelho de eletroforese capilar e a minha querida amiga Vera Sônia que muito me ajudou nessas análises;

Agradeço Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco pela doação das enzimas Proteomix e Alcalase;

Agradeço a Adilson Sortoratto do CPQBA pela paciência nas “inúmeras” análises de densitometria dos géis de eletroforese;

Agradeço a Davigo pelo fornecimento do isolado;

Agradeço a Francisco Carraro pela amizade e prestatividade nas análises por HPLC;

Agradeço à Eliana pela organização do LBN e pelo auxílio em vários procedimentos analíticos;

Agradeço ao CNPq pela consecção da bolsa de doutorado;

Agradeço aos meus queridos pais, por todos os esforços e ensinamentos que me permitiram chegar até aqui;

Agradeço aos meus queridos irmãos pela amizade, carinho e incentivo sempre constante em minha vida;

Agradeço ao Leo pelo grande incentivo e apoio em todos os sentidos;

A todos que de modo direto ou indireto contribuíram para a realização desta conquista, agradeço encarecidamente;

Finalmente, agradeço a Deus, por ter me concedido serenidade e muita força de vontade para alcançar o meu objetivo em Campinas.

## RESUMO

Além das propriedades funcionais tecnológicas e nutricionais, algumas proteínas apresentam atividade biológica, como por exemplo: a influência no metabolismo ósseo apresentada pelas proteínas do soro do leite; atividade antimicrobiana, apresentada pela lactoferrina e a lisozima; atividade imunestimulante desempenhada pelas imunoglobulinas, entre outras. Essas funções também podem estar associadas aos chamados peptídeos bioativos, presentes em determinadas seqüências da proteína, liberados após a hidrólise enzimática. A industrialização deste tipo de produto está dando seus primeiros passos no sentido do desenvolvimento da produção econômica e de técnicas adequadas que preservem ou concentrem a atividade. O impacto do tratamento térmico para a produção de peptídeos imunomoduladores e caseinofosfopeptídeos tem sido bem estabelecido. No caso dos peptídeos com atividade anti-hipertensiva, ainda há controvérsias sobre a necessidade da manutenção da estrutura nativa antes do tratamento enzimático. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do tratamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados derivados do isolado protéico de soro de leite com atividade anti-hipertensiva. Como matéria-prima, utilizou-se o isolado protéico de soro de leite (IPSL) Davisco™, que foi submetido ao tratamento térmico a 65°C e 95°C, de modo a obter proteínas com dois diferentes graus de desnaturação. Os isolados protéicos nativo e desnaturados foram hidrolisados até 10% de grau de hidrólise (GH), com as enzimas Alcalase,  $\alpha$ -quimotripsina e Proteomix. Os hidrolisados obtidos foram caracterizados e analisados quanto à capacidade de inibir a enzima conversora da angiotensina II. Estes hidrolisados foram posteriormente administrados a ratos espontaneamente hipertensos (SHR) para pesquisar a atividade anti-hipertensiva *in vivo*. A desnaturação parcial das proteínas do soro prévia à hidrólise enzimática, provocada pelo tratamento a 65°C, resultou em hidrolisados com melhor atividade inibitória da ACE, em comparação aos hidrolisados obtidos com a mesma enzima a partir do isolado nativo ou desnaturado a 95°C. Dentre as enzimas empregadas, a que produziu hidrolisados com melhor atividade inibitória da ACE foi a  $\alpha$ -quimotripsina, com valores IC<sub>50</sub> de 0,40mg/mL para os hidrolisados derivados do IPSL nativo e desnaturado a 95°C e 0,05mg/mL para o hidrolisado desnaturado a 65°C. Por outro lado, o hidrolisado obtido com Alcalase a partir do IPSL desnaturado a 65°C (65A) foi o único a induzir redução significativa da pressão arterial nos ratos SHR até 4hs após a administração por via oral, onde a diferença em relação à pressão arterial

basal do grupo foi de -14,94mmHg. Os hidrolisados com melhor atividade inibitória da ACE foram administrados aos ratos SHR por via intraperitoneal. O hidrolisado 65A mostrou efeito mais intenso, observado até 6hs após a administração, onde a diferença com a pressão basal foi de -28,1mmHg. O hidrolisado de melhor atividade inibitória da ACE, 65Q, também foi eficiente na redução da pressão arterial dos ratos SHR após administração por via intraperitoneal. A redução da pressão arterial foi significativa até 4hs depois da administração, sendo a diferença de -22,9mmHg em relação à pressão basal. O hidrolisado 65A, que apresentou ação anti-hipertensiva mais potentes que os demais, reduziu a taxa de filtração glomerular nos ratos SHR de modo dose-dependente e provocou um aumento na reabsorção de sódio, interpretado como um mecanismo auto-regulador para conservação de fluidos e sais. Para verificar a faixa de peso molecular de maior atividade biológica do hidrolisado 65A, este hidrolisado foi ultrafiltrado em membranas de 30kDa e 3kDa, os permeatos foram analisados quanto à capacidade em inibir a ACE, observando-se que a fração de baixo peso molecular (3kDa) apresentou atividade inibitória a ACE menor do que o hidrolisado integral e do que o permeato obtido a partir da membrana de 30kDa (2,37mg/mL, 0,68mg/mL e 0,75mg/mL, respectivamente). Em conclusão, a desnaturação a 65°C do isolado protéico de soro de leite, prévia à hidrólise, promoveu o aumento da atividade inibitória da ACE. Entretanto, a maior parte destes hidrolisados, apesar de manifestar inibição satisfatória sobre a ACE, não foi eficiente em reduzir a pressão arterial dos animais, pois apenas o produto desnaturado a 65°C e hidrolisado pela Alcalase apresentou ação anti-hipertensiva significativa após a administração por via oral, sugerindo que os demais não foram resistentes.

## ABSTRACT

in addition to the functional and nutritional properties, some proteins present biological activity. for instance, whey proteins influence bone metabolism, lactoferrin and lysozyme present antimicrobial activity, and immunoglobulins have immunomodulating activity. these biological functions may be associated with bioactive peptides released by enzymatic hydrolysis. the industrial manufacture of these products is beginning to develop adequate technologies to preserve or improve the biological activity in an economic manner. the impact of heat treatment on the production of immunomodulators and caseinophosphopeptides has been well established. however, for antihypertensive peptides, little knowledge is available about the necessity of using proteins in their native form before the enzymatic treatment. this thesis was aimed at studying the heat and enzymatic treatments in the production of antihypertensive hydrolysates derived from milk whey protein isolate. the raw material used was the whey protein isolate (wpi) supplied by davisco™. the wpi was heated at 65°C and 95°C to give two different denaturation degrees. the native and denatured wpi were hydrolysed by alcalase, chymotrypsin and proteomix, up to a hydrolysis degree of 10%. the hydrolysates obtained were characterized and analyzed regarding their capacity to inhibit the angiotensin-ii converting enzyme (ace). these hydrolysates were administered to spontaneously hypertensive rats (shr) to study the *in vivo* antihypertensive activity. the heat treatment at 65°C, before hydrolysis, improved the ace-inhibitory activity of the hydrolysates when compared to the ones obtained by the native isolate or denatured at 95°C wpi. among the enzymes tested, chymotrypsin was the most efficient in the release of ace-inhibitory hydrolysates, with  $ic_{50}$  of 0.40mg/ml to products derived from native and denatured wpi at 95°C, and 0.05mg/ml to the hydrolysate derived from denatured wpi at 65°C. on the other hand, the hydrolysate by alcalase derived from denatured wpi at 65°C (65a) was the only one efficient in decreasing the arterial blood pressure on shr rats up to 4 hours after oral administration; the difference to the basal blood pressure was -14.94mmhg. the best hydrolysate obtained by each enzyme was administrated to the rats by intraperitoneal injection. the activity of the hydrolysate 65a was confirmed by an effective decrease in the animals' arterial blood pressure, observed up to 6 hours after the intraperitoneal administration; the difference to the basal blood pressure was -28.1mmhg. the hydrolysate that presented the best ace-inhibitory activity also decreased significantly the animals' arterial blood pressure via intraperitoneal administration up to 4 hours after the administration. the difference to the basal blood pressure was -22.9mmhg. the hydrolysate 65a with higher antihypertensive activity also induced a decrease in the glomerular filtration in a dose-dependent manner. in addition, it promoted an increase in the sodium reabsorption that can be interpreted as a mechanism for the conservation of sodium and water in response to the decrease in the blood pressure. to evaluate the molecular weight zone of the hydrolysate 65a, it was ultrafiltrated through membranes having cut-off values of 30kda and 3kda. the permeates were analyzed regarding their ace-inhibitory activity. the 3kda permeate contained the lowest percentage of ace-inhibitory activity, when compared to the activity in the unfractionated hydrolysate and the 30kda permeate (2.37mg/ml, 0.68mg/ml and 0.75mg/ml, respectively).

in conclusion, the heat denaturation at 65°C in wpi, before enzymatic hydrolysis by alcalase, chymotrypsin and proteomix, improved the ace-inhibitory activity. although most of these hydrolysates present satisfactory ace-inhibitory activity, these were not efficient in reducing the arterial blood pressure of the rats, because only the 65a hydrolysate was efficient when administered orally, suggesting that the others hydrolysates didn't resist at gastric and pancreatic attack.

# SUMÁRIO

Índice de tabelas .....	xiii
Índice de figuras .....	xiv
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Objetivos .....	2
1.2. Organização do Texto .....	3
<b>2. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>5</b>
2.1. Proteínas do Soro do Leite .....	5
2.1.1. $\beta$ -lactoglobulina .....	6
2.1.2. $\alpha$ -lactalbumina .....	7
2.1.3. Soralbumina bovina .....	8
2.1.4. Imunoglobulinas, lactoferrina, lisozima e lactoperoxidase .....	9
2.2. Alimentos Funcionais.....	11
2.2.1. Alimentos funcionais de natureza protéica .....	12
2.2.2. Atividade anti-hipertensiva .....	14
2.3. Influência do Processamento na Produção de Peptídeos com Atividade Biológica .....	21
2.3.1. Influência do Processamento Enzimático .....	21
2.3.2. Influência do Processamento Térmico .....	24
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>28</b>
3.1. Material .....	28
3.2. Métodos.....	28
3.2.1. Planejamento geral do experimento .....	28
3.2.2. Obtenção de isolados com diferentes graus de desnaturação .....	29
3.2.3. Caracterização dos isolados protéicos de soro de leite.....	30
3.2.4. Reação de hidrólise .....	31
3.2.5. Produção dos hidrolisados .....	33
3.2.6. Caracterização dos hidrolisados.....	34
3.2.7. Atividade anti-hipertensiva <i>in vitro</i> .....	35
3.2.8. Atividade anti-hipertensiva <i>in vivo</i> .....	37
3.2.9. Análise estatística .....	43
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>44</b>
4.1. Obtenção e caracterização do IPSL com diferentes graus de desnaturação .....	44
4.2. Obtenção dos hidrolisados.....	50
4.2.1. Reações de hidrólise .....	50
4.2.2. Obtenção dos hidrolisados .....	54
4.2.3. Caracterização dos Hidrolisados.....	55
4.3. Atividade anti-hipertensiva <i>in vitro</i> .....	64
4.3.1. Padronização do método para determinação da atividade da ACE.....	64
4.3.2. Determinação da atividade ACE-inibitória dos hidrolisados .....	69

4.4. Atividade anti-hipertensiva <i>in vivo</i> .....	72
4.5. Fracionamento do hidrolisado 65A e atividade inibitória da ACE.....	78
4.6. Influência do hidrolisado 65A na função renal dos ratos espontaneamente hipertensos.....	80
5. Conclusões.....	86
6. Contribuições e Perspectivas Futuras.....	88
Referências Bibliográficas.....	89

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Características térmicas do isolado protéico de soro de leite tratado com diferentes temperaturas. ....	48
Tabela 2: Determinação do grau de hidrólise pelo método do TNBS nos hidrolisados obtidos em reação com pH controlado por NaOH, NH <sub>4</sub> OH e sem controle de pH. ....	53
Tabela 3: Teor percentual de cinzas dos hidrolisados obtidos em reações com pH controlado por NaOH e NH <sub>4</sub> OH. ....	53
Tabela 4: Composição centesimal aproximada do isolado protéico do soro de leite e de seus hidrolisados. ....	56
Tabela 5: Distribuição de hidrofobicidade dos hidrolisados. ....	61
Tabela 6: Variação do ácido hipúrico determinado por eletroforese capilar, sem prévia extração da mistura de reação e por espectrofotometria após extração com acetato de etila. ....	69
Tabela 7: Variação da pressão arterial média de ratos SHR após administração oral de 0,5g/kg do IPSL hidrolisado com diferentes enzimas e tratamentos térmicos. ....	73
Tabela 8: Redução máxima de pressão arterial observada após a administração dos hidrolisados aos ratos SHR. ....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Molécula de imunoglobulina. A região variável (V) é responsável pelo reconhecimento e ligação antigênica, e a região constante (C) é responsável pela ligação aos receptores celulares. ....	9
Figura 2: Mecanismo vasoconstrictor renina-angiotensina para controle da pressão arterial. ....	15
Figura 3: Fluxograma dos experimentos desde a desnaturação dos isolados até a obtenção dos hidrolisados e aplicação destes em testes de atividade biológica. ....	29
Figura 4: Ajuste das condições de controle de pH durante a hidrólise do IPSLN pela ação das enzimas Alcalase, $\alpha$ -quimotripsina e Proteomix. ....	32
Figura 5: Animais experimentais e acondicionamento. (a) Ratos espontaneamente hipertensos (SHR – <i>spontaneously hypertensive rats</i> ). (b) Acondicionamento dos animais. ....	38
Figura 6: Fluxograma dos experimentos de determinação da pressão arterial dos animais após administração dos hidrolisados por via oral. ....	39
Figura 7: Aparelho para determinação da Pressão Arterial em ratos SHR. ....	40
Figura 8: Solubilidade das proteínas do IPSL nativo em função do pH. ....	44
Figura 9: Solubilidade das proteínas do IPSL no pH 4,6 em função da temperatura de tratamento térmico. ....	45
Figura 10: Concentração dos grupos sulfidril livres no isolado protéico de soro de leite em função da temperatura de tratamento térmico. ....	46
Figura 11: Curvas de calorimetria diferencial de varredura, (a) IPSLN. (b) IPSL65. (c) IPSL95. ....	47
Figura 12: Perfil cromatográfico das principais frações do IPSL em função da intensidade do tratamento térmico - IPSL nativo(a); IPSL65(b) e IPSL95(c). ....	49
Figura 13: Curva de hidrólise do IPSLN utilizando (a) Alcalase; (b) $\alpha$ -quimotripsina; (c) Proteomix, com pH da reação controlado pela adição de NaOH. ....	51
Figura 14: Curva de hidrólise do IPSLN utilizando (a) Alcalase; (b) $\alpha$ -quimotripsina; (c) Proteomix, com pH da reação controlado pela adição de $\text{NH}_4\text{OH}$ . ....	52
Figura 15: Curva de hidrólise do IPSLN utilizando (a) Alcalase; (b) $\alpha$ -quimotripsina; (c) Proteomix e queda do pH durante a reação. ....	52
Figura 16: Curva de hidrólise dos isolados IPSLN, IPSL65 e IPSL95 pela Alcalase, em pH-Stat com titulação de $\text{NH}_4\text{OH}$ . ....	54
Figura 17: Curva de hidrólise dos isolados IPSLN, IPSL65 e IPSL95 pela $\alpha$ -quimotripsina, em pH-Stat com titulação de $\text{NH}_4\text{OH}$ . ....	55
Figura 18: Curva de hidrólise dos isolados IPSLN, IPSL65 e IPSL95 pela Proteomix, em pH-Stat com titulação de $\text{NH}_4\text{OH}$ . ....	55
Figura 19: Perfil cromatográfico dos hidrolisados obtidos pela ação da Alcalase: NA (a), 65A (b) e 95A (c). ....	57
Figura 20: Perfil cromatográfico dos hidrolisados obtidos pela ação da $\alpha$ -quimotripsina: NQ (a), 65Q (b) e 95Q (c). ....	58

Figura 21: Perfil cromatográfico dos hidrolisados obtidos pela ação da Proteomix: NP (a), 65P (b) e 95P (c).....	59
Figura 22: Perfil cromatográfico do hidrolisado comercial Biozate. ....	59
Figura 23: Cromatografia de exclusão molecular dos hidrolisados obtidos pela ação da Alcalase: NA (a), 65A (b) e 95A (c). ....	61
Figura 24: Cromatografia de exclusão molecular dos hidrolisados obtidos pela ação da $\alpha$ -quimotripsina: NQ (a), 65Q (b) e 95Q (c). ....	62
Figura 25: Cromatografia de exclusão molecular dos hidrolisados obtidos pela ação da Proteomix: NP (a), 65P (b) e 95P (c). ....	62
Figura 26: Eletroforese SDS-PAGE ( <i>High Density</i> ) dos hidrolisados.....	64
Figura 27: Formação do ácido hipúrico pela ACE a partir do substrato Hipiril-histidil-leucina.....	65
Figura 28: Comparação entre métodos para determinar a atividade da Enzima Conversora da Angiotensina.....	67
Figura 29: Eletroferograma mostrando o efeito da incubação de concentrações crescentes da ACE sobre a formação do ácido hipúrico a partir do HHL, detectado por eletroforese capilar, (a) 2,5mU; (b) 5mU e (c) 10mU da ACE, por tubo de reação. ....	67
Figura 30: Eletroferograma mostrando a presença do HHL e ácido hipúrico (AH) após a etapa de extração do AH com acetato de etila.....	68
Figura 31: Espectros de absorção ultravioleta do AH (a) e HHL (b).....	68
Figura 32: Liberação do ácido hipúrico (AH) na ausência de inibidor da reação (a) e não-liberação de AH na presença de 10mg/mL do hidrolisado NQ.....	70
Figura 33: Inibição da ACE em função da variação da concentração do hidrolisado NQ. ....	70
Figura 34: Valor IC <sub>50</sub> (mg/mL) obtido para os hidrolisados do IPSL e para o hidrolisado comercial Biozate. ....	71
Figura 35: Comportamento da pressão arterial média de ratos SHR após injeção intraperitoneal do hidrolisado 65A (a), 65Q (b), 65P (c) e do hidrolisado comercial Biozate (d), em comparação com a injeção de solução salina e captopril. ....	74
Figura 36: Inibição da ACE <i>in vitro</i> em função da concentração das frações do hidrolisado 65A. ....	79
Figura 37: Curva dose-resposta da redução da PA em ratos espontaneamente hipertensos para o hidrolisado 65A, após injeção intraperitoneal. ....	80
Figura 38: Taxa de filtração glomerular estimada pelo <i>clearance</i> de creatinina após a administração do hidrolisado nas doses de 0,5g/kg (a) e 1,0g/kg (b).....	82
Figura 39: Fração de excreção de sódio após a administração de 0,5g/kg (a) e 1,0g/kg (b) do hidrolisado. ....	82
Figura 40: Fração de excreção proximal de sódio após a administração de 1,0g/kg (a) e 0,5g/kg (b) do hidrolisado 65A. ....	83
Figura 41: Fração de excreção pós-proximal de sódio após a administração de 0,5g/kg (a) e 1,0g/kg (b) do hidrolisado 65A. ....	83
Figura 42: Fração de excreção de potássio após a administração de 0,5g/kg (a) e 1,0g/kg (b) do hidrolisado .....	84

## 1. Introdução

Além das propriedades funcionais tecnológicas e nutricionais, algumas proteínas apresentam atividade biológica, como por exemplo: a influência no metabolismo ósseo apresentada pelas proteínas do soro do leite (TAKADA et al, 1997); atividade antimicrobiana, apresentada pela lactoferrina (MEISEL, 1998); atividade imunoestimulante desempenhada pelas imunoglobulinas (KORHONEN et al., 1998). Essas funções também podem estar associadas aos chamados peptídeos bioativos, presentes em determinadas seqüências da proteína, liberados após a hidrólise enzimática *in vivo* ou *in vitro* (KORHONEN et al., 1998).

Estudos recentes mostram um grande número de hidrolisados ou peptídeos derivados de várias fontes protéicas, com eficiência comprovada *in vitro* e/ou *in vivo*, entre elas podem ser destacadas as proteínas do leite (SEPPO et al., 2002), do pescado (FUJITA; YOKOYAMA e YOSHIKAWA, 2000) e da soja (WU e DING, 2002).

É crescente o interesse no desenvolvimento de alimentos contendo peptídeos funcionais, por parte das indústrias farmacêutica e de alimentos, em virtude do valor que podem alcançar. Desde 1998, Meisel já indicava que os caseinofosfopeptídeos e os peptídeos anti-hipertensivos seriam os favoritos para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Recentemente foram lançados produtos alimentícios com o apelo nutricional e funcional, como Immunocal™, que apresenta efeito estimulante da síntese de glutatona e o Biozate™, que apresenta atividade anti-hipertensiva.

As estimativas de hipertensão arterial no Brasil, apresentadas em estudos populacionais, indicam uma prevalência entre 15% e 30% para os homens, e de 15% a 27% para as mulheres (RAMOS e MIRANDA, 1999). Trata-se, portanto, de uma enfermidade freqüente que pode ser prevenida ou controlada pela adoção de medidas como a manutenção do baixo peso corporal, o uso moderado de bebidas alcoólicas e de sal, a prática regular de atividades físicas, e o consumo adequado de potássio através da dieta. Para casos mais severos, o controle da doença é feito pela administração de drogas isoladamente, ou combinadas, que apresentam efeitos adversos.

O interesse na pesquisa de peptídeos com atividade anti-hipertensiva tem crescido, devido evidências da relação inversa entre a ingestão protéica e o risco do desenvolvimento da

hipertensão arterial em populações que consomem dietas ricas em leite e derivados (NURMINEN et al., 2000), pescado e soja (MARTIN, 2003). No entanto, ainda há lacunas no conhecimento para a produção de hidrolisados anti-hipertensivos, sem que haja a perda da atividade durante o processamento industrial.

Dependendo da intensidade do tratamento térmico, pode haver desnaturação e agregação das proteínas, assim, as enzimas digestivas irão catalisar reações com substratos estruturalmente modificados, o que pode resultar na formação de peptídeos diferentes daqueles produzidos a partir da proteína nativa. Não está bem definido se os novos peptídeos provenientes da proteína desnaturada irão contribuir para o aumento ou redução da atividade biológica. A literatura mostra que existem controvérsias quanto a necessidade da conservação da proteína nativa para a obtenção de peptídeos bioativos. A possibilidade da utilização da proteína desnaturada pode facilitar a obtenção de hidrolisados funcionais. O estudo do efeito do tratamento térmico na atividade funcional de uma determinada proteína constitui uma etapa fundamental para o desenvolvimento de um produto com característica terapêutica.

O soro do leite bovino tem sido considerado uma das principais fontes para a produção de ingredientes funcionais a partir da proteína hidrolisada. As técnicas de investigação consistem na determinação da atividade biológica da proteína hidrolisada com uma enzima proteolítica, o isolamento do peptídeo ativo, a determinação de sua estrutura e determinação de sua atividade que geralmente se procede sintetizando um peptídeo de seqüência similar ao determinado a partir da proteína precursora. No entanto, do ponto de vista econômico, a purificação desses peptídeos torna-se inviável, sendo considerado mais adequada a combinação de tratamentos que resultem em produtos de melhor atividade biológica.

### **1.1. Objetivos**

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo da influência do tratamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados do isolado protéico de soro de leite com atividade inibitória da ACE e anti-hipertensiva.

Os objetivos específicos englobam:

- Avaliação do efeito do tratamento térmico nas características físico-químicas das proteínas do isolado protéico desoro de leite;
- Avaliação dos tratamentos térmicos e enzimáticos nas características físico-químicas dos hidrolisados obtidos;
- Avaliação do efeito dos hidrolisados na inibição da ACE e redução da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos;
- Avaliação da influência do hidrolisado de melhor atividade na função renal de ratos espontaneamente hipertensos.

## **1.2. Organização do Texto**

Esta tese está organizada em cinco Seções da seguinte forma:

### **Seção 1: Introdução**

A primeira Seção apresenta a introdução do trabalho ressaltando a importância dos alimentos funcionais e dando ênfase à necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias que preservem ou intensifiquem os componentes bioativos presentes nos alimentos. Também são apresentados os objetivos da pesquisa.

### **Seção 2: Revisão Bibliográfica**

A Seção 2 apresenta uma revisão bibliográfica descrevendo as principais frações protéicas presentes no soro de leite, conceituando os alimentos com funcionalidade biológica com abordagem mais específica para os de natureza protéica e ação anti-hipertensiva. Também é discutido o impacto do tratamento enzimático e térmico sobre a atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados ou peptídeos derivados de diversas fontes protéicas.

### **Seção 3: Material e Métodos**

Na Seção 3 são descritos os materiais e os métodos utilizados para a obtenção e caracterização dos hidrolisados. Também são descritas as análises de avaliação da atividade biológica destes hidrolisados.

### **Seção 4: Resultados e Discussão**

A |Seção 4 apresenta e discute os resultados experimentais obtidos. A primeira parte consta das alterações físico-químicas sofridas pela proteína após a desnaturação e a influência da modificação estrutural no processo de hidrólise enzimática. A segunda parte apresenta a pesquisa de atividade biológica dos hidrolisados obtidos relacionando os resultados com o tratamento térmico e enzimático aplicado a cada hidrolisado. Por último, utilizou-se o hidrolisado mais ativo para um estudo de função renal nos animais.

### **Seção 5: Conclusões**

A Seção 5 apresenta as principais conclusões obtidas no presente trabalho.

### **Seção 6: Contribuições e Perspectivas Futuras**

A Seção 6 apresenta algumas perspectivas para futuras pesquisas que poderão ser realizadas de forma complementar ao presente trabalho.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Proteínas do Soro do Leite

O leite é uma emulsão diluída, na qual os constituintes estão em dispersão coloidal. A fase dispersa é constituída por várias proteínas que apresentam diferentes propriedades físicas e químicas. A caseína constitui 80% do total protéico do leite e as proteínas do soro 20%.

A concentração protéica do soro é muito variável, dependendo de fatores como o estágio de lactação e condições de processamento usados na manufatura do queijo ou caseína. As proteínas do soro são separadas do leite pela precipitação da caseína em pH 4,6 (RICHARDS, 2002).

O soro é constituído por 100% dos carboidratos e 20% do total protéico do leite integral, componentes responsáveis por sua alta putrescibilidade e demanda biológica de oxigênio, que está entre 30.000 e 50.000 mg de oxigênio por litro de soro. Uma fábrica com produção média de 10.000L de soro por dia polui o equivalente a uma população de 5.000 habitantes, por isso, quando descartado como resíduo industrial, o soro de leite tem sido considerado como um problema. Descartar o soro sem um tratamento eficiente não é apenas um crime previsto por lei, mas também rejeitar um alimento de alta qualidade constituído por uma rica fonte de proteínas com diversas propriedades nutricionais, biológicas e funcionais (SMITHERS et al., 1996).

A produção mundial do soro de leite está estimada em valores acima de  $80 \times 10^9$ L/ano. No Brasil, a produção de queijo está em torno de 450.000 toneladas por ano, isso significa que anualmente 4.050.000 toneladas de soro são produzidas (RICHARDS, 2002). Entretanto, todo o potencial comercial do soro não tem sido bem explorado no Brasil devido ao alto custo das tecnologias para a obtenção das frações protéicas concentradas ou isoladas. Os métodos que podem ser empregados para o aproveitamento do soro são baseados na tecnologia de membranas filtrantes e permitem a separação em diferentes frações de componentes com diversos pesos moleculares ou cargas químicas.

Os derivados do soro mais importantes são: o soro desmineralizado por troca iônica ou eletrodialise, muito utilizado para uso em formulações infantis; a lactose refinada; o concentrado protéico de soro, obtido por ultrafiltração com um conteúdo protéico que varia de 35 a 80%; e o isolado protéico de soro que contém acima de 90% de proteína, obtido por troca iônica e diafiltração (LA FUENTE, et al., 2002).

As principais frações protéicas do soro incluem a  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina e a soroalbumina bovina (BSA), nas concentrações de 3,7; 0,6; e 0,3g/L de leite, respectivamente. Outras proteínas estão presentes em concentrações mais baixas, são elas: imunoglobulinas, lisozima, lipase, lactoferina e xantina oxidase (KINSELLA e WHITEHEAD, 1990).

### 2.1.1. $\beta$ -lactoglobulina

A  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) é a proteína mais abundante do soro de leite, correspondendo a mais de 50% do seu total protéico. Ela é a principal responsável pelas características de funcionalidade tecnológica do soro de leite. Em pH fisiológico e temperatura ambiente, a  $\beta$ -Lg está presente no leite na forma de dímero. Isto ocorre devido à interação eletrostática entre aspartato<sup>130</sup> e glutamina<sup>134</sup> de um determinado monômero e o resíduo lisina de um outro monômero (SAWYER et al., 2002).

A provável função biológica da  $\beta$ -Lg consiste na transferência da vitamina A do leite materno para o neonato, via receptores específicos no intestino. Possivelmente a  $\beta$ -Lg facilita a esterificação da vitamina A. O triptofano<sup>19</sup> é o resíduo associado com a ligação entre a  $\beta$ -Lg e o retinol (KINSELLA e WHITEHEAD, 1990). Outras substâncias que se ligam à  $\beta$ -Lg em geral apresentam um caráter hidrofóbico e incluem ácidos graxos, retinóides, colesterol e menos pronunciadamente moléculas de hidrocarbonetos como tolueno e pentano (SAWYER et al., 2002).

A conformação nativa da  $\beta$ -Lg é sensível as variações na temperatura e pH. Abaixo de 2°C e em pH entre 3,7 e 5,0 a proteína se arranja na forma de octâmeros, ao passo que acima de 40°C, ela novamente começa a se dissociar em monômeros. Com o aumento da temperatura acima de 65°C, ocorre desnaturação, que é acompanhada por alterações conformacionais e

exposição de grupos reativos de regiões hidrofóbicas, podendo ocorrer agregação entre monômeros ou outras frações protéicas (HAVEA et al., 2001).

A estrutura da  $\beta$ -Lg contém cinco resíduos de cisteína, dos quais quatro formam duas pontes dissulfídicas (66-160 e 106-119), sendo o resíduo cisteína<sup>121</sup> responsável pelo grupo tiol livre, que normalmente está oculto na forma dimérica, mas apresenta um aumento na reatividade em meios com pH acima de 6,5. Isso facilita as interações tiol-dissulfeto que contribuem com a formação de agregados covalentes, originados após o tratamento térmico (KINSELLA e WHITEHEAD, 1990; SAWYER et al., 2002).

Vários modelos com diferentes graus de complexidade vêm sendo propostos para explicar a desnaturação térmica da  $\beta$ -Lg. O mais aceito envolve a dissociação dos dímeros em monômeros, seguido da perda da estrutura globular e agregação por formação de pontes dissulfídicas e interações não covalentes intra ou intermoleculares (HONG e CREAMER, 2002).

### **2.1.2. $\alpha$ -lactalbumina**

Quantitativamente, a  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La) é a segunda proteína mais importante do soro, representando 20% do total protéico. Esta proteína é constituída por 123 resíduos de aminoácidos arranjados de modo a formar uma estrutura globular compacta com massa molecular de 14,2kDa, que se mantém estável por quatro pontes dissulfídicas entre os resíduos 6 e 120, 28 e 111, 61 e 77, 73 e 91. A  $\alpha$ -La não possui grupos sulfidril livres (MORR e HA, 1993).

A  $\alpha$ -La apresenta um excelente perfil em aminoácidos essenciais, sendo rica em lisina, leucina, treonina, triptofano e cisteína (KINSELLA e WHITEHEAD, 1990).

Durante muito tempo, a  $\alpha$ -La foi considerada mais estável ao tratamento térmico do que as demais proteínas do soro, pois ela apresenta um alto percentual de renaturação após o resfriamento. Chaplin e Lyster (1986) relataram que a  $\alpha$ -La em solução, quando aquecida a 77°C e submetida ao resfriamento imediato, apresenta 10% de desnaturação irreversível. O mesmo procedimento com um tratamento de 95°C resulta em 60% de desnaturação irreversível.

A desnaturação da  $\alpha$ -La ocorre a 66°C. Com o aquecimento podem se formar espécies monoméricas não nativas, dímeros e grandes agregados. A presença da  $\beta$ -Lg e da BSA no sistema acelera a perda da estrutura nativa da  $\alpha$ -La (HONG e CREAMER, 2002).

A  $\alpha$ -La é capaz de ligar-se a íons como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ . O cálcio é fortemente ligado à molécula através de três resíduos de ácido aspártico, dando à  $\alpha$ -La estabilidade contra a desnaturação irreversível. Além disso, a  $\alpha$ -La em sua forma livre de íons  $\text{Ca}^{+2}$  tem sua temperatura de transição térmica reduzida de 66°C para 35°C (HONG e CREAMER, 2002).

A  $\alpha$ -La apresenta um importante papel na modulação da especificidade do substrato galactosiltransferase, que é responsável pela biossíntese da lactose no tecido mamário durante a lactação. A associação entre a  $\alpha$ -La e o complexo lactose-sintetase catalisa a adição da glicose à galactose (KINSELLA e WHITEHEAD, 1990).

### **2.1.3. Soralbumina bovina**

A soralbumina bovina (BSA) é uma proteína globular com massa molecular de 66kDa, idêntica à albumina do soro sanguíneo. Esta proteína apresenta uma única cadeia polipeptídica com 582 resíduos de aminoácidos, 17 pontes dissulfídicas e um grupo tiol livre (MORR e HA, 1993).

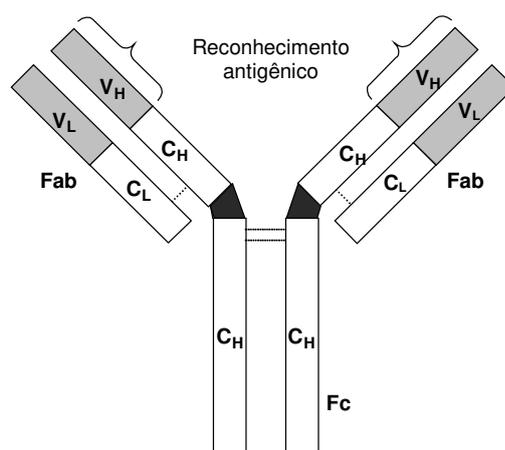
A BSA é sintetizada no fígado, entra na circulação e aparece no leite através das células secretoras, onde totaliza de 1% a 2% das proteínas do soro de leite. Ela tem como função orgânica o transporte de ácidos graxos insolúveis na corrente sanguínea.

A ligação da BSA com ácidos graxos estabiliza a molécula protéica contra a desnaturação térmica, que é observada entre 40°C e 50°C, resultando na exposição dos resíduos apolares que favorecem as interações proteína-proteína. A BSA também sofre desnaturação em pH ácido, atribuída à repulsão mútua dos resíduos positivamente carregados presentes na cadeia polipeptídica (HAYAKAWA et al., 1992).

#### 2.1.4. Imunoglobulinas, lactoferrina, lisozima e lactoperoxidase

As imunoglobulinas correspondem a uma família heterogênea de proteínas. Quatro dos cinco tipos existentes estão presentes no soro de leite. Destas proteínas, a que se encontra em maior quantidade é a imunoglobulina G (IgG), com massa molecular de 160kDa. A imunoglobulina de maior peso molecular é a IgM, com 900kDa, enquanto que a IgA apresenta 360kDa e a IgE 200kDa (MORR e HA, 1993).

A Figura 1 mostra a estrutura básica das imunoglobulinas que consiste em quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas leves e duas pesadas, interligadas por pontes dissulfeto. A porção N-terminal das cadeias leves (Fab) é responsável pela capacidade de reconhecimento e ligação aos anticorpos, enquanto que nas cadeias pesadas, a porção N-terminal (Fc) está envolvida com o reconhecimento dos receptores celulares (TIZARD, 1995).



**Figura 1:** Molécula de imunoglobulina. A região variável (V) é responsável pelo reconhecimento e ligação antigênica, e a região constante (C) é responsável pela ligação aos receptores celulares. (Fonte: De Castro e Timmis, 2002).

A função biológica das imunoglobulinas no leite é a transferência da imunidade passiva da mãe para o filho através do aleitamento, principalmente durante a fase de secreção do colostro, onde as imunoglobulinas constituem cerca de 50% do total protéico. No leite normal este percentual cai para 0,08 (SGARBIERI, 1996; FOLEY e OTTERBY, 1978).

As imunoglobulinas, quando isoladas, exibem maior estabilidade térmica do que a  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg. No entanto, na presença das outras proteínas do leite elas são extremamente termolábeis devido a formação de pontes dissulfeto (MORR e HA, 1993).

As demais proteínas presentes no leite encontram-se em baixas concentrações e geralmente estão envolvidas em atividade biológica, antimicrobiana ou enzimática. Há mais de 50 proteínas já identificadas no leite bovino, embora poucas apresentem interesse tecnológico (SGARBIERI, 1996). Entre as principais é possível citar a lactoferrina, a lactoperoxidase e a lisozima.

A lactoferrina é uma glicoproteína capaz de ligar-se ao ferro, tem massa molecular de 80kDa e ponto isoelétrico entre 8,4 e 9,0. Esta proteína apresenta ação bacteriostática *in vitro* contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteria*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis*. Sua atividade é mais intensa em pH neutro e na presença de íons bicarbonato, sendo o lúmen intestinal o local de condições mais favoráveis ao seu desempenho (PAKKANEN e AALTO, 1997).

Assume-se que um dos mecanismos de ação bacteriostática da lactoferrina seja devido a sua capacidade de ligação com o ferro presente no meio, tornando-o indisponível, e assim dificultando o crescimento microbiano. A lactoferrina apresenta dois sítios de ligação com o íon  $Fe^{+3}$  por molécula, sendo estruturalmente e funcionalmente homóloga a transferrina sérica e ovotransferrina (KINSELLA e WHITEHEAD, 1990).

A atividade antimicrobiana da lactoferrina também vem sendo demonstrada na presença de agentes quelantes de ferro (SAITO, 1991). Além disso, têm sido atribuídas a esta proteína outras funções, como a capacidade de ativação de fagócitos e da resposta imune (PAKKANEN e AALTO, 1997).

A lisozima, uma outra proteína anti-microbiana encontrada em vários fluidos corporais dos mamíferos, provoca a lise de algumas bactérias Gram-positivas pela hidrólise enzimática de seus substratos naturais, as peptidoglicanas, que compõem a parede celular das bactérias (PAKKANEN e AALTO, 1997). Nos bacilos Gram-negativos, a parede celular apresenta uma

camada de lipopolissacarídeos, que dificulta o acesso da lisozima em condições normais e previne a entrada de antibióticos hidrofóbicos ao interior da célula (FACON e SKURA, 1996).

De acordo com Pellegrini (1992), a atividade antimicrobiana da lisozima não se restringe apenas a sua ação enzimática, mas também à sua propriedade catiônica e hidrofóbica.

A lisozima do leite é ativa contra um grande número de bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, que são completamente resistentes à lisozima do ovo. Além disso, sua atividade contra *Escherichia coli* aumenta na presença da lactoferrina (PAKKANEN e AALTO, 1997).

A lactoperoxidase é a principal enzima antibacteriana do colostro e é uma glicoproteína básica com massa molecular de 77kDa, contendo 612 resíduos de aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica e um grupo heme com  $Fe^{+3}$ , sendo que a lactoperoxidase bovina também contém um sítio de alta afinidade pelo cálcio. Esta enzima catalisa a oxidação do tiocianato ( $SCN^-$ ) na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), produzindo um intermediário tóxico que inibe o metabolismo bacteriano via oxidação de grupos sulfidril essenciais nas proteínas. Assim como a lisozima, a lactoperoxidase atua como inibidora do crescimento bacteriano no leite (PAKKANEN e AALTO, 1997).

## 2.2. Alimentos Funcionais

Em princípio, todo alimento desempenha o papel funcional de nutrir o organismo, fornecer energia e contribuir para a prevenção de doenças carenciais pelo fato de fornecer elementos para o crescimento, desenvolvimento e manutenção das atividades vitais. No entanto, está cada vez mais acentuada a procura por alimentos, que de um modo específico, ofereçam benefícios à saúde dos consumidores. Por isso, tem crescido o interesse por parte das indústrias em incorporar às dietas ingredientes que contenham substâncias capazes de oferecer benefícios à saúde (BELLO, 1995).

Estes produtos, chamados funcionais ou nutracêuticos, consistem em um grupo bastante heterogêneo definido como qualquer substância, alimento ou parte de um alimento, que promova benefícios à saúde. Podem estar na forma de nutrientes isolados como vitaminas, pigmentos

antioxidantes, ácidos graxos poliinsaturados, fibras, compostos fenólicos e outros fitoquímicos, suplementos dietéticos, dietas específicas ou alimentos geneticamente modificados (DE FELICE, 1995). Não se aplica aqui, o conceito de funcionalidade tecnológica de produtos desenvolvidos com o objetivo de melhorar características de solubilidade, geleificação, emulsão, viscosidade ou formação de espuma.

O desenvolvimento de alimentos funcionais significa uma maneira eficaz de incrementar os benefícios terapêuticos de muitos alimentos convencionais, além de manter seu nível de aceitação como produto natural. Esta revolução começou na década de 80, quando estudos clínicos divulgaram os efeitos deletérios à saúde relacionados ao consumo excessivo de alimentos refinados, ricos em gorduras saturadas e sódio, e pobres em fibras (BELLO, 1995). Neste mesmo período houve a divulgação dos benefícios das fibras na prevenção do câncer do cólon, o que deu suporte à introdução, pela indústria americana, dos alimentos enriquecidos com fibra dietética, gorduras insaturadas de estrutura ômega e  $\beta$ -caroteno, como substância de atividade antioxidante (DE FELICE 1995).

Existem numerosos trabalhos de investigação científica com o objetivo de esclarecer as funções saudáveis dos mais diversos tipos de alimentos ou nutrientes funcionais. Isso fortalece a teoria da real potencialidade da nutrição preventiva que atrai cada vez mais os consumidores preocupados em melhorar seu estado de saúde através da alimentação, sem se importarem demasiadamente com seu custo (BELLO, 1995).

O futuro desta indústria tem apontado para o desenvolvimento de produtos dirigidos para setores específicos do mercado como alimentos para idosos, fórmulas lácteas infantis, produtos recomendados para pacientes imunodeprimidos, diabéticos e hipertensos (BELLO, 1995).

### **2.2.1. Alimentos funcionais de natureza protéica**

Nesta revisão serão mencionadas apenas algumas das atividades biológicas desempenhadas por alimentos funcionais de natureza protéica, além de cobrirem as necessidades em aminoácidos essenciais. Uma maior ênfase será dada aos peptídeos e hidrolisados com ação anti-hipertensiva, objeto de estudo do presente trabalho.

A expectativa da utilização dos peptídeos como agentes farmacológicos está relacionada à existência de toxinas, hormônios e neurotransmissores que apresentam natureza peptídica e são biologicamente muito potentes (MILLS et al., 1992).

Há consideráveis evidências de que proteínas intactas e peptídeos podem entrar na circulação em quantidades fisiologicamente importantes, como demonstrado por Chabance et al. (1998), que detectaram dois fragmentos da  $\alpha_{S1}$ -caseína (resíduos 1-23 e 1-21) no plasma humano, 20 minutos e 1 hora após a ingestão de leite fermentado.

Os peptídeos funcionais são absorvidos principalmente pela via paracelular, ou seja, qualquer substância solúvel em água que não tenha um transportador específico pode ser absorvida por difusão passiva entre os enterócitos (SHIMIZU, 1999). Em seguida, entram para a circulação sanguínea via sistema porta-hepático, atingindo os órgãos específicos, onde exercem suas atividades.

Dentre as propriedades fisiológico-funcionais que os peptídeos podem desempenhar destacam-se:

- atividade opióide;
- ação estimulante do sistema imunológico;
- aumento da biodisponibilidade de minerais, particularmente do cálcio,
- atividade anti-úlceras, anti-oxidante e anti-carcinogênica
- capacidade de complexação aos ácidos biliares e
- atividade anti-hipertensiva.

Os chamados peptídeos opióides são aqueles derivados da hidrólise enzimática de proteínas alimentares que apresentam afinidade por receptores opióides. Assim como os opióides endógenos, caracterizam-se por similaridades na seqüência primária, como por exemplo a presença da tirosina na porção N-terminal. Alguns destes peptídeos, quando injetados na corrente sanguínea, induzem um efeito analgésico. Devido à ação no sistema nervoso, eles podem estimular a atividade do pâncreas endócrino e reduzir o tempo de trânsito gastrointestinal, neste caso afetando diretamente o aumento da absorção de aminoácidos (TIRELLI, DE NONI e RESMINI, 1997).

Como discutido anteriormente (Seção 2.1.4), o sistema imunológico pode ser modulado pelas imunoglobulinas presentes no soro do leite através da transmissão da imunidade passiva. A partir dessa observação, a indústria de alimentos tem desenvolvido produtos como o Immune milk™ enriquecido com imunoglobulinas produzidas por vacas imunizadas contra diversos patógenos da microbiota intestinal humana (RICHARDS, 2002). A atividade estimulante do sistema imunológico também pode ser manifestada por peptídeos derivados da hidrólise de outras proteínas do leite, como a  $\kappa$ -caseína e  $\alpha$ -lactalbumina (KAYSER e MEISEL, 1996).

Ao lado dos peptídeos estimulantes do sistema imunológico, há também os que apresentam atividade anti-microbiana, que têm sido isolados da lactoferrina hidrolisada pela pepsina. O principal fragmento que contém uma ponte dissulfídica intramolecular chama-se lactoferricina, e possui propriedade anti-bacteriana mais potente do que a lactoferrina intacta, sugerindo que o tratamento facilita o acesso à superfície microbiana (MEISEL, 1997).

Os caseinofosopeptídeos originados da hidrólise das caseínas inibem a cristalização e precipitação do cálcio e fosfato e são resistentes à hidrólise pelas enzimas pancreáticas. Dessa forma, eles apresentam uma grande importância na disponibilidade do cálcio, embora também possam atuar como carreadores de outros elementos, como zinco, ferro e cobre (MEISEL, 1998).

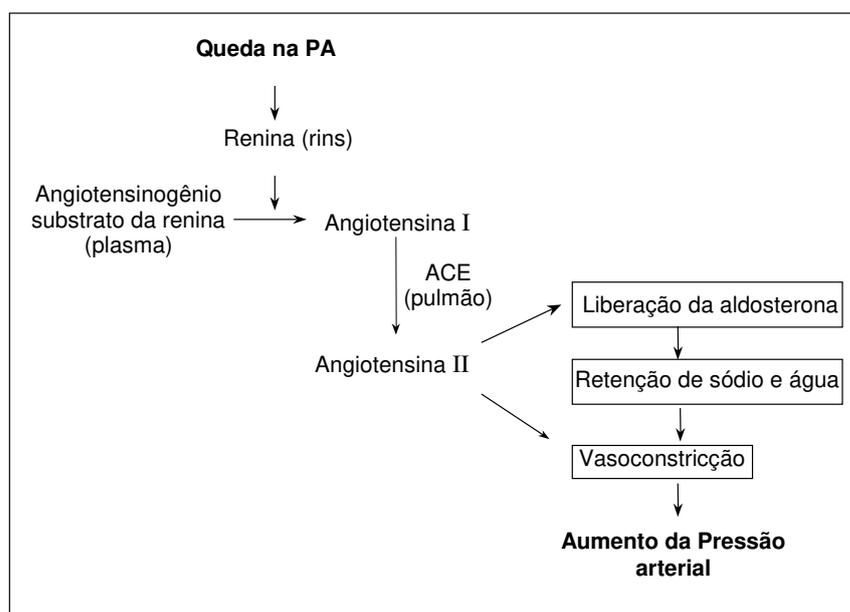
Acredita-se que a menor incidência das doenças coronárias nos países asiáticos seja devido ao elevado consumo de soja e derivados. O mecanismo de ação proposto por Kahlon e Woodruff (2002) inclui a redução da absorção do colesterol ou ácidos biliares e alteração no metabolismo hepático de colesterol e lipoproteínas por meio da complexação com proteínas da soja, durante a digestão. Esses autores também observaram o mesmo potencial hipocolesterolêmico na proteína do feijão preto.

### **2.2.2. Atividade anti-hipertensiva**

A pressão arterial (PA) é regulada por vários sistemas inter-relacionados. Os rins têm um papel essencial durante o controle a longo prazo da pressão, através do sistema rim-líquidos corporais, ou seja, quando o corpo tem líquido extracelular em excesso, a PA se eleva provocando um efeito direto sobre os rins que excretam líquido e sódio, fazendo com que a PA

volte ao normal. Ao passo que, se a pressão estiver abaixo do normal, haverá um aumento na reabsorção de sódio e na retenção de fluidos (GUYTON e HALL, 2001).

Os rins também controlam o sistema renina-angiotensina. A renina é uma enzima sintetizada e armazenada sob a forma inativa nas células justaglomerulares dos rins. Quando a PA cai, ocorre a liberação da renina para a corrente sanguínea, resultando em uma quebra de seu substrato natural, o angiotensinogênio, e a liberação da angiotensina I (decapeptídeo). Após a formação desse peptídeo, dois de seus aminoácidos são removidos para formar a angiotensina II. Essa reação é catalisada pela enzima conversora da angiotensina (ACE), presente no endotélio dos vasos pulmonares. A angiotensina II é um hormônio vasoconstrictor que contribui para o aumento da resistência periférica e também atua sobre as glândulas supra-renais estimulando a secreção de aldosterona que aumenta a reabsorção de sal e água pelos túbulos renais e excreção de potássio (GUYTON e HALL, 2001). O mecanismo de controle da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina está esquematizado na Figura 2.



**Figura 2:** Mecanismo vasoconstrictor renina-angiotensina para controle da pressão arterial.

O tratamento da hipertensão está baseado no emprego de medicamentos natriuréticos e vasodilatadores. Os natriuréticos reduzem a reabsorção renal de sódio e água pelo bloqueio do transporte ativo de sódio pelas membranas luminiais e basolaterais do epitélio tubular. Os

medicamentos vasodilatadores aumentam o fluxo sanguíneo renal, relaxando os músculos lisos dos vasos renais ou ainda bloqueando o sistema renina-angiotensina sobre a vasculatura renal (LIMA, 1999).

A importância clínica da ACE só foi reconhecida após a descoberta de que seus inibidores específicos podem ser drogas potenciais no combate à hipertensão. Uma variedade de peptídeos obtidos por hidrólise proteolítica manifesta a capacidade de inibir a ACE. Esta ação inibitória foi primeiramente descrita por Oshima em 1979 (*apud* BELEM E LEE, 1998) a partir de um hidrolisado de gelatina obtido pelo uso de uma colagenase bacteriana. Posteriormente, Maruyama e Suzuki (1982) testaram caseína intacta e seu hidrolisado trípico, sendo que apenas este último inibiu a ACE. Dando seqüência a estes estudos, Maruyama et al. (1985) submeteram os hidrolisados de caseína a uma digestão adicional com uma endopeptidase prolina-específica extraída do *Flavobacterium meningosepticum*, obtendo um heptapeptídeo bem mais potente.

Desde então, o interesse nesta área levou pesquisadores a buscarem peptídeos anti-hipertensivos a partir de proteínas diversas. Exemplificando de forma sucinta, a literatura mostra que inibidores eficientes da ACE têm sido isolados a partir dos hidrolisados de peixe (BYUN e KIM; 2001 FUJITA et al., 1995); soja (KINOSHITA et al., 1993; WU e DING 2002); proteínas do plasma (HYUN e SHIN, 2000); e principalmente a partir das proteínas do leite, onde a capacidade de inibir a ACE foi demonstrada a partir de produtos fermentados (HATA et al., 1996), maturação de queijos (ABUBAKAR et al., 1998; GÓMEZ-RUIZ et al., 2002; HAILESELAASSIE et al., 1999) e hidrólise enzimática das proteínas do soro (HERNÁNDEZ-LEDESMA, 2002; NURMINEN et al., 2000; SIPOLA et al., 2002b; VAN DER VEN et al., 2002).

O efeito dos peptídeos anti-hipertensivos tem sido demonstrado principalmente pela capacidade em inibir a ACE e pela redução da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SRH). A atividade da ACE pode ser expressa em percentual ou como valor IC<sub>50</sub>, que corresponde à quantidade de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%.

Roy; Watanabe e Tamai (2000) descreveram a purificação e caracterização de uma enzima sintetizada por *Saccharomyces cerevisiae* e seu emprego na obtenção de um hidrolisado

de proteínas do leite com atividade inibitória da ACE. O hidrolisado mais eficiente foi produzido após 3 horas de hidrólise, em pH 4,8, onde o IC<sub>50</sub> foi de 0,42mg/mL. Neste trabalho, a capacidade em inibir a ACE diminuiu com o aumento do tempo de hidrólise.

Fuglsang; Nilsson e Nyborg (2002) produziram leite fermentado, rico em peptídeos inibidores da ACE, a partir de duas cepas de *Lactobacillus helveticus*. Os valores IC<sub>50</sub> encontrados foram de 0,16 e 0,26mg/mL.

Hernández-Ledezma et al. (2002) obtiveram hidrolisados com atividade inibitória da ACE, a partir da β-Lg de soro de leite de ovino, pela ação das enzimas tripsina, α-quimotripsina, Proteinase K e Termolisina. O valor IC<sub>50</sub> dos hidrolisados foi determinado após 24 horas de hidrólise, e os melhores resultados foram obtidos pela hidrólise da β-Lg com as enzimas de origem microbiana, Proteinase K e Termolisina (IC<sub>50</sub> = 38mg/mL e 81 mg/mL, respectivamente). O IC<sub>50</sub> determinado para o hidrolisado pela tripsina, foi de 196mg/mL e para o hidrolisado pela α-quimotripsina, foi de 296mg/mL.

Para a utilização do hidrolisado ou peptídeo como alimento funcional, não é suficiente que este seja um potente inibidor da ACE. Para desempenhar o efeito anti-hipertensivo, o peptídeo precisa ser resistente à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal, ser absorvido e atingir a ACE que está localizada em diferentes tecidos, principalmente no plasma e no pulmão (MEISEL, 1998). Provavelmente, a dificuldade na absorção ou a hidrólise posterior desses peptídeos seja a razão de nem sempre haver correlação positiva entre a inibição da ACE e a redução da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Abubakar et al. (1998) demonstraram que a hidrólise do concentrado protéico de soro com Termolisina e Proteinase K resultou em potentes inibidores da ACE. No entanto, o hidrolisado produzido pela Actinase E que apresentou baixa atividade inibitória da ACE (55,7%), promoveu uma redução significativa na pressão arterial de ratos SHR até seis horas após a administração oral. Neste trabalho, o hidrolisado produzido pela Proteinase K foi o único que apresentou eficiência nos experimentos *in vivo* e *in vitro*.

Fujita et al. (1995) também não obtiveram uma boa correlação entre a inibição da ACE *in vitro* e a redução da pressão arterial de ratos SHR. A hidrólise de *Katsuobushi* (pescado desidratado, típico do Japão) pela ação da Termolisina e do sistema de proteases pepsina-tripsina-quimotripsina resultou em dois produtos com potente ação inibitória da ACE, com IC<sub>50</sub> de 29µg/mL e 41µg/mL, respectivamente. No entanto, apenas o hidrolisado pela Termolisina reduziu significativamente a pressão arterial de ratos SHR após a administração oral. A purificação deste hidrolisado, por sua vez, resultou em cinco peptídeos inibidores da ACE, embora nem todos induziram a redução da pressão arterial de ratos SHR. Quando houve resposta positiva, estes peptídeos manifestaram a máxima atividade anti-hipertensiva em períodos que variaram de 2 a 8 horas após a administração intravenosa (FUJITA; YOKOYAMA e YOSHIKAWA, 2000). Suetsuna e Nakano (2000) isolaram quatro tetrapeptídeos de proteína de pescado, todos eficientes na redução da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos. Destes quatro peptídeos, três apresentaram forte atividade inibitória da ACE.

No estudo apresentado por Nurminen et al. (2000), o tetrapeptídeo  $\alpha$ -lactorfina, derivado da  $\alpha$ -La, foi administrado por via subcutânea em ratos hipertensos e normotensos. A queda significativa da pressão arterial dos animais foi observada após a administração de 100mg/kg. Posteriormente, o mesmo grupo avaliou o efeito vascular da  $\alpha$ -lactorfina e da  $\beta$ -lactorfina (derivado da  $\beta$ -Lg). Os autores demonstraram que os tetrapeptídeos  $\alpha$ -lactorfina e  $\beta$ -lactorfina promoveram um aumento no relaxamento da artéria mesentérica isolada de ratos espontaneamente hipertensos, implicando em uma melhora na função arterial dos animais induzida pelos tetrapeptídeos (SIPOLA et al., 2002a).

A presença de peptídeos anti-hipertensivos tem sido demonstrada em leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* ou pela hidrólise da  $\alpha$ <sub>S1</sub> e  $\beta$ -caseína com protease purificada deste microrganismo (YAMAMOTO; AKINO e TAKANO, 1994a), onde estes autores conseguiram uma redução significativa na pressão sistólica dos animais, que durou até 10 horas após a administração oral.

Yamamoto; Akino e Takano (1994b) também pesquisaram o efeito anti-hipertensivo em diferentes tipos de leites fermentados sobre a pressão arterial de ratos SHR, 4 horas após a administração oral. No total, foram utilizadas 16 cepas de sete espécies de bactérias lácticas para

a obtenção dos fermentados. Os melhores resultados foram obtidos por cinco cepas do *L. helveticus*. Este lactobacilo apresentou atividade proteolítica superior aos demais, comprovada pela detecção de concentração mais elevada de peptídeos no meio, após a fermentação. Neste trabalho, a capacidade de inibição da ACE *in vitro* também foi analisada, havendo concordância com os resultados de redução da pressão arterial.

Nakamura et al. (1995) isolaram dois tripeptídeos anti-hipertensivos (Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro) no leite fermentado por *L. helveticus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Esses peptídeos apresentaram um efeito dose-dependente na pressão arterial de ratos SHR. Um efeito mais potente na pressão arterial desses animais, foi obtido após a administração oral do leite fermentado contendo o peptídeo Tyr-Pro, identificado a partir do leite fermentado por *L. helveticus* (YAMAMOTO; MAENO e TAKANO, 1999).

Sipola et al. (2002b) utilizaram o *L. helveticus* em um estudo para avaliar o efeito do leite fermentado no desenvolvimento da pressão arterial de ratos SHR, pois nesta linhagem, o estabelecimento da hipertensão ocorre por volta da décima segunda semana de idade. A administração do leite fermentado durante 14 semanas diminuiu a intensidade da pressão arterial definitiva nos animais, sendo o efeito detectado após seis semanas do início do tratamento. Ao final do experimento, a média da pressão arterial sistólica do grupo que recebeu leite fermentado foi de  $176 \pm 1$  mmHg, enquanto a média do grupo que recebeu água foi de  $197 \pm 1$  mmHg (SIPOLA et al., 2002b).

A utilização de ratos espontaneamente hipertensos como modelo para pesquisa da atividade anti-hipertensiva é válida pelas características semelhantes da hipertensão entre essa linhagem e o homem. Estes animais, além do desenvolvimento da hipertensão, podem desenvolver doenças cardiovasculares relacionadas a ela e sofrer influência genética e ambiental. Eles também são sensíveis ao sódio. Por outro lado, os animais apresentam menor proporção de peso corporal e estão mais susceptíveis à hipertrofia cardíaca do que o homem, mas em geral, constituem um excelente modelo em relação à hipertensão essencial humana (YAMAMORI, 1988).

Há poucos estudos sobre o efeito anti-hipertensivo de hidrolisados ou peptídeos em humanos. Após a fermentação do leite pasteurizado pelo *L. helveticus* e *Saccharomyces*

*cerevisiae*, Hata et al. (1996) detectaram a presença dos peptídeos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, de ação anti-hipertensiva comprovada em animais, nas concentrações de 1,5 mg/100g e 1,1mg/100g, respectivamente. Dose de 100mL do leite fermentado foi administrada diariamente aos pacientes hipertensos durante oito semanas. A pressão sistólica destes indivíduos foi reduzida significativamente a partir da quarta semana, o que não foi observado no grupo controle que ingeriu leite acidificado artificialmente.

Em um estudo piloto, o leite fermentado por *L. helveticus* foi enriquecido com os tripeptídeos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro. Este fermentado foi administrado a 17 indivíduos hipertensos que não tomavam medicação, sendo que 10 receberam uma dose de 150mL/dia do leite fermentado e 7 receberam leite fermentado comercial como controle. Durante oito semanas, a pressão arterial sistólica e diastólica dos indivíduos do grupo experimental diminuiu de forma mais acentuada do que no grupo controle. O teste de inibição da ACE, realizado com o leite fermentado por *L. helveticus*, apresentou resultado coerente com a redução da pressão arterial (SEPPO et al., 2002).

*Katsuobushi* hidrolisado pela Termolisina, com eficiência comprovada para redução da pressão arterial de ratos SHR (FUJITA et al., 1995), teve seu princípio ativo concentrado por ultrafiltração utilizando membrana com *cut off* de 3kDa. O IC<sub>50</sub> do hidrolisado bruto foi de 58,3µg/mL, após a ultrafiltração, a atividade inibitória da ACE aumentou, o IC<sub>50</sub> do permeado de 31,5µg/mL (FUJITA; YAMAGAMI e OHSIMA, 2001). Este produto foi administrado para 30 indivíduos hipertensos em uma dose de 1,5g ao dia. Em um período de cinco semanas, o grupo que recebeu o hidrolisado fracionado apresentou uma clara redução na pressão arterial sanguínea sistólica (-11,7±1,3mmHg) e diastólica (-6,9±1,0mmHg), quando comparada ao grupo placebo.

Todas estas evidências têm levado pesquisadores a sugerir o uso desses peptídeos como ingredientes funcionais de alimentos capazes de prevenir doenças crônicas relacionadas à dieta. Segundo Meisel (1998), é importante obter dados suficientes, baseados em estudos com modelo humano, animal e celular, para que a avaliação clínica das substâncias bioativas derivadas dos alimentos não seja superestimada. Além disso, pesquisar o efeito do tratamento em longo prazo e a ocorrência de efeitos colaterais é fundamental para avaliar a atividade anti-hipertensiva dos peptídeos.

## **2.3. Influência do Processamento na Produção de Peptídeos com Atividade Biológica**

Durante o processamento industrial, os alimentos protéicos estão susceptíveis a várias alterações em suas propriedades funcionais ou biológicas, sendo possível que ocorra a destruição ou desenvolvimento destas propriedades. De acordo com Korhonen et al. (1998), os tratamentos industriais comumente aplicados em fontes protéicas consistem no tratamento enzimático, térmico, extrusão termoplástica, e mais recentemente, na aplicação de alta pressão, principalmente no continente europeu.

O processamento enzimático consiste na hidrólise proteolítica *in vitro*. É geralmente empregado para a elaboração de formulações hipoalergênicas. A hidrólise também pode ser resultado da fermentação natural ou controlada pela adição de microrganismos, que durante seu crescimento hidrolisam açúcares e proteínas. Ela é utilizada na elaboração de iogurtes, bebidas lácteas e queijos. O processamento térmico é normalmente empregado durante a pasteurização, esterilização comercial e desidratação (KORHONEN et al., 1998). O papel da estrutura tridimensional das proteínas do soro de leite em sua atividade biológica tem atraído a atenção de diversos autores (TAKADA; AOE e KUMEGAWA; TAKADA et al., 1997 e FITZGERALD e MEISEL, 1999), pelo fato do inevitável tratamento térmico utilizado no processamento industrial afetar o estado nativo destas proteínas (LA FUENTE/ SNGH e HEMAR, 2002).

O impacto do tratamento enzimático e térmico na atividade biológica das proteínas será discutido em maiores detalhes nas próximas seções.

### **2.3.1. Influência do Processamento Enzimático**

As técnicas envolvendo modificações químicas das proteínas têm dado lugar aos métodos enzimáticos pelo fato das hidrólises ácida e alcalina serem totalmente inespecíficas e destruírem aminoácidos como o triptofano, o que compromete o valor nutricional da proteína. A catálise enzimática apresenta vantagens como o uso de condições brandas de processamento, a possibilidade de recuperação do catalisador e o emprego de enzimas com especificidade conhecida, resultando em produtos com maior solubilidade, estabilidade térmica e à precipitação. Por outro lado, uma série de variáveis deve ser controlada para se obter resultados desejáveis,

como a escolha da enzima, pH, temperatura, relação enzima/substrato e grau de hidrólise (ADLER-NISSEN, 1986).

A absorção de hidrolisados protéicos na forma de dipeptídeos e tripeptídeos é mais rápida e eficaz quando comparada à proteína intacta ou a aminoácidos livres, principalmente em situações de estresse, redução da área de absorção intestinal ou comprometimento das funções digestivas. Por isso, os hidrolisados protéicos desempenham um papel importante na formulação de dietas especiais, com a vantagem adicional da presença de peptídeos que contribuem para a redução da osmolaridade dessas dietas, comparado ao fornecimento de aminoácidos livres, minimizando os riscos de diarreia para os pacientes (CLEMENTE, 2000).

De acordo com Pihlanto-Leppälä (2001), a hidrólise e/ou fermentação de produtos lácteos é capaz de liberar peptídeos bioativos que podem estar presentes de um modo não intencional em formulações hipoalergênicas ou hidrolisados para uso funcional, que consistem basicamente de peptídeos presentes em formulações hipoalergênicas, iogurtes e bebidas lácteas fermentadas. *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus* são exemplos de bactérias que possuem proteases capazes de liberar peptídeos com seqüências de aminoácidos com atividade biológica (CHABANCE et al. 1998).

A formação de peptídeos com atividade biológica não depende apenas da fonte protéica; a enzima utilizada é um fator determinante, como pôde ser observado no experimento realizado por Mullally; Meisel e FitzGerald (1997). Os autores testaram a capacidade de inibição da ACE pela  $\beta$ -lactoglobulina intacta e hidrolisada e só detectaram inibição satisfatória após a hidrólise desta proteína com a tripsina. As outras enzimas testadas, corolase PP e elastase, resultaram em produtos com baixo índice de inibição.

Haileselassie; Lee e Gibbs (1999) detectaram o peptídeo opióide  $\beta$ -casomorfina no extrato solúvel de queijo modificado pela enzima Neutrase<sup>®</sup>. Entretanto, este peptídeo não foi detectado quando o queijo foi previamente modificado pela Neutrase<sup>®</sup> em combinação com uma enzima isolada de *Lactobacillus casei*, e nem com a combinação das enzimas Neutrase<sup>®</sup> e Debitrase<sup>™</sup>.

Microrganismos probióticos, como *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. foram empregados por Rihänem; Pihlanto-Leppälä e Pahkala

(2001) no desenvolvimento de queijo com baixo conteúdo lipídico e elevado potencial anti-hipertensivo. Durante o período de maturação do queijo, o perfil sensorial se manteve adequado. Houve um aumento da atividade ACE-inibitória que foi reduzida após 13 semanas de maturação, sugerindo a formação natural de peptídeos anti-hipertensivos que se mantêm no produto por período limitado.

Proteases do próprio alimento também podem liberar peptídeos durante o armazenamento. Este tipo de comportamento pode ser observado nos derivados do leite e ocorre pela presença de enzimas como a plasmina e lisozima. Meisel; Goepfert e Günther (1997) pesquisaram a presença de peptídeos anti-hipertensivos em diferentes derivados do leite. Estes autores observaram uma relação de proporcionalidade entre a capacidade de inibir a ACE *in vitro* e o grau de proteólise do produto, determinado pela concentração de pontes peptídicas livres. Portanto, peptídeos naturalmente presentes em produtos como queijo fresco e iogurte manifestaram baixa atividade inibitória da ACE. Essa atividade foi mais elevada com o desenvolvimento da proteólise observada no queijo Gouda meia-cura. Por outro lado, quando a maturação excedeu um certo nível, no caso do queijo Gouda curado, a atividade inibitória da ACE foi reduzida, indicando que houve a degradação dos fragmentos ativos. Gómes-Ruiz; Ramos e Recio (2002), obtiveram resultados semelhantes durante a maturação do queijo *Manchego*, um queijo popular da Espanha. O período de maturação que resultou na formação de peptídeos com melhor atividade inibitória da ACE foi de oito meses. Períodos entre quinze dias até quatro meses ou após doze meses de maturação implicaram na redução da capacidade de inibir a ACE.

Atualmente, para obter peptídeos inibidores da ACE há uma preferência pelo emprego de enzimas pancreáticas. A tripsina tem sido utilizada para a obtenção de vários peptídeos bioativos bem caracterizados quanto a sua atividade e composição aminoacídica e seqüenciamento (PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2001). A Alcalase é uma outra enzima que vem sendo bastante utilizada para a obtenção de potentes inibidores da ACE através de sua ação em diversas fontes protéicas, como leguminosas e pescado (BYUN e KIM, 2001; WU e DING, 2002; YUST et al., 2003).

Segundo Pihlanto-Leppälä (2001), a maior parte dos peptídeos inibidores da ACE apresentam baixo peso molecular, sendo possível concentrar as frações ativas pelo emprego da

ultrafiltração com membranas. Resultados preliminares obtidos por Mullally; Meisel e FitzGerald (1997) indicam que é possível enriquecer um hidrolisado com inibidores da ACE ao submetê-lo à ultrafiltração. O permeato do hidrolisado de concentrado protéico do soro obtido por membranas de 3kDa foram mais eficientes do que os obtidos com as membranas de 1kDa. Os índices de inibição da ACE dos permeatos foram de 98,3% e 87,3%, respectivamente.

De acordo com Van Der Ven et al. (2002), a ultrafiltração é um processo que pode ser dispensável, já que a atividade biológica de um determinado hidrolisado consiste na combinação de várias frações ativas, não necessariamente de mesma faixa de peso molecular. Segundo estes autores, os melhores resultados são obtidos pela otimização de condições do processo, como pH, enzima e grau de hidrólise.

### **2.3.2. Influência do Processamento Térmico**

A estrutura nativa protéica é resultante de um balanço de forças atrativas e repulsivas no interior da cadeia polipeptídica, entre os grupamentos externos e com as moléculas do solvente (RELKIN, 1996). Inevitavelmente, o tratamento térmico utilizado durante o processamento ou preservação do leite pode afetar a conformação e a estabilidade das proteínas do soro. Em princípio, a desnaturação térmica altera a estrutura protéica, de modo que resíduos de aminoácidos, que anteriormente estavam ocultos no interior da molécula, ficam expostos, permitindo a atuação mais rápida das proteases específicas e facilitando a digestão. Com o aumento da intensidade do tratamento térmico, o valor nutritivo das proteínas é afetado negativamente, como resultado de alterações indesejáveis como a desaminação, desfosforilação, destruição parcial de aminoácidos como a cisteína e reação de Maillard, perda da solubilidade, causada pela formação de agregados protéicos, e alteração das características sensoriais (KORHONEN, et al., 1998; VAN BOEKEL, 1999).

As proteínas do soro apresentam diferentes sensibilidades à desnaturação, em temperaturas superiores a 50°C. Após o tratamento térmico, o mecanismo e a intensidade da desnaturação irão depender de fatores como: concentração protéica, temperatura, tempo de exposição ao calor, pH e força iônica. As características da  $\beta$ -Lactoglobulina prevalecem durante a desnaturação, como o predomínio de pontes dissulfídicas na formação de agregados a 65°C e

pH próximo à neutralidade. Por outro lado, na desnaturação com temperaturas a partir de 90°C, há uma maior contribuição de interações não covalentes na formação dos agregados (LA FUENTE; SINGH e HEMAR, 2002).

O mecanismo que explica a agregação térmica entre a  $\alpha$ -lactalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina, se inicia com a dissociação do dímero nativo de  $\beta$ -lactoglobulina, que é alterado para uma conformação monomérica não nativa, contendo o grupo tiol acessível no resíduo cisteína 121. Estas moléculas podem formar dímeros não nativos, trímeros, pentâmeros e assim por diante, via formação de pontes dissulfeto, interações não covalentes e em menor extensão, oxidação dos grupos tiol. Ao mesmo tempo, esses agregados podem reagir com a  $\alpha$ -lactalbumina não nativa envolvendo as pontes dissulfídicas desta proteína (SAWYER et al., 2002).

Quando a  $\alpha$ -lactalbumina é aquecida isoladamente, não há grupo tiol disponível, o que faz com que esta proteína apresente uma menor susceptibilidade à agregação, quando comparada a  $\beta$ -lactoglobulina. A  $\alpha$ -lactalbumina é muito estável em temperaturas moderadas na ausência de uma fonte de grupos tiol livres. Uma outra característica desta proteína é que ela pode assumir o estado *molten globule*, nas condições de baixo pH, ausência de íons de cálcio em pH 7 e após o tratamento térmico. Este estado se caracteriza pela manifestação de uma estrutura menos rígida com manutenção da estrutura secundária e perda mais acentuada da estrutura terciária (HONG e CREAMER, 2002).

As alterações estruturais nas proteínas do soro podem afetar o perfil de peptídeos produzidos durante a digestão, já que as enzimas digestivas poderão hidrolisar seqüências expostas na estrutura protéica, que antes se encontravam em regiões inacessíveis. Por outro lado, a agregação e precipitação também podem dificultar a hidrólise. Em ambas situações, o resultado será um perfil diferenciado de hidrolisados quando comparado ao que seria obtido a partir da hidrólise resultante da proteína nativa (KORHONEN et al., 1998).

De acordo com Smithers et al. (1996) e Baruchel et al. (1998), a atividade biológica das proteínas do soro depende da intensidade do processamento e da manutenção da sua conformação nativa, forma na qual apresentam um maior potencial de funcionalidade fisiológica, pela composição de peptídeos que se formam durante a digestão no trato gastrointestinal.

Não há dados específicos que demonstrem a influência do tratamento térmico na obtenção de peptídeos bioativos. A bibliografia pesquisada mostra resultados bastante controversos quanto ao emprego do tratamento térmico e a obtenção de peptídeos bioativos. Os caseinofosfopeptídeos compõem um grupo bastante estável do ponto de vista enzimático, mas o tratamento térmico similar ao aplicado durante a esterilização induz a desfosforilação do resíduo fosfoseril, que provoca a formação da desidroalanina e conseqüente perda da atividade desses peptídeos (TIRELLI; DE NONI e RESMINI, 1997).

Por outro lado, alguns autores utilizam fontes protéicas não nativas, mas não caracterizam o grau de desnaturação, como no trabalho publicado por Takada, Aoe e Kumegawa (1996). Os autores analisaram o efeito de diversas concentrações da proteína do soro de leite com e sem tratamento térmico (75 a 90°C/10 min), na proliferação de osteoblastos M3T3-E1 pela incorporação de [<sup>3</sup>H]timidina e conteúdo de DNA celular. O estímulo da proliferação celular foi dose-dependente, mas não foi afetado pelo tratamento térmico. Esta atividade só foi reduzida quando a proteína do soro era hidrolisada pela pronase a 37°C durante uma hora.

Em trabalhos posteriores, Takada et al. (1997) alimentaram ratas ooforectomizadas, com dietas contendo frações da proteína do soro de leite com peso molecular abaixo de 24.500Da e tratadas termicamente, observando níveis de fosfatase alcalina sérica significativamente mais baixos que no grupo controle. Altos níveis desta enzima estão associados a uma maior pré-disposição para desenvolver a osteoporose. Segundo os mesmos autores, o tratamento térmico e a filtração em gel concentraram componentes ativos, havendo ainda a necessidade da determinação desses componentes e da sua estrutura.

Rokka et al. (1997) utilizaram como substrato para a obtenção de peptídeos bioativos o leite UHT, fermentado pelo *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* e hidrolisado pela pepsina e tripsina. Dois peptídeos relatados pela literatura como inibidores da ACE foram encontrados: Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg e Try-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg. Além disso, também foram identificados um hexapeptídeo imunoestimulante e um tripeptídeo anti-microbiano.

Wu e Ding (2002) analisaram a estabilidade da atividade inibitória da ACE pelo hidrolisado de soja com Alcalase. Neste estudo não foi observada alteração significativa da potência inibitória do hidrolisado quando este sofreu tratamento térmico de 40°C, 60°C, 80°C e 100°C, ou quando este hidrolisado foi submetido a diversas condições de pH, entre 2 e 10. Esses autores não determinaram o grau de desnaturação da proteína, nem realizaram estudos comprobatórios da atividade biológica *in vivo*.

A maioria dos experimentos que têm como objetivo a obtenção de peptídeos com atividade biológica não especificam o tipo de tratamento sofrido pelas proteínas antes da hidrólise, ou não tem como objetivo avaliar a influência do tratamento térmico. Para que seja viável a produção de alimentos funcionais contendo peptídeos anti-hipertensivos, ou com outras atividades biológicas, é necessário haver uma correlação dos tratamentos térmicos e enzimáticos que produzam os melhores resultados, minimizando o risco da superestimação da atividade dos componentes em estudo.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material

Para a realização deste trabalho utilizou-se como matéria-prima o isolado protéico de soro de leite comercial BiPro (lote: JF 330-1-4-20) fornecido pela Davisco™, obtido a partir de soro doce por processo de troca iônica. O isolado foi armazenado em frascos vedados contendo cerca de 400g, em freezer. O hidrolisado comercial Biozate 1 (lote: LE 001-1-919) foi produzido a partir do isolado BiPro, fornecido pela Davisco™.

As enzimas utilizadas para hidrolisar o isolado foram: a endoproteinase Alcalase, produzida por *Bacillus licheniformis* tipo 0.6L, com atividade declarada de 0,6 unidades Anson/g (Novo Nordisk, lote: 00077),  $\alpha$ -quimotripsina de pâncreas bovino, com atividade declarada de 1  $\mu$ mol de BTEE/minuto (Sigma, cód. C4129, lote: 78H7026) e Proteomix 2400, composta por tripsina e  $\alpha$ -quimotripsina (Biobrás, lote: MPL - 0151).

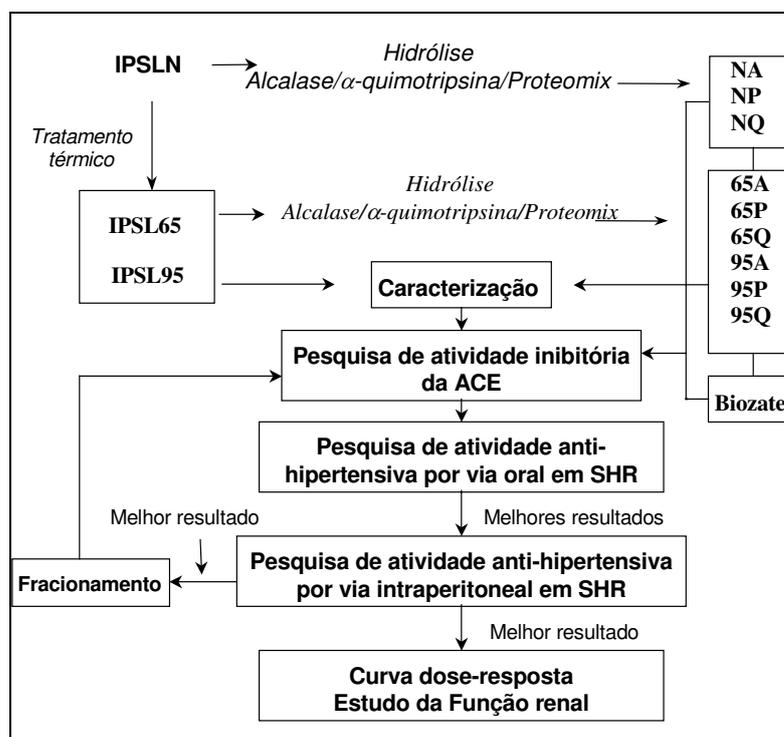
Para as análises de determinação da atividade anti-hipertensiva foram utilizados: a enzima conversora da angiotensina (ACE), extrato cetônico de pulmão de coelho (Sigma, cód. A6776, Lote: 71K510), substrato sintético da ACE, hipuril-histidil-leucina (Sigma, cód. H1635, Lote: 50K0839), ácido hipúrico (Sigma, cód. H6375, Lote: 30K3472), captopril (EMS® – Linha Genérica, Lote: 023283). Os demais reagentes foram de grau analítico ou cromatográfico.

#### 3.2. Métodos

##### 3.2.1. Planejamento geral do experimento

A Figura 3 apresenta o esquema geral dos experimentos realizados no presente estudo, onde o IPSL foi submetido a dois tratamentos térmicos de 65°C e 95°C, durante 15 minutos, tendo como resultado dois isolados de graus de desnaturação distintos. Cada isolado obtido, inclusive o não tratado, foi submetido a hidrólise enzimática com as enzimas Alcalase,  $\alpha$ -quimotripsina e Proteomix. Após a caracterização, os hidrolisados resultantes foram analisados quanto a capacidade inibitória da ACE e atividade anti-hipertensiva em ratos espontaneamente hipertensos por via oral. Os hidrolisados que apresentaram as melhores atividades *in vitro* e *in vivo*, após administração oral foram novamente administrados aos animais por via intraperitoneal.

O hidrolisado de melhor atividade foi avaliado quanto a sua influência na função renal dos animais. Este hidrolisado foi separado por ultrafiltração em membrana de 3kDa e de 30kDa. A capacidade inibitória da ACE de cada um dos permeados foi pesquisada.



**Figura 3:** Fluxograma dos experimentos desde a desnaturação dos isolados até a obtenção dos hidrolisados e aplicação destes em testes de atividade biológica.

### 3.2.2. Obtenção de isolados com diferentes graus de desnaturação

Para obtenção de isolados com diferentes graus e desnaturação o IPSL foi submetido a dois tratamentos térmicos. Dispersões com 10% de proteína (p/v), em água destilada, foram acondicionadas em frascos vedados e aquecidas em banho-maria sob agitação, a 65°C ou 95°C durante 15 minutos. Após o tratamento térmico, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e liofilizadas. Os isolados foram codificados como:

- IPSLN – isolado protéico de soro de leite que não recebeu tratamento térmico;
- IPSL65 – isolado protéico de soro de leite tratado a 65°C;
- IPSL95 – isolado protéico de soro de leite tratado a 95°C.

A definição das condições de tratamento foram estabelecidas através das seguintes etapas:

- (1) O IPSL comercial foi caracterizado quanto ao seu perfil de solubilidade protéica em pH variando de 3 a 9, de acordo com o método de Morr et al. (1985). Em seguida, foi submetido a oito tratamentos térmicos com temperaturas variando entre 60°C e 95°C. Para isso, o isolado foi solubilizado em água destilada a 10% (p/v), acondicionado em frascos vedados e aquecido em banho-maria sob agitação por 15 minutos.
- (2) Após o tratamento, as amostras foram caracterizadas quanto à solubilidade em pH 4,6 (MORR et al., 1985) e teor de grupos sulfidríla livres (SH) (BEVERIDE; JONES e TUNG, 1984).
- (3) A escolha das temperaturas de tratamento térmico foi realizada em função das características das amostras obtidas (redução da solubilidade e concentração de grupos sulfidríla em função do tratamento térmico).

### **3.2.3. Caracterização dos isolados protéicos de soro de leite**

#### **3.2.3.1. Composição centesimal**

O nitrogênio protéico total, o teor de umidade, o resíduo mineral fixo e os lípidos foram determinados de acordo com os métodos descritos pela A.O.A.C. (1990). Para o cálculo da proteína bruta foi utilizado o fator 6,25.

A lactose foi determinada pela metodologia descrita por Acton (1977), que se fundamenta na reação do extrato aquoso da amostra com fenol e ácido sulfúrico, sendo o extrato previamente filtrado e clarificado com hidróxido de sódio e sulfato de zinco. A absorbância foi medida a 490nm e o conteúdo de lactose estimado através de uma curva padrão com lactose monohidratada (0-100µg de lactose). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **3.2.3.2. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura**

A análise térmica foi realizada para os isolados IPSLN, IPSL65 e IPSL95. As amostras foram suspensas em água desionizada (20%, p/v) e colocadas em cápsulas de alumínio

hermeticamente fechadas. O aquecimento foi conduzido de 25°C a 100°C a uma taxa de 10°C/min. Uma cápsula vazia foi utilizada como referência.

A temperatura de desnaturação ( $T_d$ ) foi determinada pelo pico do termograma e a entalpia de desnaturação ( $\Delta H$ ) foi medida utilizando o programa computacional Differential Scanning Calorimeter (DSC 2010) TA Instruments. Após a corrida, as cápsulas foram perfuradas e colocadas em estufa a 105°C para secagem e determinação da massa de proteína em base seca (ERDOGDU; CZUCHAJOWSKA e POMERANZ, 1995).

### **3.2.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)**

Os perfis cromatográficos dos isolados (IPSLN, IPSL65 e IPSL95) foram determinados por CLAE-FR utilizando-se uma coluna C18 (25 x 4,6mm, 5 $\mu$ m), equilibrada com 70% do solvente A (ácido trifluoroacético 0,1% - TFA em água, v/v) e 30% do solvente B (acetonitrila/TFA 0,1%, 60:40, v/v). As amostras foram eluídas com gradiente linear até 80% do solvente B por 35 minutos. Após 10 minutos de limpeza com 100% do solvente B, a coluna foi reequilibrada às condições iniciais durante 5 minutos.

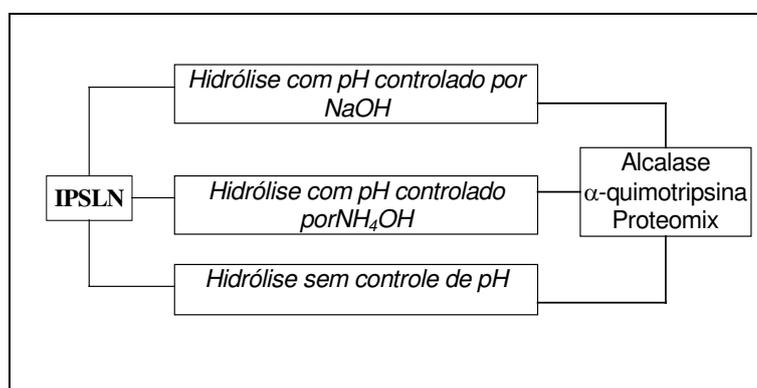
Padrões de  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina foram injetados para identificação destas proteínas.

As corridas foram conduzidas à temperatura ambiente em cromatógrafo Varian, com fluxo de 1mL/min e a absorbância monitorada a 280nm. O volume de injeção foi de 20 $\mu$ L e a concentração de amostra foi de 0,25% de proteína. Todas as amostras foram previamente centrifugadas a 10.000g por 10min, sendo que antes da aplicação as amostras foram filtradas em membranas de acetato celulose 22 $\mu$ m (SMYTH e FITZGERALD, 1998).

### **3.2.4. Reação de hidrólise**

As enzimas utilizadas foram Alcalase,  $\alpha$ -quimotripsina e Proteomix. As condições de temperatura e pH para cada enzima foram pH 7,0/60°C, pH 8,0/40°C e pH 7,0/40°C, respectivamente. A concentração do substrato foi de 10% e a relação enzima/substrato 0,01 (p/v para as enzimas:  $\alpha$ -quimotripsina e Proteomix e v/v para a Alcalase) A reação foi conduzida em

reator encamisado e interrompida após 2 horas por inativação térmica da enzima a 90°C durante 5 minutos. O fluxograma de produção dos hidrolisados está apresentado na Figura 4.



**Figura 4:** Ajuste das condições de controle de pH durante a hidrólise do IPSLN pela ação das enzimas Alacalse, α-quimotripsina e Proteomix.

Tendo em vista o ajuste da reação de hidrólise para obtenção de hidrolisados com características adequadas aos testes de atividade anti hipertensiva *in vitro* e *in vivo*, realizou-se experimentos de avaliação das metodologias de monitoramento do grau de hidrólise (GH).

O monitoramento da hidrólise do isolado foi realizado de três formas:

- (1) Pelo método do pH-stat, com o pH mantido constante pela titulação de hidróxido de sódio 1N (NaOH);
- (2) Pelo método do pH-stat, com o pH mantido constante pela titulação de hidróxido de amônio 1N (NH<sub>4</sub>OH); e
- (3) Reação sem controle de pH, com grau de hidrólise determinado pelo método TNBS.

O método do pH-stat (ADLER-NISSEN, 1986) tem como princípio a titulação de uma base para manutenção do pH constante durante a quebra das pontes peptídicas.

O grau de hidrólise das reações com controle de pH foi estimado pelo método do pH-stat de acordo com o consumo de base, calculado pela seguinte expressão:

$$GH = \frac{V_b N_b}{M_p \cdot \alpha \cdot h_{tot}}, \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

$V_b$  = volume de base consumido para manter o pH constante (mL);

$N_b$  = normalidade da base;

$M_p$  = massa de proteína (g);

$h_{tot}$  = número equivalente de pontes peptídicas por unidade de massa protéica ( $h_{tot} = 8,8\text{meq/g}$ , para as proteínas do soro de leite);

$\alpha$  = grau de dissociação dos grupamentos aminos, que varia em função da temperatura e pH (ADLER-NISSEN, 1986).

Quando a hidrólise foi realizada sem controle de pH, alíquotas foram retiradas periodicamente para a análise do grau de hidrólise pelo método do TNBS (ADLER-NISSEN, 1979). Este método fundamenta-se na reação colorimétrica do ácido trinitrobenzenosulfônico com os grupos  $\alpha$ -amino terminais das proteínas e peptídeos formados durante a reação de hidrólise. Como o TNBS também reage com o grupamento  $\epsilon$ -amino da lisina, o grau de hidrólise pode ser superestimado. Desta forma, para calcular o grau de hidrólise dos hidrolisados o valor foi corrigido pela subtração do valor de grau de hidrólise obtido para o isolado intacto.

O grau de hidrólise (GH) pelo método do TNBS foi calculado utilizando a seguinte expressão:

$$GH = \frac{mMolLeu}{h_{tot}} \times 100, \quad (\text{Eq. 2})$$

onde:

$mMolLeu$  = grupamentos amínicos livres, calculados a partir da curva padrão de leucina;

$h_{tot}$  = número de equivalente de pontes peptídicas por unidade de massa protéica, cujo valor é de 8,8mM/g de proteína, para as proteínas do leite em geral.

Para possibilitar a comparação do grau de hidrólise final dos produtos, todos os hidrolisados obtidos foram analisados pelo método do TNBS.

### 3.2.5. Produção dos hidrolisados

Os hidrolisados foram obtidos a partir dos isolados IPSLN, IPSL65 e IPSL95, com as enzimas Alcalase, Proteomix e  $\alpha$ -quimotripsina, nas condições de pH e temperatura descritas anteriormente. Durante a reação de hidrólise, o pH foi mantido constante pela titulação

automática de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , utilizando-se um titulador automático (Mettler-Toledo, modelo DL50), até a obtenção de 10% de grau de hidrólise, controlado pelo método do pH-stat. A reação foi interrompida por inativação térmica a  $90^\circ\text{C}$  por 5 minutos, e em seguida os hidrolisados foram resfriados, congelados e liofilizados.

Os hidrolisados obtidos foram identificados da seguinte maneira:

- Hidrolisados produzidos a partir do IPSLN, IPSL65 e IPSL95, pela ação da Alcalase: NA, 65A e 95A;
- Hidrolisados produzidos a partir do IPSLN, IPSL65 e IPSL95, pela ação da  $\alpha$ -quimotripsina: NQ, 65Q e 95Q;
- Hidrolisados produzidos a partir do IPSLN, IPSL65 e IPSL95, pela ação da Proteomix: NP, 65P e 95P.

### **3.2.6. Caracterização dos hidrolisados**

#### **3.2.6.1. Composição centesimal dos hidrolisados**

A composição centesimal dos hidrolisados foi determinada conforme descrito na Seção 3.2.2.1 para o IPSLN.

#### **3.2.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A determinação do perfil eletroforético dos hidrolisados foi realizada utilizando gel de poliacrilamida (PhastGel<sup>®</sup> *high density*, cód.17-0516-01) em aparelho PhastSystem, Amersham Pharmacia Biotech. Amostras diluídas (0,5% de proteína) em tampão redutor (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, SDS 10%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%) foram aquecidas a  $95^\circ\text{C}$  por 5 minutos. Alíquotas de  $5\mu\text{L}$  foram aplicadas no gel. Após a corrida, os géis foram mantidos em solução de Coomassie R-250 0,2%, durante 3 horas, e descorados em solução de metanol 30% e ácido acético 10%.

O peso molecular das bandas foi determinado por comparação com padrão de peso molecular entre 2,5 a 16kDa (Pharmacia, cód. 80-1129-83). A densitometria dos géis foi feita em densitômetro Sharp JX 330, pelo programa Image Master (Pharmacia).

### **3.2.6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)**

As condições de corrida para a obtenção do perfil cromatográfico dos hidrolisados foram determinadas conforme descrito na Seção 3.2.2.3.

Baseando-se na classificação feita por Legay et al. (1997), os cromatogramas dos hidrolisados foram divididos em 3 zonas, onde os peptídeos foram classificados como: (I) baixa hidrofobicidade, os que eluíram até 5 minutos, com um gradiente da solução B entre 30% e 35%; (II) hidrofobicidade média, os que eluíram entre 5 e 10 minutos, com gradiente da solução B entre 35% e 40% e (III) hidrofobicidade alta, os que eluíram a partir de 10 minutos, com gradiente da solução B acima de 40%.

### **3.2.6.4. Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)**

Os perfis de tamanho molecular dos hidrolisados foram determinados por CLAE-EM em coluna de exclusão SecSteel-3000 (300x7,75mm). Os hidrolisados foram diluídos de modo a obter 0,2% de proteína em tampão fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  0,05M, NaCl 0,15M e  $\text{NaN}_2$  0,02%, pH 7). O mesmo tampão foi utilizado como fase móvel em fluxo de 1mL/min, sendo a absorbância monitorada a 280nm (VAN CAMP et al., 1997).

A distribuição de tamanho molecular foi calculada tendo como base a curva construída com o logaritmo do peso molecular do padrão de peso molecular contendo os seguintes marcadores: tiroglobulina bovina (670kDa), gama globulina bovina (158kDa), ovalbumina (44kDa); mioglobina (17kDa) e Vitamina B<sub>12</sub> (1,35kDa).

### **3.2.7. Atividade anti-hipertensiva *in vitro***

Cada unidade da enzima conversora da angiotensina (ACE) é capaz de produzir 1,0 $\mu$ M/min de ácido hipúrico (AH), a partir do substrato hippuril-L-histidil-L-leucina (HHL), na presença de 100mM de tampão biológico e 300mM de cloreto de sódio a 37°C em pH 8,3.

Para escolher o método de determinação da atividade da ACE, comparou-se o método descrito por Cushman e Cheung (1971) com o método proposto por Shihabi (1999), com algumas modificações descritas a seguir.

### **3.2.7.1. Determinação da atividade da ACE pelo método descrito por Shihabi (1999) por eletroforese capilar**

Para determinar a concentração adequada de enzima a ser utilizada nas análises subsequente, a hidrólise do HHL pela ACE foi realizada com concentrações da enzima variando entre 2,5mU até 20mU, em tampão borato de potássio 100mM, cloreto de sódio 300mM e pH 8,3 a 37°C. A reação foi iniciada pela adição do HHL 3,8mM à solução da enzima, de modo que o volume final foi de 250µL. Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 200µL de acetonitrila. Após homogeneização e filtração, a mistura foi analisada por eletroforese capilar em aparelho HP-3DCE. Para a comparação entre os métodos e análises subsequentes, utilizou-se a concentração de 4mU da ACE.

As amostras foram injetadas de modo hidrodinâmico com pressão de 50mBar em capilar de sílica fundida com 60cm de comprimento total, 52cm de comprimento efetivo e 75µm de diâmetro interno. Como fase móvel, utilizou-se tampão borato de potássio 50mM, pH 9,3 e fluxo de corrente do cátodo para o ânodo. A tensão de corrida foi mantida a 10kV por 30 minutos. Os analitos foram detectados a 228nm com detector de arranjo de diodos (DAD) e as áreas dos picos foram integradas pelo software HP-3DCE.

Entre cada análise, o capilar foi lavado com solução de hidróxido de sódio 1N e água, e em seguida recondicionado com o tampão de corrida.

Concentrações variadas de ácido hipúrico (AH) foram diluídas em tampão borato e injetadas em aparelho de eletroforese capilar para confirmação do espectro de absorção no UV e construção da curva padrão. O substrato, numa concentração de 3,8mM, também foi injetado para a confirmação de seu espectro de absorção no UV.

### **3.2.7.2. Determinação da atividade da ACE pelo método descrito por Cushman e Cheung (1971) utilizando espectrofotômetro**

A reação entre a ACE e o HHL foi conduzida de acordo com as condições descritas na Seção 3.2.5.1., sendo que ao final dos 30 minutos adicionou-se 250µL de HCl 1N para interromper a reação. O AH formado foi extraído com 1,5mL de acetato de etila através de vigorosa agitação durante 30 segundos. Após uma breve centrifugação (15.000g/10seg), alíquotas de 1mL da fase acetato de etila foram transferidas para um outro frasco, o solvente foi evaporado

e o ácido hipúrico foi recuperado em 1 mL de água ultra-pura. A determinação do AH foi feita por eletroforese capilar e pela leitura em espectrofotômetro a 228nm.

### **3.2.7.3. Determinação da atividade inibitória ACE dos hidrolisados por eletroforese capilar**

Como o método de Shihabi (1999) mostrou-se mais adequado para detectar o AH formado na reação, a capacidade inibitória da ACE dos hidrolisados foi determinada por este método. A determinação do valor  $IC_{50}$  de cada hidrolisado foi feita pela da incubação do volume de 50 $\mu$ L do hidrolisado, em várias concentrações, com 100 $\mu$ L da ACE. A ACE, o HHL e os hidrolisados foram diluídos em tampão borato de potássio 100mM e cloreto de sódio 300mM, pH 8,3, de modo que a concentração final da ACE fosse de 4mU e do HHL 3,8mM. Para iniciar a reação, foram adicionados 100 $\mu$ L de HHL, após 30 minutos, a enzima foi inativada pela adição de 200 $\mu$ L de acetonitrila. Após filtração em membrana de acetato celulose, a mistura foi analisada por eletroforese capilar de acordo com as condições descritas na Seção 3.2.6.1.

O valor  $IC_{50}$  para cada hidrolisado foi determinado por análise de regressão do logaritmo da concentração do ácido hipúrico liberado na reação (área integrada no eletroforegrama) em função da concentração de hidrolisado incubado na reação (mg/mL).

### **3.2.8. Atividade anti-hipertensiva *in vivo***

Ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) com 14 semanas de vida e pesando 267 $\pm$ 13g foram mantidos em gaiolas coletivas contendo até quatro animais (Figura 5a), em ambiente climatizado (Figura 5b) com temperatura de 24 $\pm$ 1°C, 60 $\pm$ 5% de umidade relativa, e controle automático do ciclo claro/escuro a cada 12horas. A dieta comercial e água foram fornecidas *ad libitum*. Estes animais foram provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB/UNICAMP).



(a)



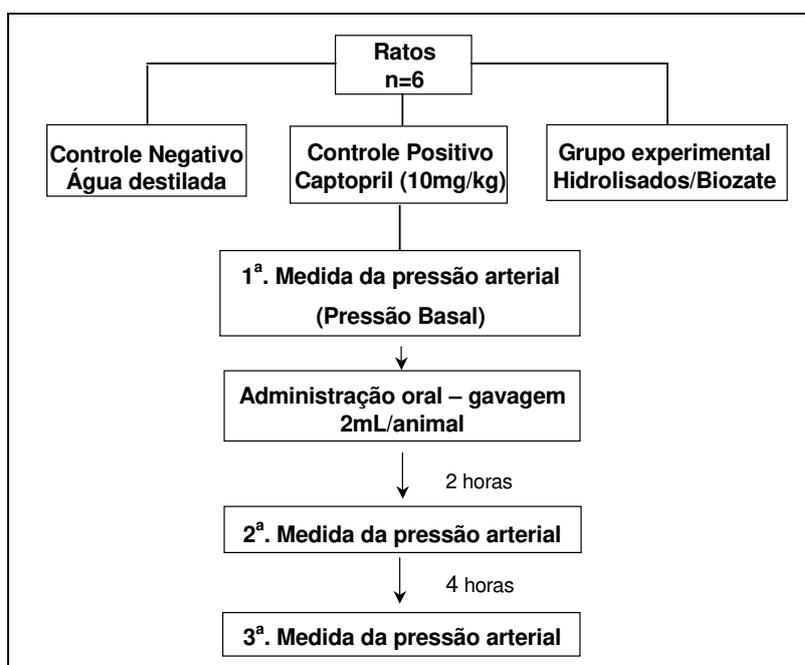
(b)

**Figura 5:** Animais experimentais e acondicionamento. (a) Ratos espontaneamente hipertensos (SHR – *spontaneously hypertensive rats*). (b) Acondicionamento dos animais.

Inicialmente, os animais foram divididos ao acaso em três grupos de seis animais cada (n=6). Ao primeiro grupo (grupo experimental) foram administrados 2mL da solução de hidrolisado (0,5g/kg de peso corporal), enquanto o segundo grupo recebeu água (grupo controle) e o terceiro grupo recebeu captopril (10mg/kg de peso corporal), agente anti-hipertensivo, inibidor competitivo da ACE, cuja ação fisiológica resulta da supressão do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A forma de administração foi por gavagem. Os grupos foram revezados

aleatoriamente, com um período de descanso de uma semana entre os testes, até que todos os hidrolisados obtidos e o produto comercial Biozate fossem administrados, o esquema do experimento está apresentado na Figura 6. A pressão arterial média (PA) foi medida em três intervalos de tempo:

- (1) antes da administração dos produtos (pressão basal);
- (2) 2 horas após a gavagem e
- (3) 4 horas após a gavagem.



**Figura 6:** Fluxograma dos experimentos de determinação da pressão arterial dos animais após administração dos hidrolisados por via oral.

Os hidrolisados obtidos a partir de cada tratamento enzimático que apresentaram os melhores resultados nas análises *in vitro* foram administrados aos animais por via intraperitoneal. Neste caso, foram formados grupos contendo oito animais ( $n = 8$ ). Captopril e solução salina isotônica foram utilizados como controle. A medida da pressão arterial média foi feita antes da administração, 2, 4 e 6 horas depois.

O protocolo para o ensaio experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo n. 445-1).

### 3.2.8.1. Medida da pressão arterial caudal (PA)

Para medir a PA, foi empregado o método indireto através de pletismografia de cauda utilizando-se eletroesfigmomanômetro e transdutor de som tipo Korotkoff (Narco Biosystems Inc. Austin Tx), como descrito por Lovenberg (1987).

Antes de proceder a medida da pressão arterial, os animais foram mantidos em caixa aquecida a 40°C durante 5min (LOVENBERG, 1987). Em seguida os animais foram imobilizados sobre uma placa de superfície aquecida a 37°C, permitindo três medidas consecutivas da pressão arterial caudal através de pletismografia e a amplificação dos ruídos de Korotkoff por um transdutor fixado sobre a artéria caudal posterior, como mostra a Figura 7.



**Figura 7:** Aparelho para determinação da Pressão Arterial em ratos SHR.

### 3.2.8.2. Estudo da função renal

Com o objetivo de confirmar a atividade biológica do hidrolisado que apresentou resultados mais satisfatórios, foi feita uma curva dose-resposta de redução da pressão arterial dos ratos SHR em função da concentração do hidrolisado. As doses mais eficientes foram empregadas para avaliar a influência deste hidrolisado na função renal dos animais.

Os métodos utilizados para verificar a influência do hidrolisado na fisiologia renal foram: o da medida de depuração plasmática de creatinina endógena (*clearance* de creatinina), para estimar a taxa de filtração glomerular, e o *clearance* de lítio para estimar a manipulação tubular proximal de sódio nos animais. Os animais receberam cloreto de lítio na dose de 0,06mEq/100g de peso corporal, por via intraperitoneal, 12 horas antes do início dos experimentos.

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de cinco indivíduos (n=5) da seguinte forma, grupo controle: solução salina; grupo captopril: 10mg/kg de captopril; e grupo experimental: 0,5g/kg ou 1,0g/kg de hidrolisado por via intraperitoneal. Durante o experimento, cada animal foi colocado em gaiola metabólica individual, sem restrição de movimentos.

A filtração glomerular e a manipulação renal de sódio foram estimadas durante 120 minutos. Doze a quatorze horas antes dos testes funcionais, aos animais foi administrado 0,06M de cloreto de lítio por gavagem deixando-os em jejum pra ração sólida, mas com livre acesso à água. Após este período, os animais foram submetidos a uma primeira gavagem para administração de água em um volume correspondente a 5% do peso corporal, seguida de uma nova administração de igual volume 60 minutos depois. As amostras de sangue foram coletadas via vasos da cauda, sob anestesia com éter etílico ou por punção cardíaca na ocasião do sacrifício.

#### ***Dosagem de lítio, sódio, potássio e creatinina***

As concentrações plasmáticas e urinárias de lítio, sódio e potássio foram determinadas por fotometria de chama e os resultados expressos em mEq/L. As concentrações de creatinina foram determinadas espectrofotometricamente pela técnica do picrato alcalino (XAVIER; MAGALHÃES e GONTIJO, 2000).

#### ***Cálculo das variáveis para o estudo da função renal***

Após a determinação das concentrações dos eletrólitos e creatinina, as seguintes variáveis foram calculadas:

#### **Volume minuto urinário: V'**

O volume urinário dos animais, coletado em duas horas, foi expresso em  $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$  de peso corporal.

### Filtração glomerular: FG ou Ccr

A medição foi realizada pelo *clearance* de creatinina, calculado segundo a fórmula:

$$C_{Cr} = \frac{U_{Cr} \times V'}{P_{Cr}}, \quad (\text{Eq. 3})$$

onde:

$U_{Cr}$  = concentração de creatinina na urina em mg/dl;

$P_{Cr}$  = concentração de creatinina no plasma em mg/dl;

$V'$  = volume urinário em  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

### Fração da excreção de sódio: $FE_{Na}$

A fração de excreção de sódio foi calculada segundo a fórmula:

$$FE_{Na} = \frac{U_{Na} \times V'}{P_{Na} \times C_{Cr}} \times 100, \quad (\text{Eq. 4})$$

onde:

$U_{Na}$  = concentração de sódio na urina em mEq/L;

$V'$  = volume urinário em  $\mu\text{L}/\text{min}$ ;

$P_{Na}$  = concentração de sódio no plasma em mEq/L;

$C_{Cr}$  = *clearance* de creatinina.

### Fração da excreção proximal de sódio: $FEP_{Na}$

A fração de excreção proximal de sódio foi calculada pela fórmula,

$$FEP_{Na} = \frac{C_{Li}}{C_{Cr}} \times 100, \quad (\text{Eq. 5})$$

onde:

$C_{Li}$  = *clearance* de lítio em  $\mu\text{L}/\text{min}$ ;

$C_{Cr}$  = *clearance* de creatinina.

### Fração da excreção pós-proximal de sódio: $FEPP_{Na}$

A fração de excreção pós-proximal de sódio foi calculada pela fórmula,

$$FEPP_{Na} = \frac{C_{Na}}{C_{Li}} \times 100, \quad (\text{Eq. 6})$$

onde:

$C_{Na}$  = clearance de sódio em  $\mu\text{L}/\text{min}$ ;

$C_{Li}$  = clearance de lítio em  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

### **Fração da excreção de potássio: $FE_K$**

A fração de excreção de potássio foi calculada segundo a fórmula:

$$FE_K = \frac{U_K \times V'}{P_K \times C_{Cr}} \times 100, \quad (\text{Eq. 7})$$

onde:

$U_K$  = concentração de potássio no filtrado glomerular em  $\text{mEq}/\text{L}$ ;

$V'$  = volume urinário em  $\mu\text{L}/\text{min}$ ;

$P_K$  = concentração de potássio no plasma em  $\text{mEq}/\text{L}$ ;

$C_{Cr}$  = clearance de creatinina.

### **3.2.8.3. Fracionamento dos hidrolisados**

O hidrolisado que apresentou a melhor eficiência nas análises de atividade biológica foi diluído em água ultrapura e separado em duas frações através de dispositivos de ultrafiltração centrífuga, Centriprep (Millipore), contendo membrana de *cut off* de 30kDa e de 3kDa.

As duas frações foram novamente submetidas ao teste de atividade anti-hipertensiva *in vitro*, como descrito na Seção 3.2.5.3.

### **3.2.9. Análise estatística**

Os resultados das análises físico-químicas e cromatográficas foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e dos experimentos biológicos como média  $\pm$  erro padrão. As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste T com o programa Statistica for Windows (1995) no intervalo de confiança de 95%.

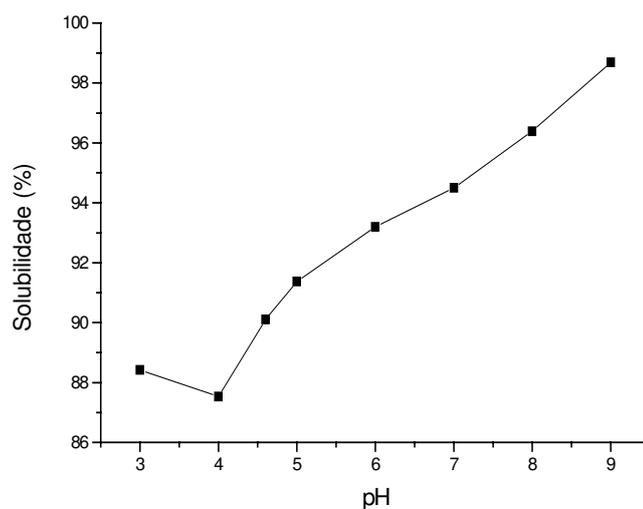
## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Obtenção e caracterização do IPSL com diferentes graus de desnaturação

As proteínas do soro de leite são bastante susceptíveis ao tratamento térmico. A partir de 65°C começam a ocorrer modificações estruturais que culminam com a desnaturação da estrutura protéica e conseqüentemente a formação de agregados protéicos que resultam na perda de solubilidade (HONG e CREAMER, 2002).

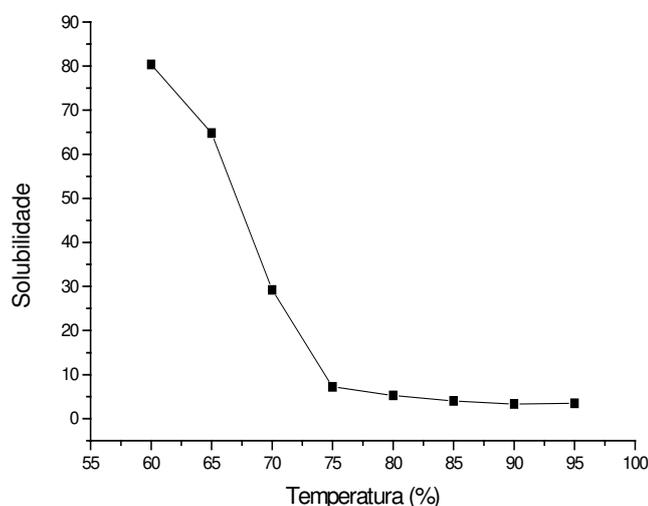
Uma das propriedades mais importantes das proteínas do soro em seu estado nativo é a elevada solubilidade em uma ampla faixa de pH inclusive na região de seu ponto isoelétrico que varia em torno de 4 a 5 (MORR e HA, 1993). Alguns autores utilizam a solubilidade em pH 4,6 como um indicador da desnaturação protéica, sendo 90% de solubilidade o padrão para isolados com altos teores de proteína nativa neste pH (LAW e LEAVER, 1999; LI-CHAN, 1983).

A Figura 8 mostra o perfil de solubilidade do IPSL utilizado como matéria-prima no presente trabalho. Observa-se a alta solubilidade protéica no intervalo de pH entre 3 e 9. No pH 4,6 a solubilidade protéica foi de  $90,1 \pm 0,7\%$ , o que indica que o estado nativo das proteínas do IPSL está bastante preservado.



**Figura 8:** Solubilidade das proteínas do IPSL nativo em função do pH.

A Figura 9 mostra o efeito da temperatura na solubilidade das proteínas do IPSL em pH 4,6. No intervalo de temperatura entre 60°C e 75°C, houve intensa redução da solubilidade protéica, acima desta temperatura poucas alterações foram observadas. O mesmo perfil de perda progressiva de solubilidade com o aumento da temperatura de tratamento térmico foi observado por Pintado e Malcata (1996) para o soro do leite de pequenos ruminantes.

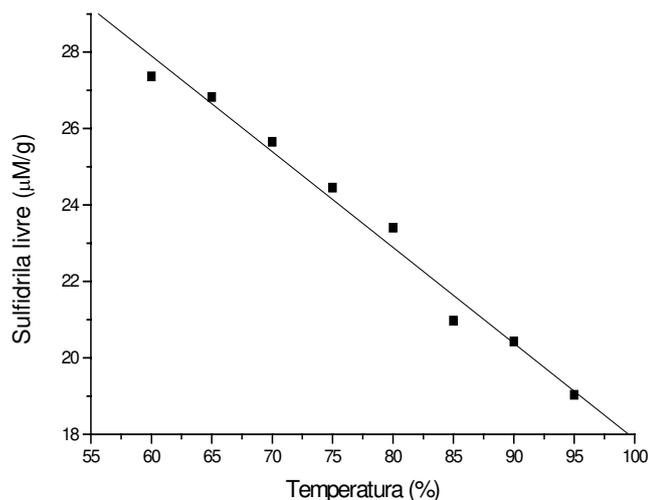


**Figura 9:** Solubilidade das proteínas do IPSL no pH 4,6 em função da temperatura de tratamento térmico.

Os resultados apresentados na Figura 10, mostram uma diminuição linear do número de grupos SH, de 27,36 para 19,03 $\mu$ M/g, após o tratamento térmico do IPSLN entre 60°C e 95°C. Esses resultados estão na faixa de concentração dos grupos SH livres observada por Lee; Morr e Ha (1992), que encontraram para o isolado protéico de soro submetido a tratamentos térmicos, valores entre 17,7 $\mu$ M SH/g (pH8/65°C) e 28,5 $\mu$ M SH/g (pH7/55°C).

A concentração de grupos SH diminui em função do tratamento térmico, porque o aquecimento provoca o desdobramento da estrutura nativa da proteína, expondo estes grupos, aumentando a frequência de colisão molecular, o que promove a formação de novas interações aleatórias. O resultado é uma nova estrutura desorganizada com alterações nas suas.

As alterações observadas, tanto na solubilidade quanto no teor dos grupos SH em função do tratamento térmico, levaram à escolha de duas condições de tratamento, 65°C e 95°C durante 15 minutos, para a obtenção de isolados com graus distintos de desnaturação, além do isolado que não tratado.

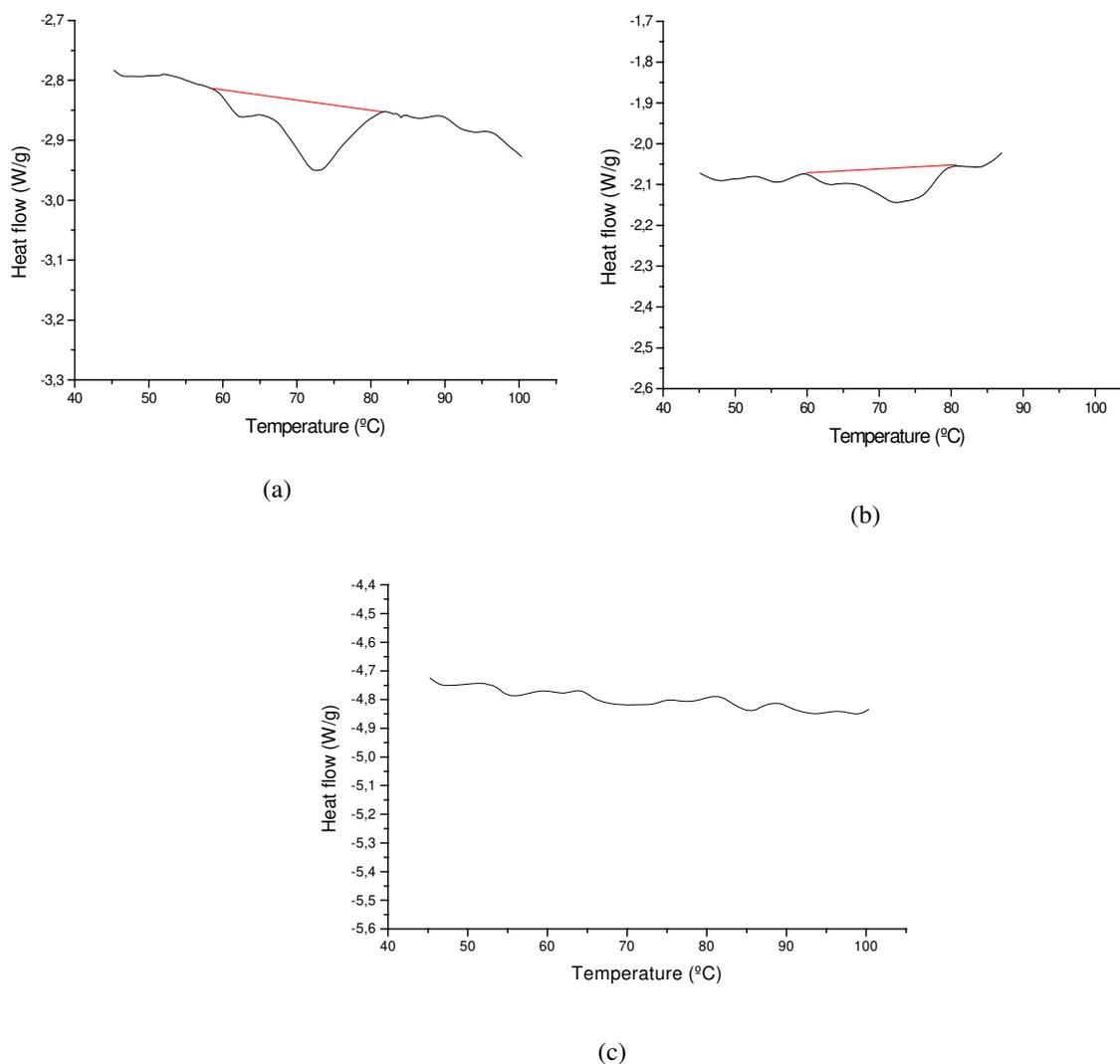


**Figura 10:** Concentração dos grupos sulfidril livres no isolado protéico de soro de leite em função da temperatura de tratamento térmico.

Para caracterizar os isolados obtidos, utilizou-se a calorimetria diferencial de varredura e a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa para determinar a fração protéica solúvel dos IPSL's em função dos tratamentos térmicos.

Na Figura 11a observa-se o termograma do IPSL nativo, o primeiro pico endotérmico corresponde à temperatura de desnaturação da  $\alpha$ -lactalbumina e o segundo à temperatura de desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina, detectadas à 62,0°C e 72,7°C, respectivamente. A Figura 11b apresenta o termograma do IPSL65 e a Figura 11c o termograma do IPSL95, a desnaturação das proteínas do IPSL foi proporcional à intensidade do tratamento térmico. O tratamento do IPSL à 65°C promoveu a desnaturação parcial das proteínas, evidenciada pela redução dos picos endotérmicos. O tratamento à 95°C resultou na ausência de picos endotérmicos, indicando a completa desnaturação protéica. Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Kadharmestan; Baik e Czuchajowska (1998), que observaram a ausência de picos após o

tratamento do concentrado protéico do soro com temperaturas a partir de 80°C.



**Figura 11:** Curvas de calorimetria diferencial de varredura, (a) IP SLN. (b) IP SL65. (c) IP SL95.

A entalpia de transição ( $\Delta H$ ) do IP SLN foi 2,215J/g de proteína (Figura 11b). Após o tratamento térmico a 65°C, para a obtenção do IP SL65, a entalpia de transição foi 1,85J/g. Os valores de  $\Delta H$  obtidos para o IP SLN e IP SL65 estão próximos dos observados por Erdogdu; Czuchajowska e Pomeranz (1995) para o concentrado protéico de soro comercial, que foi de 1,82J/g. O valor de  $\Delta H$  encontrado por Ju, Hettiarachchy e Kilara (1999) para o isolado protéico de soro fornecido pela Davisco<sup>TM</sup> foi de 1,65J/g.

A diminuição dos valores de entalpia em função da temperatura do tratamento térmico comprova a obtenção de isolados com diferentes graus de desnaturação.

**Tabela 1:** Características térmicas do isolado protéico de soro de leite tratado com diferentes temperaturas.

Produto	T <sub>d</sub> α-La (°C)	T <sub>d</sub> β-Lg (°C)	ΔH (J/g de proteína)
IPSLN	62,05±0,19	72,74±0,007	2,215±0,03
IPSL65	63,52±0,01	73,26±0,09	1,85±0,36
IPSL95	ND	ND	ND

T<sub>0</sub>, T<sub>d</sub> e ΔH = temperatura inicial, temperatura de desnaturação e entalpia de desnaturação, respectivamente; ND = não detectado;

Resultados apresentados, como média de três repetições ± desvio padrão.

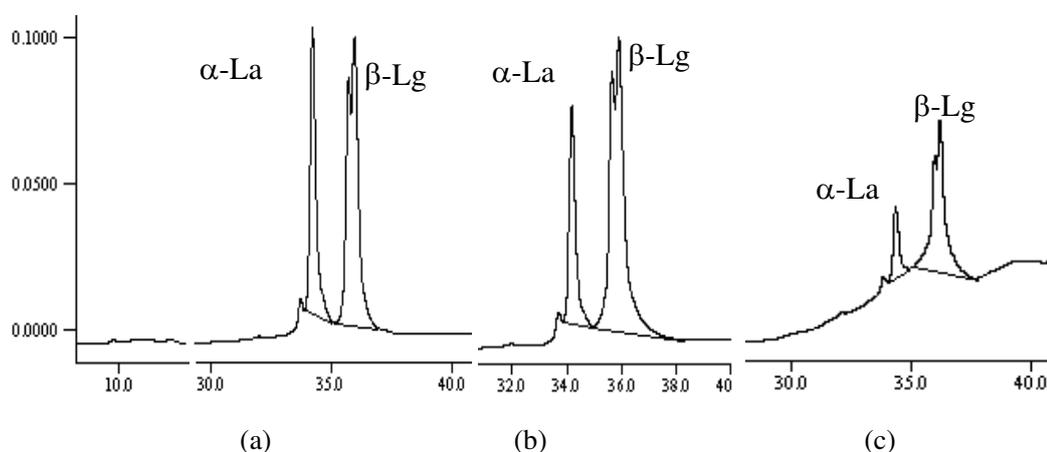
Valores mais altos de entalpia podem estar relacionados a maiores porcentagens de proteína nativa ou pouco desnaturada. Entretanto, é difícil estabelecer uma comparação entre os resultados obtidos com os encontrados na literatura, pela influência de outros fatores, como:

- pH: a medida em que o pH aumenta, a estabilidade térmica das proteínas tende a diminuir, sendo o pH em torno de 6,0 o ponto de estabilidade máxima para a β-Lg (PARK e LUND, 1984);
- Presença de íons: em geral a presença de íons, como cálcio ou sódio, confere um efeito protetor, aumentando a estabilidade térmica (RELKIN; LAUNAY e EYNARD, 1993);
- Aumento da concentração protéica: diminui a estabilidade térmica, provavelmente devido ao maior número de interações entre as moléculas durante o aquecimento (RELKIN e LAUNAY, 1990).

A Figura 12 apresenta os perfis obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa da fração solúvel do IPSL em pH 4,6 antes e após os tratamentos térmicos. O perfil cromatográfico do isolado protéico do soro caracterizou-se pela presença de dois picos bem definidos correspondentes a α-La e a β-Lg (Figura 12a). Com o tratamento térmico, observou-se

uma redução progressiva nas áreas correspondentes a essas proteínas, quando comparadas às áreas quantificadas para o IPSL. A  $\alpha$ -La mostrou maior sensibilidade ao tratamento. A área relativa à  $\alpha$ -La foi reduzida em 25,2% após o tratamento a 65°C, enquanto que não se detectou diferença na área correspondente à  $\beta$ -Lg para o mesmo tratamento (Figura 12b). Quando o IPSL foi submetido ao tratamento a 95°C, a redução da área correspondente a  $\alpha$ -La, comparada à da proteína nativa foi de 92,7%. A redução da área relativa à  $\beta$ -Lg foi de 75,7% para este mesmo tratamento, quando comparada a área da  $\beta$ -Lg do soro não tratado (Figura 12c).

A  $\alpha$ -La desaparece mais rapidamente do que a  $\beta$ -Lg após o aquecimento de soluções contendo proteínas do soro de leite, a precipitação da  $\alpha$ -La parece ser proporcional a concentração de grupos SH livres, em geral presentes na  $\beta$ -Lg (LA FUENTE; SINGH e HEMAR, 2002).



**Figura 12:** Perfil cromatográfico das principais frações do IPSL em função da intensidade do tratamento térmico - IPSL nativo(a); IPSL65(b) e IPSL95(c).

Pintado e Malcata (1996) também observaram uma maior perda por insolubilização para a  $\alpha$ -La do que para a  $\beta$ -Lg, após o tratamento térmico do soro de leite caprino a 85°C e 95°C. Por outro lado, Li-Chan (1983) não observou redução dessas frações ao tratar o concentrado protéico de soro a 60°C, mas quando o tratamento foi realizado a 95°C, observou 70% de perda por insolubilização, tanto para a  $\alpha$ -La quanto para a  $\beta$ -Lg.

No soro de leite, o início da formação de agregados, resultantes da desnaturação, consiste na separação dos dímeros de  $\beta$ -Lg, seguida da exposição dos grupos SH livres do monômero nativo que torna a proteína reativa para propagar a reação via reações sulfidríla/dissulfeto entre outras moléculas de  $\beta$ -Lg ativadas, podendo ocorrer a formação de grandes agregados (LA FUENTE; SINGH e HEMAR, 2002).

Na análise das frações solúveis por cromatografia, apenas a  $\alpha$ -La e a  $\beta$ -Lg foram detectadas, observa-se a perda da  $\alpha$ -La por insolubilização, após o tratamento a 65°C, antes do desaparecimento da  $\beta$ -Lg. Neste caso, a perda de solubilidade da  $\alpha$ -La pode ter ocorrido devido sua interação com BSA, por meio de interações dissulfídicas ou hidrofóbicas, levando a formação de agregados, como descrito por Havea et al. (2000).

## **4.2. Obtenção dos hidrolisados**

### **4.2.1. Reações de hidrólise**

Para a pesquisa e aplicação de hidrolisados com atividade biológica, em especial a anti-hipertensiva, elevadas concentrações de sódio são indesejáveis devido ao risco de interferências nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Cushman e Cheung (1971) observaram que durante a otimização das condições de reação da ACE, esta enzima apresentou atividade na presença de concentrações de sódio em torno de 300mM, sendo inibida tanto em concentrações um pouco mais baixas como em concentrações um pouco acima desse valor.

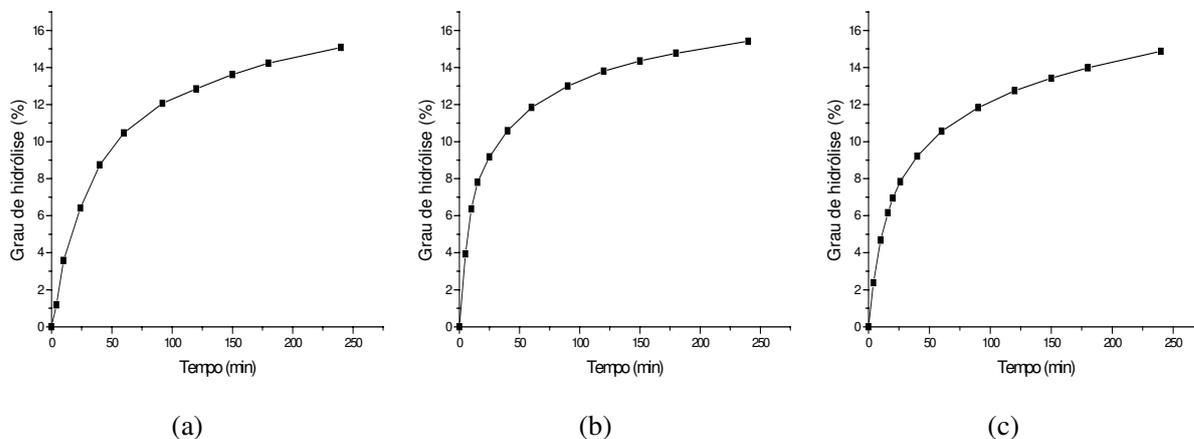
A determinação do grau de hidrólise pelo método pH-stat tem um elevado valor prático por sua precisão e possibilidade de acompanhamento do processo para a realização de uma hidrólise controlada e sem necessidade de retirada de alíquotas durante a reação. A desvantagem desse método é que a titulação de NaOH para controle do pH, promove um aumento no teor do resíduo mineral da amostra pela adição de sódio (MULTILANGI; PANYAM e KILARA, 1995).

Devido a dificuldade em retirar o sódio do hidrolisado por diálise, sem a perda de pequenos peptídeos, realizou-se o acompanhamento da hidrólise do IPSLN de três maneiras diferentes: na primeira o pH da reação foi controlado pela titulação de hidróxido de sódio; na

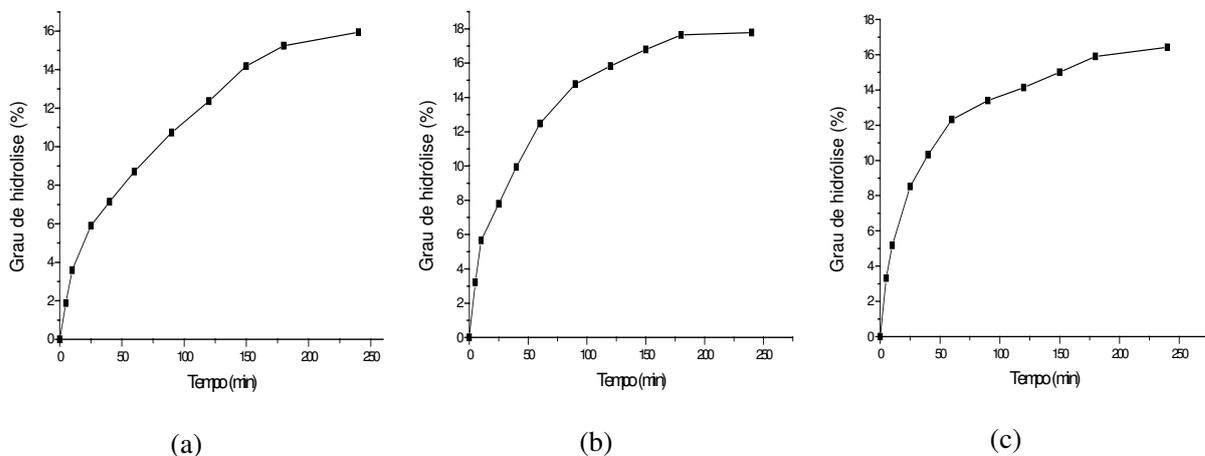
segunda pela titulação de hidróxido de amônio; e na terceira, a reação foi realizada sem controle de pH.

As reações de hidrólise preliminares para a escolha do modo de controle do pH foram realizadas com o IPSLN, utilizando as enzimas Alcalase,  $\alpha$ -quimotripsina e Proteomix. Foram escolhidas as condições de reação onde o hidrolisado apresentou o teor de cinzas mais baixo e maior grau de hidrólise.

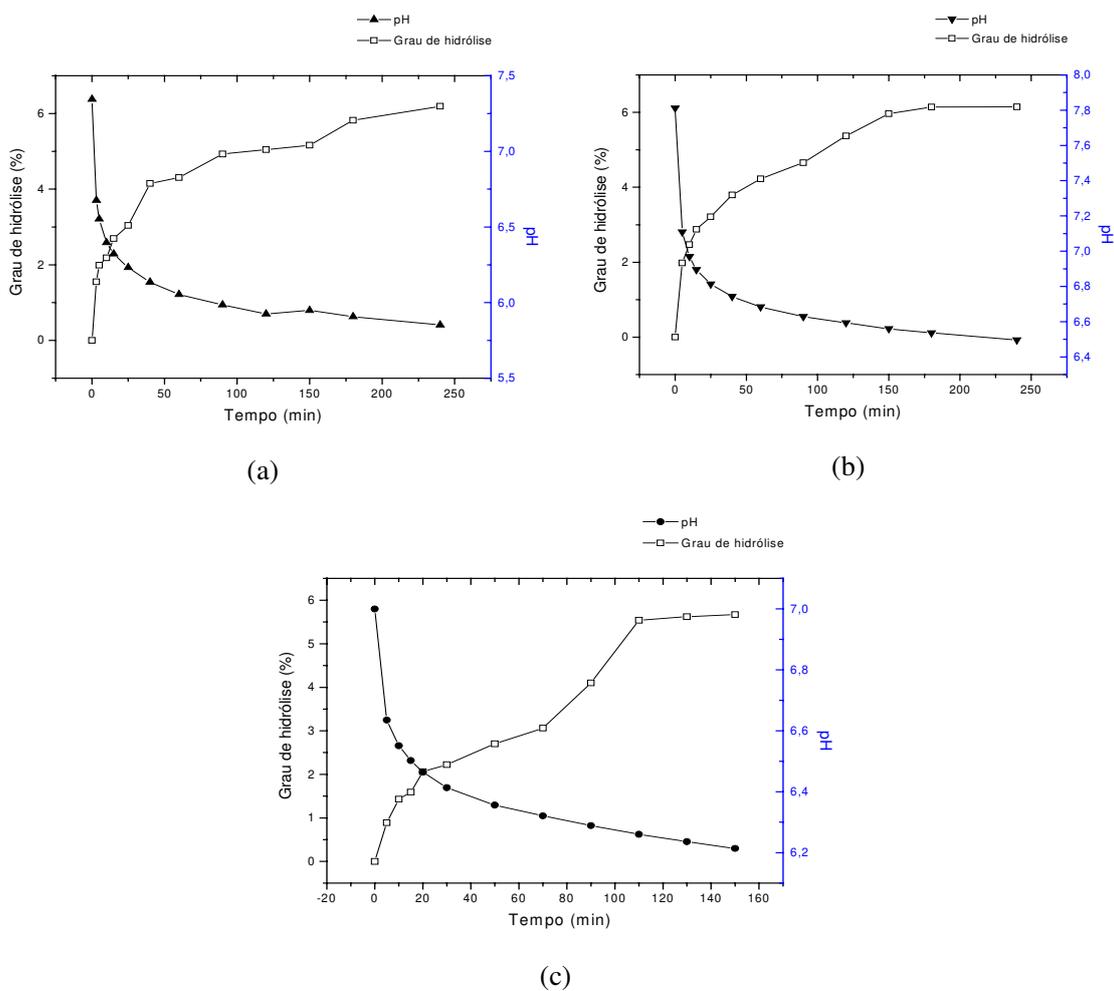
Nas reações de hidrólise com pH controlado por NaOH ou por  $\text{NH}_4\text{OH}$ , o grau de hidrólise máximo alcançado após 4 horas de reação foi similar para todas as enzimas (Figura 13 e Figura 14). Por outro lado, nas reações em que não foi realizado o controle de pH, a clivagem das pontes peptídicas promoveu a rápida redução do pH para valores abaixo do ótimo de atividade enzimática (Figura 15), resultando em produtos de grau de hidrólise mais baixo do que aqueles produzidos nas reações onde houve o controle de pH.



**Figura 13:** Curva de hidrólise do IPSLN utilizando (a) Alcalase; (b)  $\alpha$ -quimotripsina; (c) Proteomix, com pH da reação controlado pela adição de NaOH.



**Figura 14:** Curva de hidrólise do IPSLN utilizando (a) Alcalase; (b)  $\alpha$ -quimotripsina; (c) Proteomix, com pH da reação controlado pela adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .



**Figura 15:** Curva de hidrólise do IPSLN utilizando (a) Alcalase; (b)  $\alpha$ -quimotripsina; (c) Proteomix e queda do pH durante a reação.

Após a obtenção dos hidrolisados, foi determinado o grau de hidrólise pelo método do TNBS para todos os produtos, a fim de possibilitar a comparação entre hidrolisados obtidos por métodos diferentes (Tabela 2). Estes resultados mostram que não houve diferença no grau de hidrólise entre os hidrolisados obtidos pelo método pH-Stat, quando o controle do pH foi realizado pela titulação de NaOH ou NH<sub>4</sub>OH (Figuras 13 e 14). Na hidrólise sem controle de pH o grau de hidrólise foi inferior, como também pode ser observado na Figura 15.

**Tabela 2:** Determinação do grau de hidrólise pelo método do TNBS nos hidrolisados obtidos em reação com pH controlado por NaOH, NH<sub>4</sub>OH e sem controle de pH.

Enzima	GH(%)		
	NaOH	NH <sub>4</sub> OH	Sem controle de pH
Alcalase	10,97±1,09	10,41±0,50	5,5±0,09
α-quimotripsina	8,80±0,14	9,80±0,42	5,8±0,12
Proteomix	9,1±0,26	10,47±0,50	5,03±0,55

Resultados apresentados como média de três repetições ± desvio padrão.

O teor de cinzas da matéria prima (IPSLN) foi 2,02±0,04%, valor próximo ao determinado para os hidrolisados obtidos com controle de pH realizado pela adição do NH<sub>4</sub>OH (Tabela 3). Quando o controle de pH foi realizado utilizando NaOH, o teor de cinzas aumentou de 2 a 3 vezes em relação ao valor inicial. Estes resultados estão de acordo com o observado por Multilangi; Panyam e Kilara (1995) que obtiveram um aumento de 3 a 4 vezes no teor de cinzas do concentrado protéico de soro após a hidrólise enzimática utilizando as enzimas Neutrase, Alcalase, tripsina e α-quimotripsina, até 8% de GH.

**Tabela 3:** Teor percentual de cinzas dos hidrolisados obtidos em reações com pH controlado por NaOH e NH<sub>4</sub>OH.

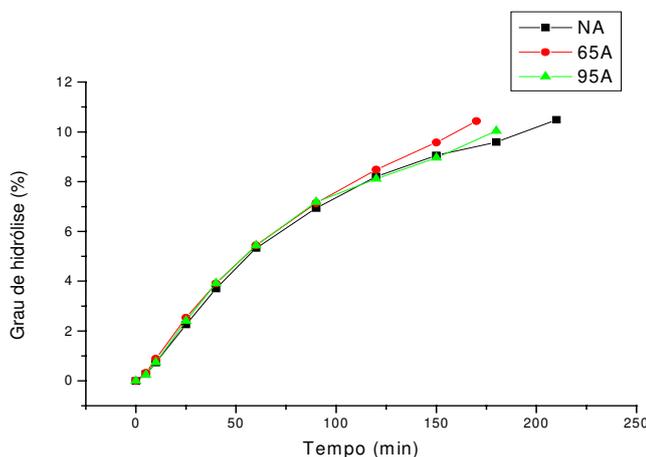
Enzima	Cinzas (%)	
	NaOH	NH <sub>4</sub> OH
Alcalase	4,87±0,23	1,79±0,009
α-quimotripsina	5,91±0,34	1,78±0,005
Proteomix	3,44±0,019	1,79±0,010

Resultados apresentados como média de três repetições ± desvio padrão.

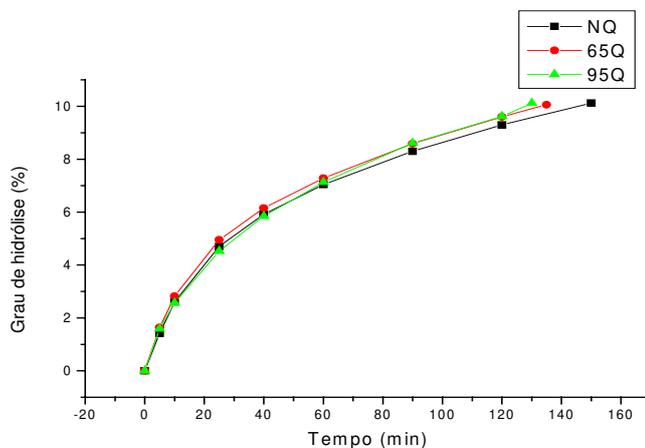
#### 4.2.2. Obtenção dos hidrolisados

IPSLN, IPSL65 e IPSL95 foram hidrolisados pela ação das enzimas Alcalase,  $\alpha$ -quimotripsina e Proteomix (Figuras 16, 17 e 18, respectivamente). Optou-se pela reação com controle de pH utilizando a titulação com  $\text{NH}_4\text{OH}$ , pelo baixo teor de cinzas e grau de hidrólise similar aos hidrolisados obtidos pelo método pH-stat com pH controlado pela adição de NaOH (seção 4.2.1).

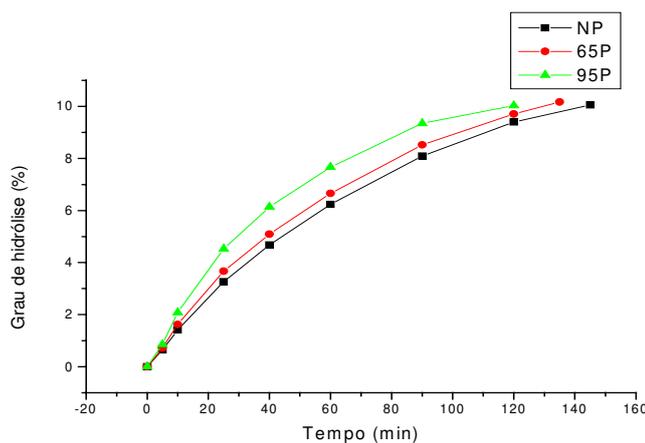
Independente da enzima utilizada, o tempo necessário para atingir 10% de grau de hidrólise foi menor para os isolados submetidos ao tratamento térmico. Esta diferença foi mais expressiva para as hidrólises catalisadas pela Alcalase, com 60 min a menos entre a hidrólise do IPSLN e do IPSL65, e 30min a menos entre a hidrólise do IPSLN e do IPSL95. Para as outras enzimas, as diferenças foram menos expressivas. Provavelmente as alterações na cadeia polipeptídica, que ocorrem devido à desnaturação protéica, facilitaram a hidrólise enzimática pela maior exposição de ligações peptídicas específicas às enzimas, antes ocultas na compacta estrutura globular da proteína nativa (MULTILANGI; PANYAM E KILARA, 1995).



**Figura 16:** Curva de hidrólise dos isolados IPSLN, IPSL65 e IPSL95 pela Alcalase, em pH-Stat com titulação de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .



**Figura 17:** Curva de hidrólise dos isolados IPSLN, IPSL65 e IPSL95 pela  $\alpha$ -quimotripsina, em pH-Stat com titulação de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .



**Figura 18:** Curva de hidrólise dos isolados IPSLN, IPSL65 e IPSL95 pela Proteomix, em pH-Stat com titulação de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

#### 4.2.3. Caracterização dos Hidrolisados

Isolados e concentrados protéicos de soro de leite apresentam, em geral, grande variabilidade na sua composição e funcionalidade devido à diferenças nas condições de processamento e da matéria-prima (LA FUENTE, et al., 2002). A Tabela 4 mostra a composição centesimal do IPSL e dos hidrolisados liofilizados. Por se tratar de um processo que não envolveu

etapas de separação, a hidrólise enzimática não causou alterações significativas na composição protéica do produto final em relação a da matéria prima.

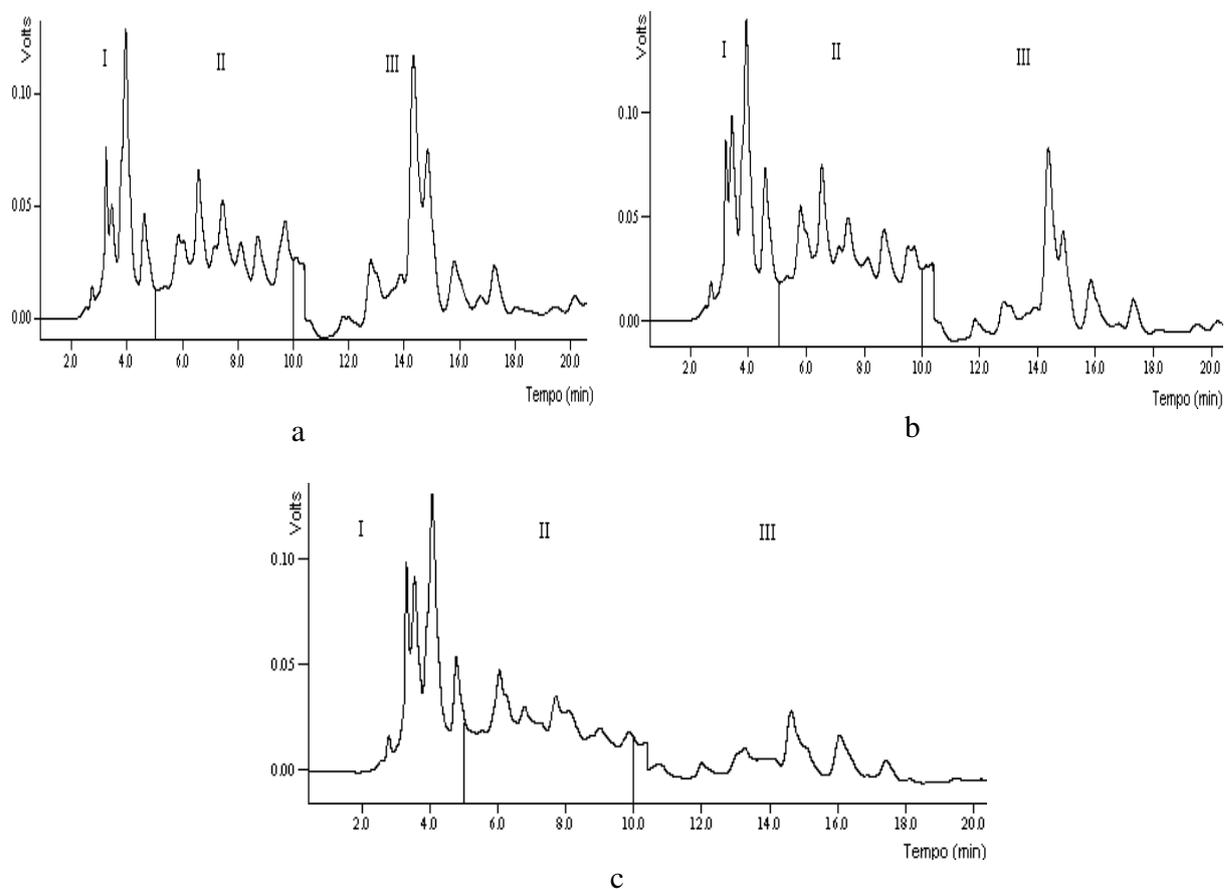
**Tabela 4:** Composição centesimal aproximada do isolado protéico do soro de leite e de seus hidrolisados.

Produtos	Proteína	Umidade	Cinzas	Lactose	Lípides
IPSL	96,34±1,34 <sup>a</sup>	2,38±0,20 <sup>b</sup>	2,02±0,04 <sup>c</sup>	0,22±0,002 <sup>e</sup>	0,35±0,11 <sup>g</sup>
NA	96,94±0,34 <sup>a</sup>	2,28±0,09 <sup>b</sup>	1,97±0,16 <sup>c</sup>	0,42±0,02 <sup>f</sup>	0,22±0,09 <sup>h</sup>
65A	98,77±0,23 <sup>a</sup>	2,35±0,22 <sup>b</sup>	1,92±0,15 <sup>c</sup>	0,45±0,006 <sup>f</sup>	0,19±0,01 <sup>h</sup>
95A	99,25±1,18 <sup>a</sup>	2,91±0,18 <sup>b</sup>	1,84±0,21 <sup>c</sup>	0,44±0,003 <sup>f</sup>	0,19±0,09 <sup>h</sup>
NQ	99,26±0,04 <sup>a</sup>	2,84±0,13 <sup>b</sup>	1,74±0,25 <sup>c</sup>	0,46±0,008 <sup>f</sup>	0,24±0,07 <sup>h</sup>
65Q	99,08±0,57 <sup>a</sup>	2,60±0,35 <sup>b</sup>	1,80±0,35 <sup>c</sup>	0,46±0,004 <sup>f</sup>	0,21±0,01 <sup>h</sup>
95Q	99,61±1,47 <sup>a</sup>	2,97±0,67 <sup>b</sup>	1,81±0,29 <sup>c</sup>	0,44±0,011 <sup>f</sup>	0,27±0,01 <sup>h</sup>
NP	97,90±0,21 <sup>a</sup>	2,29±0,40 <sup>b</sup>	1,85±0,12 <sup>c</sup>	0,40±0,01 <sup>f</sup>	0,25±0,08 <sup>h</sup>
65P	98,69±0,24 <sup>a</sup>	2,34±0,10 <sup>b</sup>	1,83±0,41 <sup>c</sup>	0,42±0,005 <sup>f</sup>	0,20±0,09 <sup>h</sup>
95P	96,92±0,18 <sup>a</sup>	2,13±0,05 <sup>b</sup>	1,81±0,04 <sup>c</sup>	0,45±0,003 <sup>f</sup>	0,31±0,02 <sup>g</sup>
Biozate	96,18±1,49 <sup>a</sup>	2,54±1,18 <sup>b</sup>	4,62±0,20 <sup>d</sup>	0,39±0,007 <sup>f</sup>	0,15±0,07 <sup>h</sup>

Resultados apresentados em base seca, como média de três repetições ± desvio padrão (letras diferentes por coluna  $p < 0,05$ , Teste T).

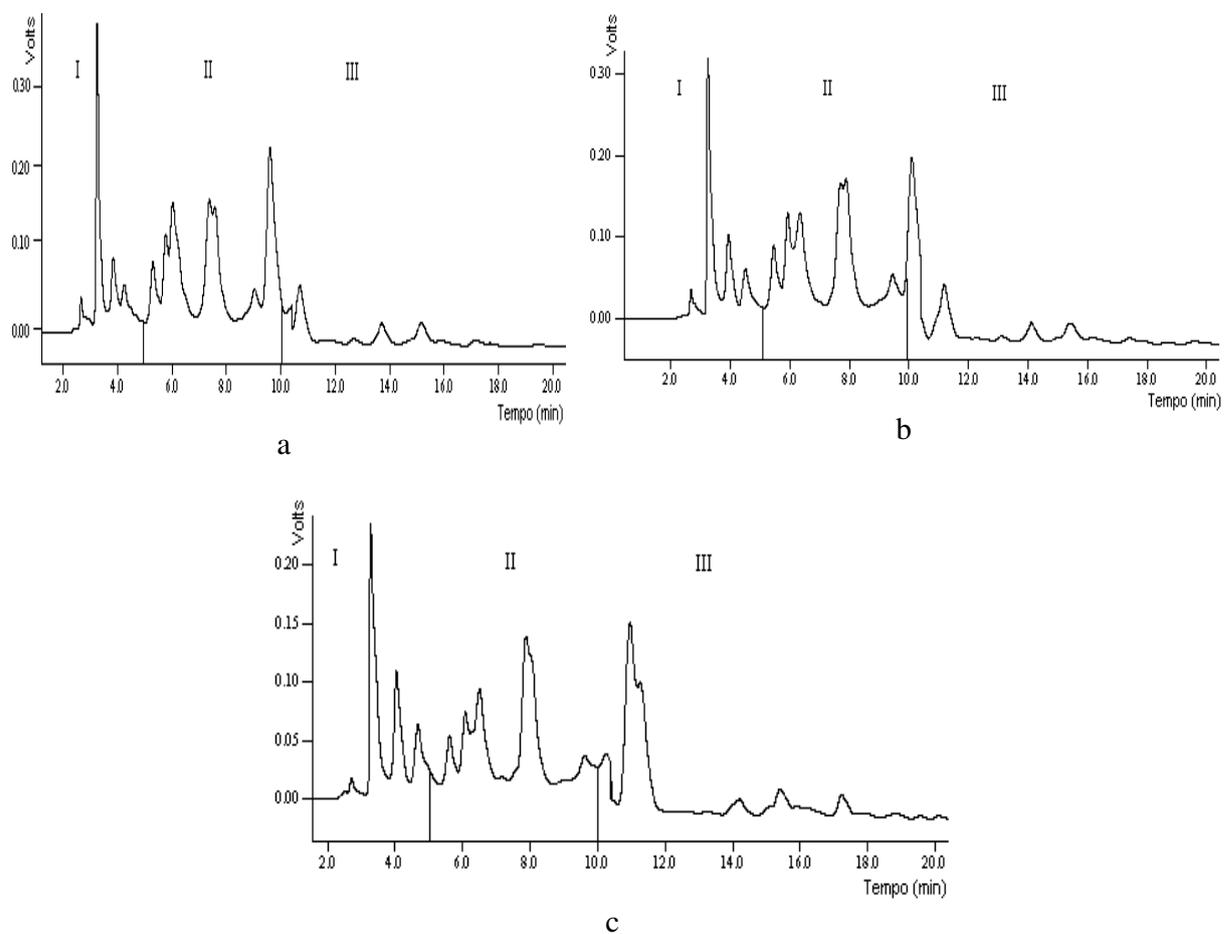
O hidrolisado comercial Biozate (Davisco) apresentou teor de cinzas mais elevado do que os hidrolisados obtidos neste trabalho, o que pode ter sido devido as condições de obtenção da matéria-prima ou ao método utilizado para controle do pH durante a hidrólise enzimática.

O perfil cromatográfico (CLAE-FR) do IPSL, anteriormente caracterizado por dois picos correspondentes à  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina (Figura 12), após a hidrólise apresentou um grande número de picos correspondentes aos peptídeos formados pela ação das enzimas proteolíticas (Figuras 19 a 21), com um perfil característico de acordo com a enzima utilizada. O perfil de eluição foi dividido em três zonas, de acordo com a hidrofobicidade dos peptídeos eluídos, tendo como base a classificação feita por Legay et al. (1997).



I – Baixa hidrofobicidade      II – Hidrofobicidade intermediária      III – Hidrofobicidade alta

**Figura 19:** Perfil cromatográfico dos hidrolisados obtidos pela ação da Alcalase: NA (a), 65A (b) e 95A (c).

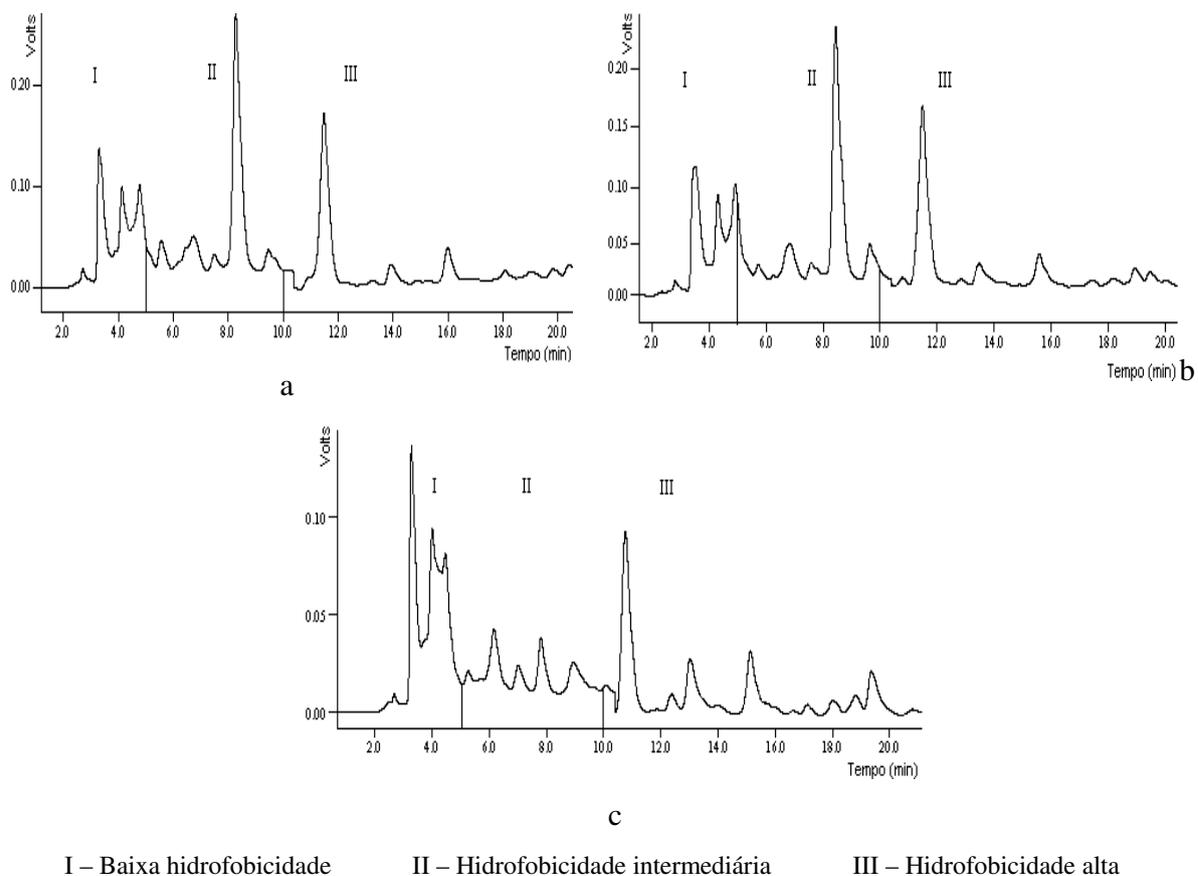


I – Baixa hidrofobicidade

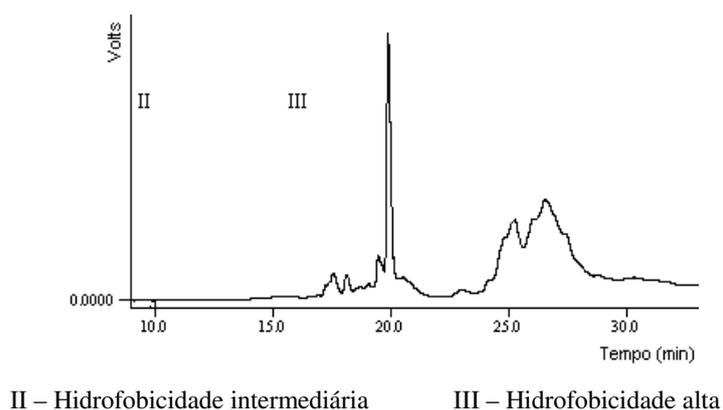
II – Hidrofobicidade intermediária

III – Hidrofobicidade alta

**Figura 20:** Perfil cromatográfico dos hidrolisados obtidos pela ação da  $\alpha$ -quimotripsina: NQ (a), 65Q (b) e 95Q (c).



**Figura 21:** Perfil cromatográfico dos hidrolisados obtidos pela ação da Proteomix: NP (a), 65P (b) e 95P (c).



**Figura 22:** Perfil cromatográfico do hidrolisado comercial Biozate.

A distribuição do perfil de hidrofobicidade dos hidrolisados, está apresentada na Tabela 5. O hidrolisado NA, produzido pela ação da Alcalase sobre o IPSLN, apresentou uma elevada concentração de peptídeos nas regiões de hidrofobicidade intermediária e alta. Os hidrolisados

65A e 95A apresentaram uma área significativamente menor ( $p < 0,05$ ) correspondente aos peptídeos de alta hidrofobicidade, 43,3% e 22,9% respectivamente, quando comparados ao hidrolisado NA, que apresentou 51,3% dos peptídeos na região de hidrofobicidade elevada. Os hidrolisados 65A e 95A apresentaram uma concentração significativamente mais elevada de peptídeos de baixa hidrofobicidade, 23,4% e 38,8% respectivamente, quando comparados ao hidrolisado NA, que apresentou um total de 18,2% de peptídeos de baixa hidrofobicidade.

A hidrólise dos isolados pela  $\alpha$ -quimotripsina resultou em um maior percentual de peptídeos concentrados na região de hidrofobicidade intermediária com um perfil menos hidrofóbico do que os hidrolisados obtidos pela ação da Alcalase. Não houve diferença estatística nas características de hidrofobicidade dos hidrolisados produzidos por esta enzima (NQ, 65Q e 95Q).

Os hidrolisados obtidos pela ação da Proteomix (NP, 65P e 95P) apresentaram um perfil cromatográfico similar. Com o aumento da temperatura de tratamento térmico prévio à hidrólise, houve uma tendência no aumento da área dos peptídeos de baixa hidrofobicidade (Tabela 5). Verificou-se também uma redução significativa na área correspondente aos peptídeos de hidrofobicidade intermediária, presentes no hidrolisado 95P, quando comparado ao hidrolisado NP.

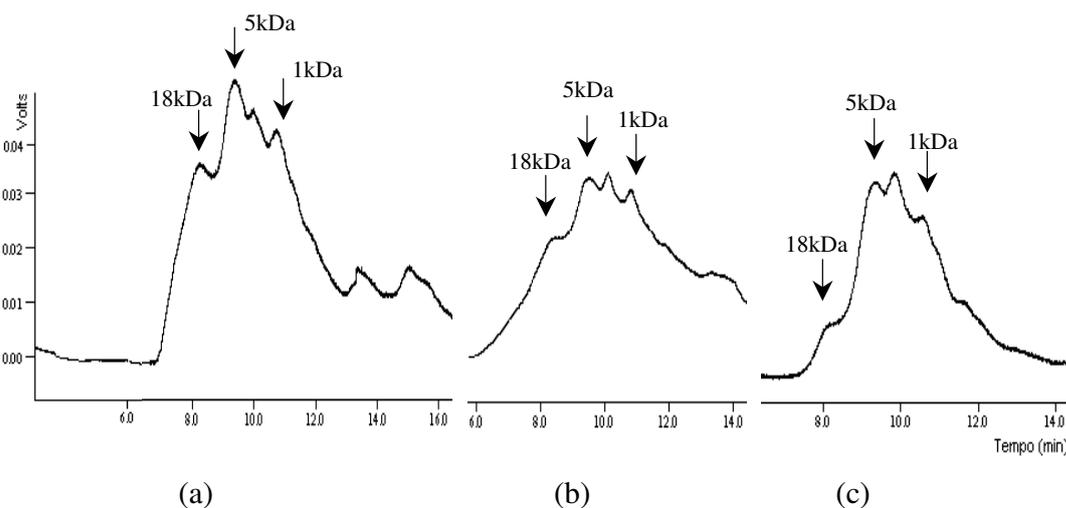
O perfil cromatográfico do hidrolisado comercial Biozate apresentou menor número de picos quando comparado aos hidrolisados obtidos no presente trabalho, além disso esses picos foram detectados na região de mais elevada hidrofobicidade do cromatograma, o que sugere a presença de peptídeos de alto peso molecular provenientes da hidrólise parcial das proteínas do soro e formação de pouco peptídeos de baixo peso molecular (CHABANET, 1992).

**Tabela 5:** Distribuição de hidrofobicidade dos hidrolisados.

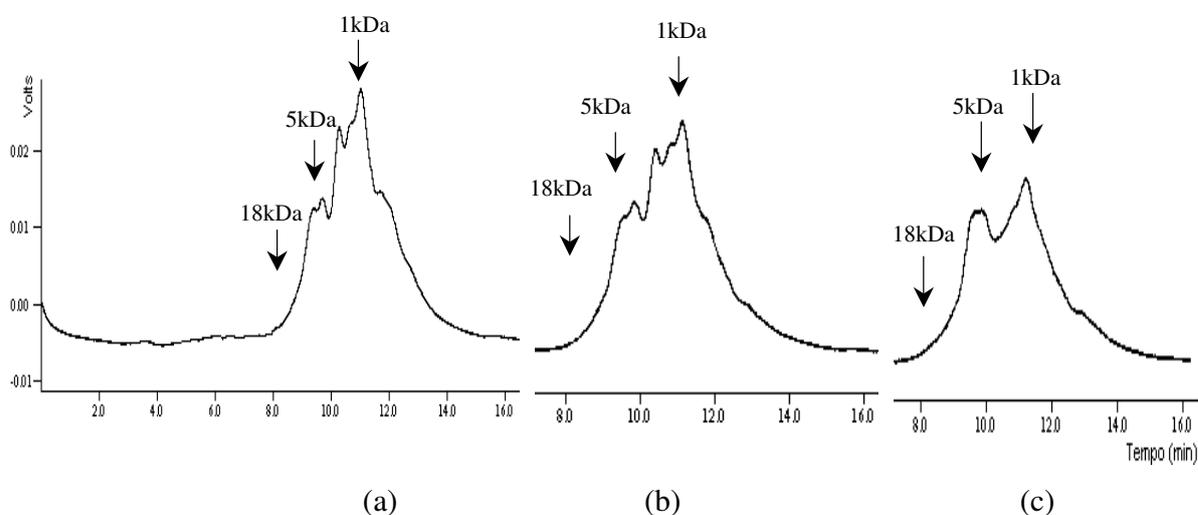
Hidrolisado	Intensidade da hidrofobicidade*		
	Baixa	Intermediária	Alta
NA	18,20±0,07	30,45±0,03	51,33±0,04
65A	23,44±1,47*	33,24±7,03	43,29±5,56*
95A	38,78±0,20*	38,34±0,77	22,86±0,97*
NQ	22,58±0,16	49,68±0,08	27,71±0,24
65Q	21,37±0,05	44,53±0,97	34,17±0,33
95Q	26,85±1,57	36,78±4,35	36,35±5,9
NP	26,64±2,81	39,96±1,44	37,22±3,43
65P	27,67±2,09	37,63±1,67	34,68±0,42
95P	35,36±3,49	28,45±3,39	36,19±6,8

Os valores são média das áreas de uma distribuição de hidrofobicidade relativa, expressos como % da área total do cromatograma, calculados a partir de três repetições (\* diferença estatística  $p < 0,05$  entre hidrolisados derivados de isolado desnaturado versus os respectivos hidrolisados do isolado nativo, teste T).

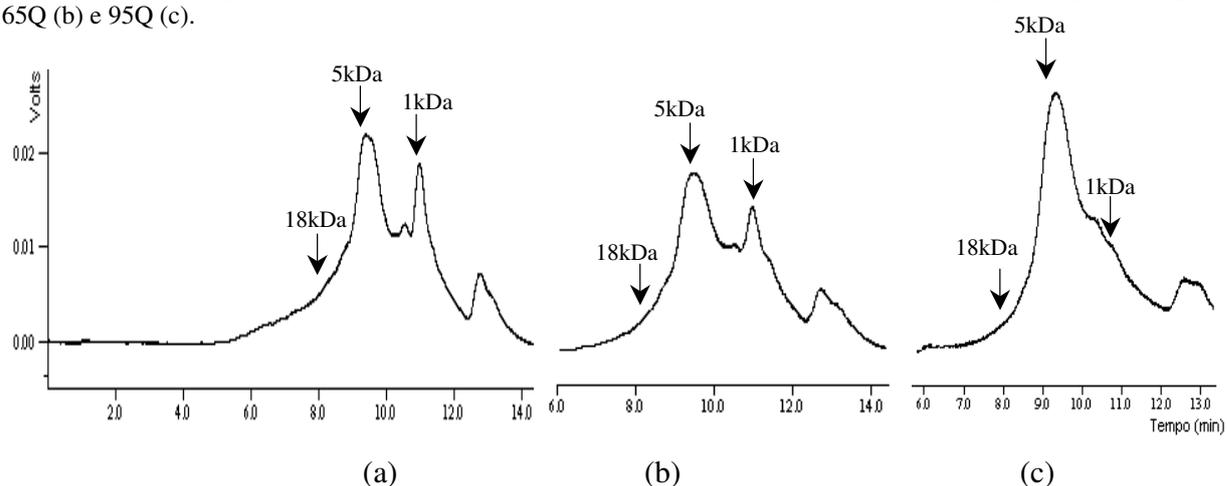
A distribuição de tamanho molecular dos hidrolisados, obtida por cromatografia de exclusão molecular, está apresentada nas Figuras 23 a 25. Observa-se que o perfil cromatográfico dos hidrolisados variou de acordo com a enzima utilizada, mas também foi influenciado pelo tratamento térmico prévio à hidrólise. A Figura 23 apresenta os cromatogramas dos hidrolisados obtidos pela ação da Alcalase, NA, 65A e 95A. Com o aumento da intensidade do tratamento térmico, observou-se uma redução na altura do pico correspondente a 18kDa.



**Figura 23:** Cromatografia de exclusão molecular dos hidrolisados obtidos pela ação da Alcalase: NA (a), 65A (b) e 95A (c).



**Figura 24:** Cromatografia de exclusão molecular dos hidrolisados obtidos pela ação da  $\alpha$ -quimotripsina: NQ (a), 65Q (b) e 95Q (c).



**Figura 25:** Cromatografia de exclusão molecular dos hidrolisados obtidos pela ação da Proteomix: NP (a), 65P (b) e 95P (c).

Os cromatogramas dos hidrolisados obtidos pela ação da  $\alpha$ -quimotripsina estão apresentados na Figura 24. Observa-se que para todos os tratamentos térmicos, o perfil dos hidrolisados caracterizou-se por uma maior área de peptídeos com peso molecular inferior a 5kDa. As características de distribuição molecular dos hidrolisados obtidos a partir do IPSLN e do IPSL65 foram semelhantes.

A Figura 25 apresenta os cromatogramas de exclusão molecular dos hidrolisados obtidos com a enzima Proteomix. Os hidrolisados NP e 65P apresentam um perfil cromatográfico similar, enquanto que o perfil do hidrolisado 95P caracterizou-se pela alteração do padrão presente nos

dois primeiros, com a ausência do pico detectado na região de 1kDa. Todos os hidrolisados derivados da enzima Proteomix apresentaram um pico que eluiu em torno de 9 minutos, correspondendo a um peso molecular de 10kDa.

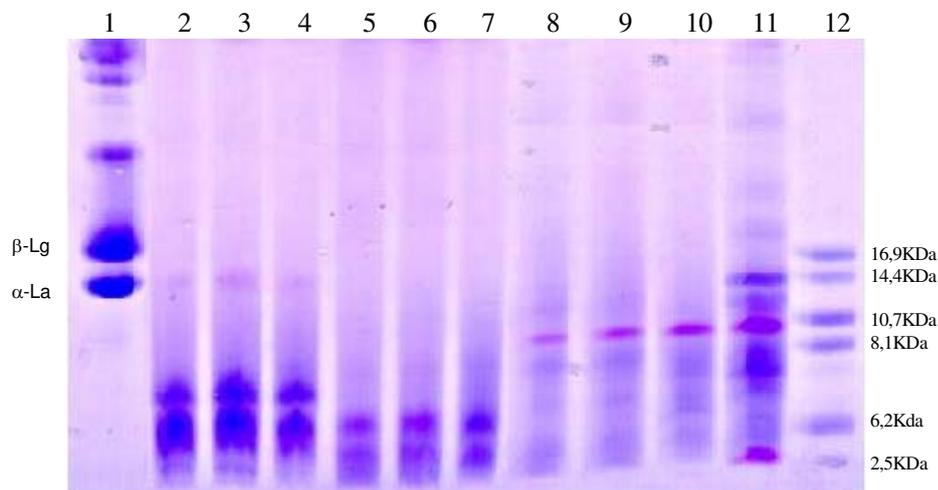
De um modo geral, o tratamento térmico a 65°C aplicado no isolado antes da hidrólise enzimática resultou em pequenas alterações no perfil de distribuição de tamanho molecular, em comparação ao perfil dos hidrolisados obtidos a partir do isolado nativo. Todos os hidrolisados obtidos a partir do isolado desnaturado a 95°C apresentaram alterações importantes no perfil cromatográfico, evidenciadas redução da área ou ausência de alguns picos que eluem no mesmo tempo de retenção dos hidrolisados derivados do isolado nativo e desnaturado a 65°C, para os mesmos tratamentos enzimáticos. O hidrolisado 95A apresentou redução na área do pico que eluiu em 8 minutos, quando comparado ao perfil dos hidrolisados NA e 65A. No perfil cromatográfico do hidrolisado 95Q, não houve detecção do pico que eluiu em 10 minutos nos cromatogramas dos hidrolisados NQ e 65Q. No perfil cromatográfico do hidrolisado 95P não foi detectado o pico que eluiu em 10,5 minutos no perfil cromatográfico dos hidrolisados NP e 65P.

O perfil eletroforético (SDS-PAGE) dos hidrolisados obtido por eletroforese está apresentado na Figura 26. A coluna 1 mostra o perfil do IPSLN intacto, caracterizado pela presença das principais frações protéicas,  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina. Os hidrolisados NA e 65A e 95A (Figura 25, colunas 2 a 4) são caracterizados pela presença de uma banda difusa, que pode ser corresponde à  $\alpha$ -La não hidrolisada. Observou-se a formação de peptídeos de baixo peso molecular, com prevalência de duas bandas com peso médio em torno de 6 e 7kDa.

Os hidrolisados NQ, 65Q e 95Q, produzidos pela  $\alpha$ -quimotripsina, apresentaram bandas com peso molecular mais baixo que os hidrolisados obtidos pelas enzimas Proteomix e Alcalase (Figura 26, colunas 5 a 7), onde as duas bandas mais definidas mostraram um peso molecular médio de 5,7 e 4,2kDa. Os perfis dos hidrolisados, produzidos pela enzima Proteomix (Figura 26, colunas 8-10), apresentam uma banda bem definida com peso molecular em torno de 10kDa.

O perfil eletroforético do hidrolisado comercial Biozate (Figura 26, coluna 11) caracterizou-se pela presença de várias bandas correspondentes à  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg e outras frações de

alto peso molecular que não foram hidrolisadas, além de peptídeos de peso molecular intermediário, como 12, 10, 8 e 4kDa, típico de um produto com baixo grau de hidrólise.



**Figura 26:** Eletroforese SDS-PAGE (*High Density*) dos hidrolisados. Coluna 1 - isolado não hidrolisado; coluna 2 - NA; coluna 3 - 65A; coluna 4 - 95A; coluna 5 - NQ; coluna 6 - 65Q; coluna 7 - 95Q; Coluna 8 - NP; coluna 9 - 65P; coluna 10 - 95P; coluna 11 - hidrolisado comercial Biozate; coluna 12 - padrão contendo: mioglobina (16,9 kDa), globina I + II (14,4 kDa), globina I + III (10,7 kDa), globina I (8,1 kDa), globina II (6,2 kDa), globina III (2,5kDa).

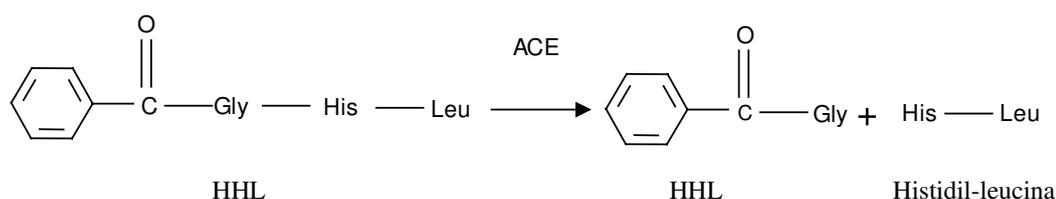
Os hidrolisados obtidos a partir da proteína nativa apresentaram características distintas daqueles provenientes da hidrólise da proteína desnaturada, indicadas pelo aumento da concentração de peptídeos de baixa hidrofobicidade e alteração do perfil de distribuição de peso molecular nos hidrolisados obtidos a partir das proteínas desnaturadas. A desnaturação térmica prévia à hidrólise já vem sendo utilizada com êxito durante o processamento de formulações hipoalergênicas (CLEMENTE, 2000), sendo necessário ainda o esclarecimento de sua influência na obtenção de peptídeos anti-hipertensivos.

### 4.3. Atividade anti-hipertensiva *in vitro*

#### 4.3.1. Padronização do método para determinação da atividade da ACE

Para a determinação da atividade da ACE *in vitro*, diversos substratos têm sido avaliados, principalmente peptídeos sintéticos, que após sua clivagem pela ACE liberam substâncias cromogênicas (CUSHMAN e CHEUNG, 1971; HOLMQUIST; BÜNNING e RIORDAN, 1979). Em geral, os peptídeos utilizados para determinar a atividade da ACE apresentam uma seqüência

semelhante à porção final do substrato natural desta enzima, a angiotensina I, e tem sua porção N-terminal bloqueada (CONROY e LAI, 1978). O substrato sintético mais usado é o hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL). As técnicas que empregam este substrato consistem em sua clivagem pela ACE com a liberação do ácido hipúrico e do dipeptídeo histidil-leucina (his-leu), como mostra a Figura 27.



**Figura 27:** Formação do ácido hipúrico pela ACE a partir do substrato Hipuril-histidil-leucina

Na determinação da atividade da ACE pelo monitoramento da formação do ácido hipúrico, o método mais utilizado pela indústria farmacêutica e por pesquisadores da área de alimentos funcionais é o protocolo desenvolvido por Cushman e Cheung (1971) (GÓMEZ-RUIZ et al., 20002; HÉRNANDEZ-LEDESMA et al., 2002; SUETSUNA e NAKANO, 2000; ROY; WATANABE e TAMAI, 2000; FITZGERALD e MEISEL, 1999; FUJITA e YOSHIKAWA, 1999).

Em testes preliminares realizados para a determinação da atividade da ACE *in vitro* e para a pesquisa da ação inibitória dos hidrolisados derivados do concentrado protéico de soro de leite, observou-se uma alta variabilidade nos resultados ao utilizar o método descrito por Cushman e Cheung (1971). Dificuldades em executar este método também foram relatadas por Wu; Aluko e Muir (2002), Mehanna e Dowling (1999) e Kim et al. (1999). Dentre as dificuldades encontradas, destacam-se as várias etapas necessárias para extrair e quantificar o produto da reação, devido principalmente à possibilidade da contaminação do extrato com o substrato sintético HHL, que absorve no mesmo comprimento de onda que o produto (AH).

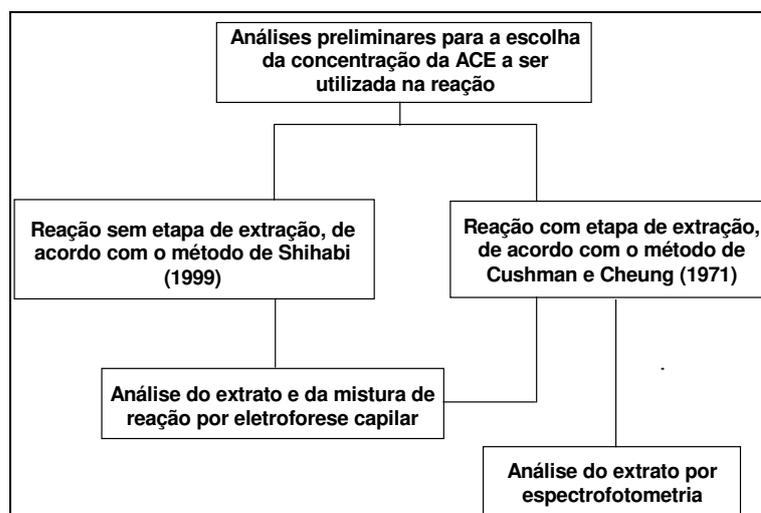
Recentemente, as técnicas para determinação da atividade da ACE têm sido desenvolvidas e modeladas tendo em vista a necessidade da padronização de um método mais reprodutível. Tem sido estudada a utilização de novos substratos para a reação, em substituição ao HHL

(CHEVIRON et al., 2000), e o emprego da eletroforese capilar (SHIHABI, 1999; VAN DYCK et al., 2003) ou da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE- FR) (MEHANNA e DOWLING, 1999; WU; ALUKO e MUIR, 2002), que possibilitam a detecção do produto e do substrato sem necessidade de extração prévia. A utilização da eletroforese capilar para determinar a atividade da ACE foi primeiramente descrita por Shihabi (1999), ao pesquisar a atividade desta enzima no soro de indivíduos, onde substrato e produto da reação foram detectados com eficiência. Recentemente, Van Dyck et al. (2003) estudaram aspectos cinéticos da reação entre a ACE e o HHL utilizando a eletroforese capilar.

A utilização da eletroforese capilar tem vários pontos positivos quando comparada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): menor ocorrência de alargamento de bandas; possibilidade de utilização de pequenos volumes de amostra e solventes; baixa geração de resíduos; e utilização de tampões como fase móvel e capacidade de separação de analitos de diferentes naturezas químicas simultaneamente, como no caso do peptídeo sintético HHL do AH que se trata de um ácido orgânico (FRAZIER; AMES e NURSTEN, 1999; TAVARES, 1997).

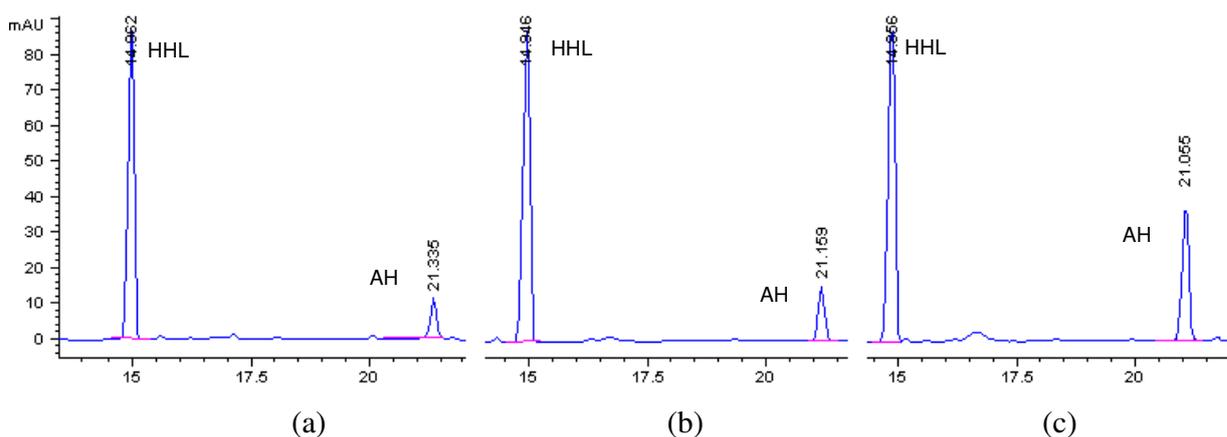
Para a escolha da metodologia a ser utilizada, foi realizado um estudo comparativo entre o método proposto por Shihabi (1999), com algumas modificações, e o proposto por Cushman e Cheung (1971), tradicionalmente empregado para este fim, devido à ausência de trabalhos empregando a eletroforese capilar em sistema modelo de inibição da ACE.

Para comparar os dois métodos, eletroforético e espectrofotométrico, o produto da reação entre a ACE e o HHL, o ácido hipúrico, foi analisado por eletroforese capilar através da injeção da mistura de reação, como proposto por Shihabi (1999), e por espectrofotometria após sua extração com acetato de etila, de acordo com o procedimento descrito no método de Cushman e Cheung (1971). A seqüência das análises seguiu o diagrama apresentado na Figura 28.



**Figura 28:** Comparação entre métodos para determinar a atividade da Enzima Conversora da Angiotensina.

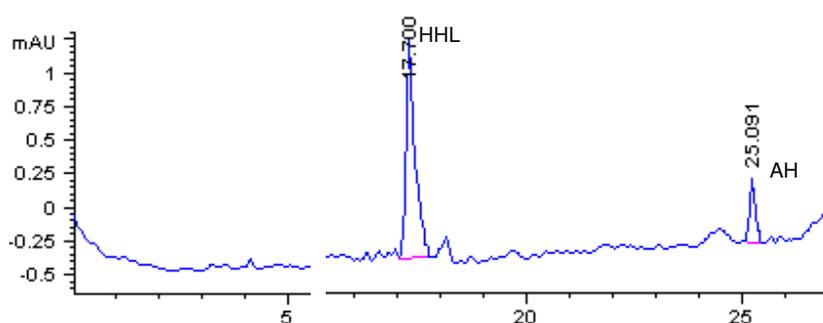
Na Figura 29 observa-se o efeito da utilização de concentrações crescentes da ACE na reação com o HHL, onde a utilização de 2,5, 5 e 10mU da ACE resultou na detecção do pico do ácido hipúrico (AH) com alturas de 11mAU, 27mAU e 58 mAU, respectivamente. Estes resultados referem-se à injeção direta da mistura de reação, sem extração prévia do produto, onde também pode ser observada a presença do substrato HHL.



**Figura 29:** Eletroferograma mostrando o efeito da incubação de concentrações crescentes da ACE sobre a formação do ácido hipúrico a partir do HHL, detectado por eletroforese capilar, (a) 2,5mU; (b) 5mU e (c) 10mU da ACE, por tubo de reação.

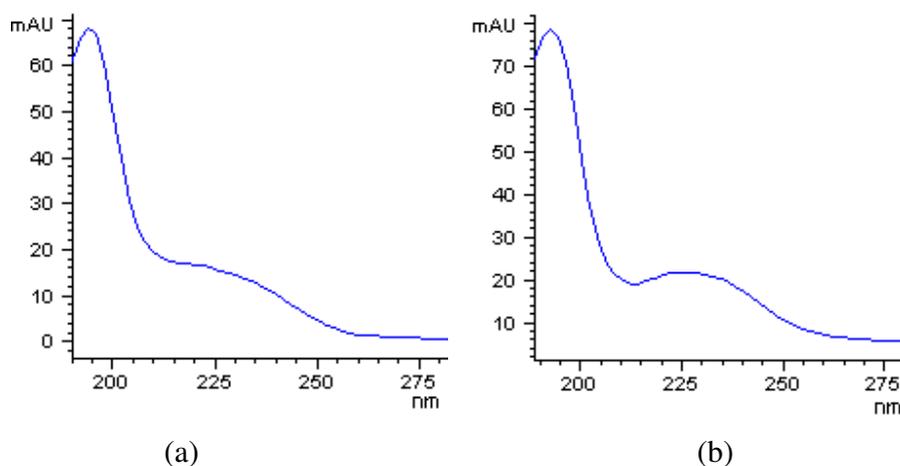
O eletroferograma do extrato aquoso da reação da ACE, obtido pelo método Cushman e Cheung (1971), está apresentado na Figura 30. A altura do pico correspondente ao ácido hipúrico

foi 0,41mAU, enquanto que, quando a mistura de reação foi analisada sem a extração prévia, o ácido hipúrico produzido pela mesma concentração enzimática apresentou uma altura de 25,5mAU. Na Figura 30 observa-se também a presença do HHL na mistura de reação, onde deveria ocorrer apenas a detecção do produto, já que foi realizada a prévia extração do ácido hipúrico pelo acetato de etila. Wu; Aluko e Muir (2002) também constataram a presença do substrato e do produto após a análise do extrato aquoso da reação por HPLC. Segundo estes autores, o HHL contribuiu com um aumento em 12% da absorbância total do extrato.



**Figura 30:** Eletroferograma mostrando a presença do HHL e ácido hipúrico (AH) após a etapa de extração do AH com acetato de etila.

De acordo com Cushman e Cheung (1971), o acetato de etila poderia extrair em torno de 1% do HHL presente na reação. Este fato pode ser crítico, pois o substrato e o produto apresentam espectros de absorção no UV similares, absorvendo no mesmo comprimento de onda, como mostra a Figura 31.



**Figura 31:** Espectros de absorção ultravioleta do AH (a) e HHL (b).

As soluções resultantes do processo de extração do ácido hipúrico com acetato de etila foram analisadas por espectrofotometria. Como mostra a Tabela 6, para oito medidas realizadas por espectrofotometria, o coeficiente de variação observado foi de 60%, contra 0,5% de variação na detecção do AH por eletroforese capilar, sem prévia extração (após seis repetições). Por estas razões, o método de injeção direta da mistura da reação mostrou-se uma técnica mais adequada para a determinação da atividade da ACE e medida de sua inibição.

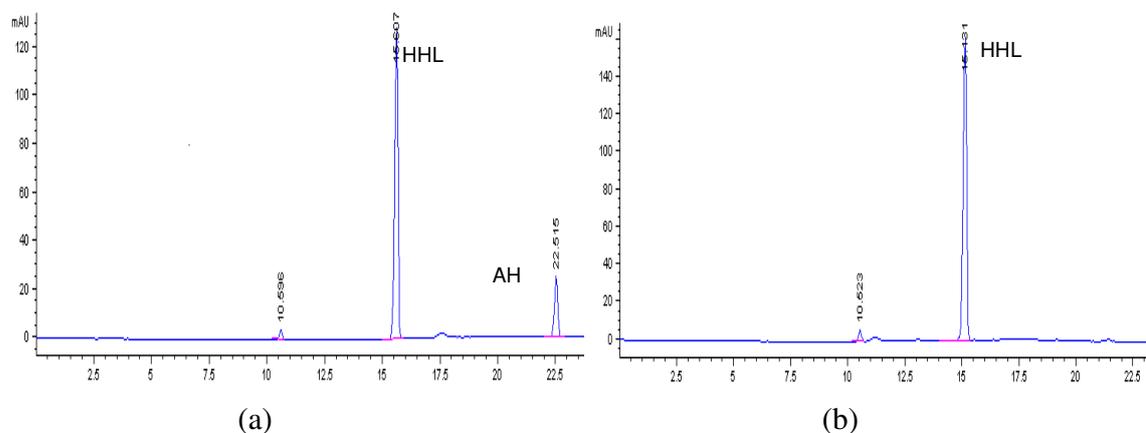
**Tabela 6:** Variação do ácido hipúrico determinado por eletroforese capilar, sem prévia extração da mistura de reação e por espectrofotometria após extração com acetato de etila.

Método	N	Leitura (228nm)	CV (%)
AH determinado por eletroforese capilar (altura do pico)	6	25,56 ± 0,13	0,52
AH determinado por espectrofotometria (absorbância)	8	0,45 ± 0,25	60,0

#### 4.3.2. Determinação da atividade ACE-inibitória dos hidrolisados

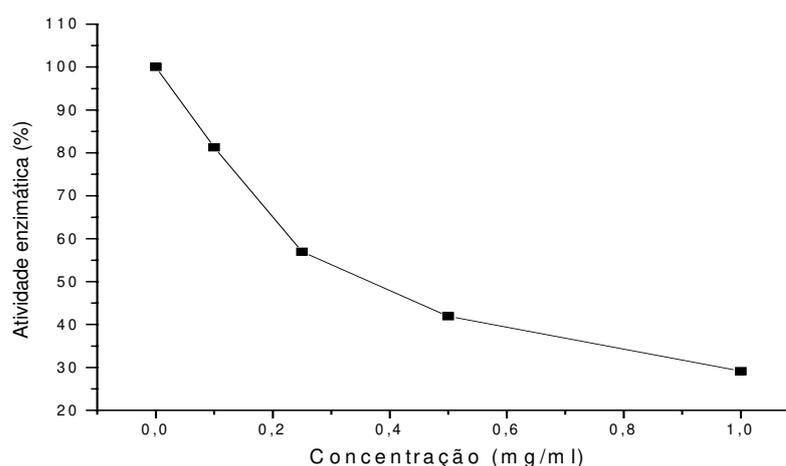
As condições utilizadas para a reação da ACE foram estabelecidas na Seção 4.3.1, com concentração da enzima fixa de 4mU. Para calcular a atividade inibitória dos hidrolisados, o ácido hipúrico formado durante a reação, sem a adição de qualquer inibidor, correspondeu à 100% da atividade enzimática.

A Figura 32 apresenta o eletroferograma onde se observa os picos do HHL e do ácido hipúrico presentes após a reação do HHL com a ACE, onde não houve adição de inibidor (Figura 32a), enquanto que, a adição de 10mg/mL do hidrolisado NQ à reação da ACE com o HHL, levou à completa inibição desta enzima, caracterizada pela ausência do ácido hipúrico (Figura 32b). Por outro lado, com a adição de 10mg/mL do IPSLN não se observou alterações na área do pico correspondente ao produto da reação.



**Figura 32:** Liberação do ácido hipúrico (AH) na ausência de inibidor da reação (a) e não-liberação de AH na presença de 10mg/mL do hidrolisado NQ.

A atividade inibitória da ACE foi calculada para todos os hidrolisados e expressa como valor  $IC_{50}$ , definido como a quantidade de hidrolisado em mg/mL necessária para inibir 50% da atividade enzimática. Para calcular o  $IC_{50}$  de cada um dos hidrolisados obtidos, foi construída uma curva de inibição, onde 100% da atividade enzimática correspondeu à área do ácido hipúrico formado sem adição do hidrolisado. A Figura 33 apresenta a curva de inibição do hidrolisado NQ. Observa-se que na medida em que concentrações crescentes deste hidrolisado foram adicionadas, houve diminuição da atividade enzimática.



**Figura 33:** Inibição da ACE em função da variação da concentração do hidrolisado NQ.

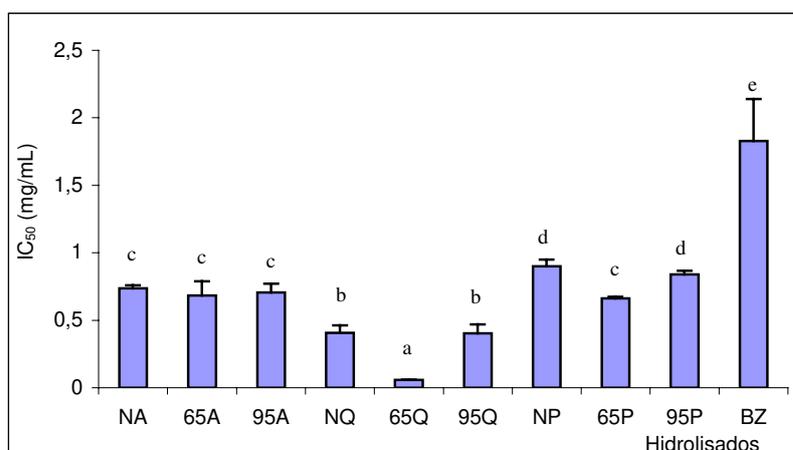
Todos os hidrolisados estudados apresentaram capacidade de inibir a ACE. A Figura 34 mostra os valores  $IC_{50}$  para os hidrolisados e para o Biozate. O hidrolisado 65Q apresentou um

perfil de inibição mais potente, com  $IC_{50}$  igual a 0,05mg/mL, seguido pelo 95Q ( $IC_{50}$  = 0,40mg/mL). O produto de menor atividade analisado foi o hidrolisado comercial Biozate, com o  $IC_{50}$  de 1,8mg/mL.

Os hidrolisados produzidos com Alcalase apresentaram atividade inibitória da ACE similares, com um valor  $IC_{50}$  em torno de 0,70mg/mL, independente do grau de desnaturação da proteína que deu origem ao hidrolisado. Acredita-se que a ampla especificidade apresentada por esta enzima a torne menos sensível às modificações estruturais assumidas pela proteína após as alterações pelo tratamento térmico.

Dentre os hidrolisados obtidos pela enzima Proteomix, o 65P apresentou maior atividade inibitória da ACE ( $IC_{50}$  = 0,66mg/mL), quando comparado aos outros hidrolisados obtidos com esta mesma enzima. Os hidrolisados NP e 95P apresentaram  $IC_{50}$  de 0,89mg/mL e 0,83mg/mL, respectivamente, sendo estes os hidrolisados produzidos de menor potência inibitória da ACE.

Os hidrolisados 65Q e 65P apresentaram atividade inibitória da ACE mais elevada do que os hidrolisados NQ e o NP, que são derivados da proteína nativa. A desnaturação parcial das proteínas do isolado tratado a 65°C pode ter facilitado a atuação das enzimas  $\alpha$ -quimotripsina e Proteomix na liberação de peptídeos inibidores da ACE. No entanto, não houve diferença estatística entre a atividade inibitória dos hidrolisados obtidos a partir da proteína nativa e tratada a 95°C.



**Figura 34:** Valor  $IC_{50}$  (mg/mL) obtido para os hidrolisados do IPSL e para o hidrolisado comercial Biozate. Letras iguais indicam mesmo nível de significância e letras diferentes indicam diferença estatística  $p < 0,05$  (teste T).

Os resultados obtidos contradizem alguns relatos da literatura que sobre a necessidade da utilização da proteína nativa para a produção de peptídeos com atividade biológica. De acordo com Meisel et al. (1998), a atividade biológica das proteínas do soro depende da manutenção da sua conformação nativa, forma na qual apresentam um maior potencial de funcionalidade fisiológica, pela composição de peptídeos que se formam durante a digestão no trato gastrointestinal. Segundo Smithers et al. (1996), não apenas o tratamento térmico, mas também o dano mecânico, podem reduzir drasticamente a atividade biológica das proteínas do soro, principalmente em relação a atividade estimulante do sistema imunológico.

Valores de  $IC_{50}$  comparáveis com os obtidos no presente estudo foram observados por Byun e Kim (2001) em extrato de gelatina hidrolisado pela Alcalase (0,84mg/mL), por Hyum e Shin (2000) na albumina do soro sanguíneo hidrolisada pela Alcalase (0,56mg/mL) e pela tripsina (0,89mg/mL), e por Wu e Ding (2002) para proteína de soja hidrolisada pela Alcalase (0,06mg/mL). Ainda não foi estabelecido um padrão que classifique a potência inibitória de hidrolisados ou peptídeos levando em consideração o valor  $IC_{50}$ . De forma arbitrária, alguns autores, como os citados acima, consideram que hidrolisados possuindo valores  $IC_{50}$  na faixa de 0,50mg/mL como inibidores de atividade moderada, enquanto aqueles que apresentaram  $IC_{50}$  abaixo 0,1 mg/mL, como hidrolisados de alta atividade inibitória da ACE.

#### **4.4. Atividade anti-hipertensiva *in vivo***

A Tabela 7 apresenta os resultados do efeito da administração oral dos hidrolisados na pressão arterial (PA) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Observa-se que o hidrolisado 65A foi o mais eficiente na redução da PA dos animais, induzindo uma redução significativa, de -19,06mmHg, após 2 horas, e de -14,9mmHg, após 4 horas, quando comparada à pressão basal média do grupo. Além disso, a redução da pressão arterial induzida pelo 65A foi estatisticamente igual aos resultados obtidos pelo grupo que recebeu a droga captopril. Os hidrolisados 95Q e NA induziram uma leve redução na pressão arterial significativa apenas por 2h após a administração oral. Os demais hidrolisados não se mostraram eficientes em reduzir a pressão arterial dos animais experimentais, de acordo com a metodologia utilizada.

**Tabela 7:** Variação da pressão arterial média de ratos SHR após administração oral de 0,5g/kg do IPSL hidrolisado com diferentes enzimas e tratamentos térmicos.

Hidrolisado	n**	PA basal	PA 2 h	PA 4 h
NQ	6	178,67 ± 5,3	178,89 ± 4,1	174,22 ± 2,9
65Q	6	178,66 ± 5,3	178,88 ± 4,1	184,88 ± 3,7
95Q	6	201,33 ± 4,9	187,73 ± 5,8*	189,73 ± 6,1
NP	6	206,13 ± 5,2	186,13 ± 3,9	189,33 ± 3,0
65P	6	192,53 ± 3,9	186,26 ± 7,1	181,86 ± 3,2
95P	6	199,47 ± 3,1	190,00 ± 2,3	204,27 ± 4,5
NA	6	198,40 ± 2,0	182,40 ± 1,3*	189,06 ± 4,2
65A	6	187,94 ± 3,6	168,88 ± 9,7*	173,00 ± 5,3*
95A	6	207,06 ± 3,0	194,13 ± 5,2	191,33 ± 5,1
Biozate	6	186,44 ± 6,1	179,77 ± 1,1	184,22 ± 2,9
captopril	9	196,149 ± 3,3	153,18 ± 2,9*	166,88 ± 2,4*
Água	9	194,74 ± 4,1	190,22 ± 2,7	190,51 ± 3,9

Resultados apresentados como média±erro padrão (\*p<0,05 vs respectiva PA basal; teste T);

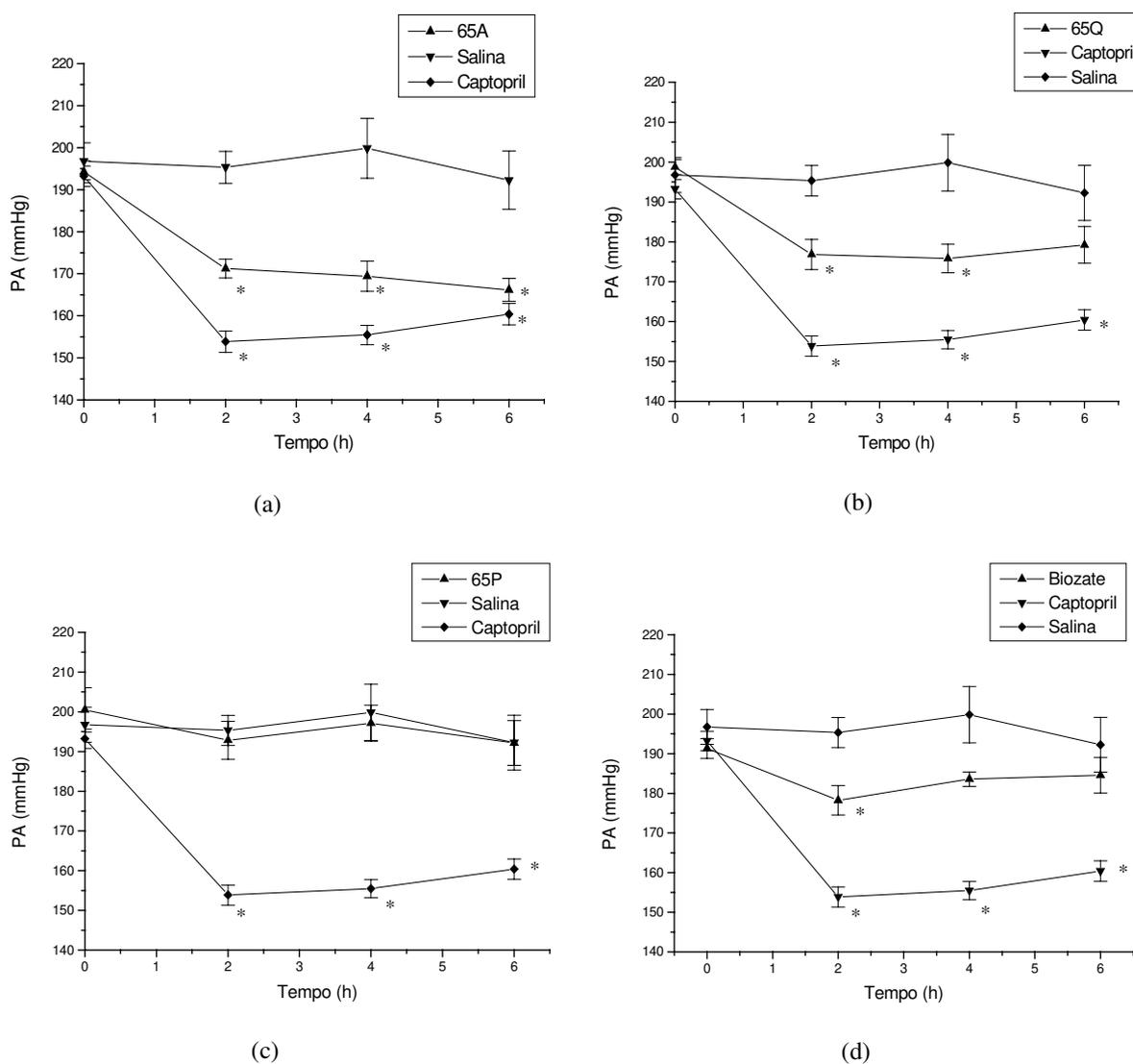
\*\* número de animais por grupo.

O hidrolisado 65A manifestou a melhor atividade anti-hipertensiva em ratos SHR, enquanto que o melhor efeito inibitório da ACE foi apresentado pelo hidrolisado 65Q. Suetsuna e Nakano (2000) também não obtiveram concordância entre a inibição da ACE e a redução da pressão arterial sistólica de ratos hipertensos após a administração de proteolisado de *Undaria pinnatifida*. Segundo estes autores, a falta de correlação entre a eficiência em inibir a ACE e a redução da pressão arterial *in vivo* ocorre porque nem sempre o peptídeo ou fração ativa do hidrolisado consegue ser absorvido integralmente, atingindo o sítio ou órgão alvo.

Alguns pesquisadores têm demonstrado o efeito anti-hipertensivo de hidrolisados ou peptídeos utilizando outras vias de administração além da oral, para evitar a possível hidrólise no trato gastrointestinal. Nurminen et al. (2000) administram um peptídeo derivado da  $\alpha$ -lactalbumina em ratos SHR por via subcutânea, observando uma redução dose-dependente na pressão arterial dos animais. Karaki et al. (1990) *apud* Pihlanto-Leppälä (2001) também demonstraram a redução da pressão arterial em SHR após administração intraperitoneal do hidrolisado trípico de caseína.

Entre os hidrolisados obtidos, os que apresentaram melhor atividade nos testes anteriores (*in vitro*), 65A, 65Q e 65P, foram administrados aos ratos SHR por via intraperitoneal. O hidrolisado comercial Biozate também foi utilizado para comparação.

Os resultados do efeito dos hidrolisados na pressão arterial (PA) dos ratos SHR, em comparação ao efeito da solução salina e da droga captopril após administração por via intraperitoneal, estão apresentados na Figura 35.



**Figura 35:** Comportamento da pressão arterial média de ratos SHR após injeção intraperitoneal do hidrolisado 65A (a), 65Q (b), 65P (c) e do hidrolisado comercial Biozate (d), em comparação com a injeção de solução salina e captopril ( $*p < 0,05$  vs PA basal, teste T). Resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

O hidrolisado 65A foi o produto que apresentou maior eficiência na redução da pressão arterial dos animais após administração pela via intraperitoneal (Figura 35a). A pressão arterial média do grupo foi reduzida de 194,2mmHg para 171,2mmHg após 2 horas da injeção intraperitoneal. Após 4 horas, a média do grupo foi de 169,4 mmHg. Após 6 horas, a tendência decrescente da pressão arterial permaneceu, com a média de 166,1mmHg. Estes resultados estão de acordo com os obtidos após a administração oral deste hidrolisado (Tabela 7), sendo que a administração pela via intraperitoneal resultou em um efeito mais intenso e prolongado, quando comparado ao efeito após a administração oral. Na Tabela 8 estão apresentados os valores de redução máxima de pressão arterial dos animais após a administração dos hidrolisados 65A, 65Q, 65P e Biozate, por via oral e intraperitoneal.

O hidrolisado 65Q apresentou o segundo melhor desempenho na redução da pressão arterial dos animais. Este hidrolisado induziu uma redução estatisticamente significativa em 2 e 4 horas após a administração por via intraperitoneal, partindo da pressão basal de 198,7mmHg para 176,8mmHg e 175,8mmHg, respectivamente. O efeito foi estatisticamente semelhante ao obtido pelo hidrolisado 65A até 4 horas após a injeção. A partir de 4 horas depois da administração do hidrolisado 65Q, a pressão arterial dos animais mostrou uma tendência à elevação, onde 6 horas após a administração a diferença não foi significativa, quando comparada à pressão basal do grupo (Figura 35b). Quando administrado aos animais por via oral, este hidrolisado não apresentou efeito hipotensor para os ratos SHR (Tabela 8).

O hidrolisado 65P não foi capaz de promover a redução da pressão arterial, tanto após administração oral quanto intraperitoneal. De forma menos pronunciada do que os dois hidrolisados de melhor desempenho in vivo, o hidrolisado comercial Biozate reduziu a pressão arterial dos animais de 191,3mmHg para 178,2mmHg, 2 horas depois da administração intraperitoneal. No entanto, não foram observadas diferenças significativas 4 ou 6 horas após a injeção intraperitoneal deste hidrolisado, quando comparado à pressão arterial basal do grupo. Quando administrado por via oral, o hidrolisado Biozate induziu uma redução não significativa da pressão arterial, de 186,44mmHg para 179,77, após 2horas e para 184,22mmHg, após 4 horas.

A máxima redução da pressão arterial dos ratos SHR induzida pelo hidrolisado 65A ocorreu seis horas após a injeção intraperitoneal, -28,1mmHg (Tabela 8). Este valor é superior ao obtido por Nurminen et al. (2000) para o peptídeo sintético,  $\alpha$ -lactofina, que foi de -23mmHg em torno de 50 minutos após a injeção subcutânea nos animais. Fujita et al. (1995) também obtiveram um resultado similar: redução de -22mmHg seis horas após administrar por via oral, *katsuobushi* hidrolisado aos ratos SHR.

**Tabela 8:** Redução máxima de pressão arterial observada após a administração dos hidrolisados aos ratos SHR.

Hidrolisado	Administração oral	Administração Intraperitoneal
65A	-19,0mmHg	-28,1mmHg
65Q	+0,22mmHg	-22,9mmHg
65P	-10,7mmHg	-7,7mmHg
Biozate	-6,9mmHg	-13,1mmHg

Como esperado, o medicamento captopril foi o mais eficiente entre os produtos administrados aos animais, induzindo uma redução na pressão arterial de 193,2mmHg para 153,8mmHg, 155,4mmHg e 160,4mmHg após 2, 4 e 6 horas da administração por via intraperitoneal, respectivamente. Por outro lado, na administração oral do medicamento captopril, a pressão arterial dos animais foi reduzida de 196,1mmHg para 153,1mmHg após 2 horas, e para 166,8mmHg após 4 horas.

A escolha da enzima adequada é um passo fundamental para a obtenção de peptídeos com atividade anti-hipertensiva. De acordo com Wu e Ding (2002), os inibidores preferenciais da ACE são aqueles peptídeos que contêm aminoácidos dicarboxílicos na posição N-terminal além de resíduos de aminoácidos com cadeia ramificada, como a valina e isoleucina. Segundo Yust et al (2003), é desejável que no lado C-terminal dos peptídeos estejam presentes os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, triptofano, tirosina, fenilalanina e prolina. De acordo com Mullally; Meisel e FitzGerald (1996), dados relacionando à estrutura e à atividade sugerem que a carga positiva ou o grupo guanidínio na porção C-terminal também contribua substancialmente para a potência ACE-inibitória de vários peptídeos.

As enzimas responsáveis pela produção dos hidrolisados de maior atividade *in vivo* e *in vitro*, no presente trabalho, foram a Alcalase e  $\alpha$ -quimotripsina, respectivamente. A primeira apresenta baixa especificidade, mas cliva preferencialmente os resíduos hidrofóbicos C-terminais e tem a vantagem de apresentar um baixo custo em relação às enzimas pancreáticas, já a  $\alpha$ -quimotripsina cliva preferencialmente os resíduos fenilalanina, tirosina e triptofano C-terminais (ADLER-NISSEN, 1986).

A mistura enzimática Proteomix, que é composta por  $\alpha$ -quimotripsina e tripsina, produziu hidrolisados com atividade inibitória da ACE inferior aos obtidos com o uso da enzima  $\alpha$ -quimotripsina. Estes hidrolisados também não demonstraram capacidade de reduzir a pressão arterial dos ratos SHR após administração oral ou intraperitoneal. Mullally, Meisel e FitzGerald (1997) analisaram a produção de hidrolisados inibidores da ACE derivados do concentrado protéico de soro pelas enzimas pepsina e tripsina de forma seqüencial e isolada. Os melhores resultados foram obtidos quando a tripsina foi utilizada de forma isolada. Em concordância com os resultados obtidos no presente trabalho, esses autores obtiveram um elevado índice de inibição da ACE quando hidrolisaram o concentrado protéico de soro com a  $\alpha$ -quimotripsina, demonstraram também que os peptídeos ativos deste hidrolisado foram liberados a partir da  $\beta$ -lactoglobulina.

Ao relacionar a distribuição de peso molecular dos hidrolisados obtidos com o valor  $IC_{50}$ , observou-se uma relação entre a maior eficiência em inibir a ACE e a presença de um maior percentual de peptídeos com peso molecular mais baixo. Os hidrolisados produzidos pela  $\alpha$ -quimotripsina, que apresentaram a maior concentração de peptídeos com baixo peso molecular, também apresentaram os menores valores  $IC_{50}$ , que corresponde a uma maior potência na inibição da ACE. Os hidrolisados produzidos pela Alcalase caracterizaram-se pela presença de peptídeos com massa inferior a 7kDa, e o  $IC_{50}$  médio para esse grupo foi de 0,70mg/mL. Enquanto os hidrolisados pela Proteomix foram os que apresentaram a maior concentração de peptídeos com massa em torno de 10kDa, tendo como  $IC_{50}$  médio 0,80mg/mL, o hidrolisado comercial Biozate apresentou a maior quantidade de proteínas não hidrolisadas e peptídeos de alto pelo molecular; seu  $IC_{50}$  foi de 1,8mg/mL. Nos experimentos *in vivo* este comportamento não foi observado, O hidrolisado mais eficiente em reduzir a pressão arterial dos animais foi o 65A,

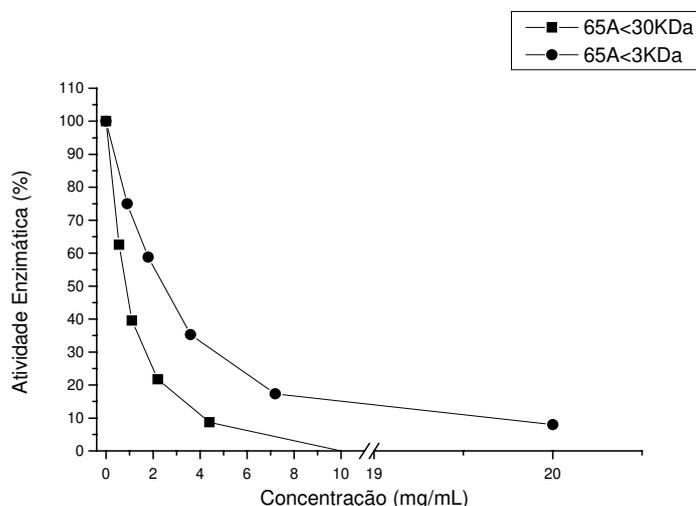
após administração oral e intraperitoneal, enquanto que, o hidrolisado que apresentou a segunda melhor atividade foi o 65Q, após administração por via intraperitoneal.

A diferença entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, administração por via oral, pode ter ocorrido devido à digestão final dos hidrolisados durante o trânsito pelo trato gastrintestinal, já que um dos principais requisitos para um determinado peptídeo manifestar seu efeito fisiológico é possuir resistência ao ataque enzimático. Embora, se a fração de maior atividade apresentar um elevado tamanho molecular também haverá diferença entre os resultados devido à dificuldade de absorver os peptídeos ativos.

#### **4.5. Fracionamento do hidrolisado 65A e atividade inibitória da ACE**

Para obter um indicativo da faixa de peso molecular da fração mais ativa, o hidrolisado 65A foi separado por ultrafiltração de duas formas: uma contendo peptídeos abaixo de 30kDa e a outra contendo peptídeos abaixo de 3kDa. Pesquisou-se então, a atividade inibitória da ACE nestes dois permeatos, como descrito anteriormente na seção 3.2.5.3.

A Figura 36 mostra as curvas de inibição da ACE pelos dois permeados. A inibição da atividade da ACE foi total quando o permeado da membrana de 30kDa foi adicionado à reação na concentração de 10mg/mL. Por outro lado, a solução com uma concentração de 20mg/mL do permeado da membrana com *cut off* de 3kDa, adicionado à reação, não foi capaz de inibir completamente a atividade da enzima.



**Figura 36:** Inibição da ACE *in vitro* em função da concentração das frações do hidrolisado 65A.

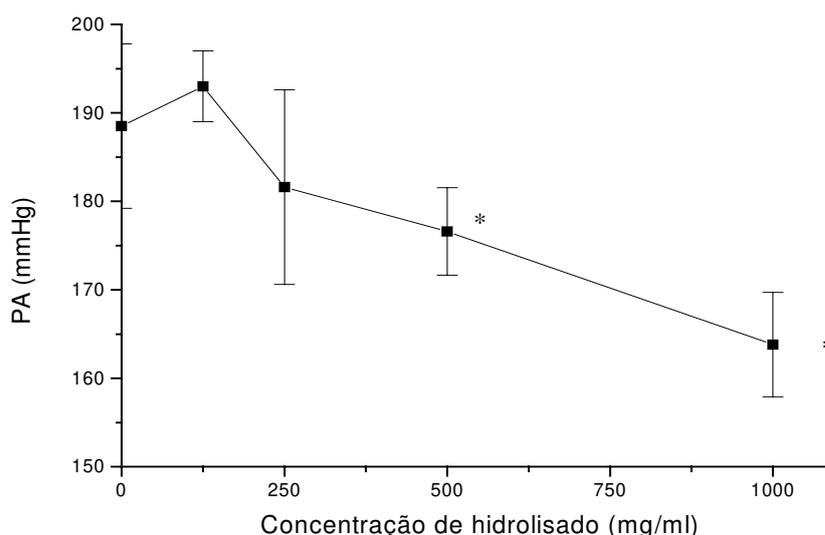
A ultrafiltração do hidrolisado 65A, em membrana de 3kDa, não resultou em aumento da atividade inibitória da ACE, ao contrário do observado por Gómez-Ruiz, Ramos e Recio (2002) e Mullally, Meisel e FitzGerald (1997) que verificaram um aumento da potência inibitória da ACE após o fracionamento dos hidrolisados das proteínas do soro de leite em membranas de 3kDa. No presente estudo, o permeado da membrana de 3kDa apresentaram o valor  $IC_{50}$  de 2,37mg/mL. Por outro lado, o permeado da membrana de 30kDa apresentou um  $IC_{50}$  de 0,75mg/mL, próximo ao obtido para o hidrolisado 65A integral, que foi de 0,68mg/mL. O fato do hidrolisado integral apresentar atividade mais alta do que os permeados, indica que a atividade inibitória da ACE pode ser resultante de um efeito somatório de todos os peptídeos inibidores presentes no hidrolisado. Autores como FitzGerald e Meisel, (1999; Hyun e Shin (2000); Wu e Ding (2002) relataram que os peptídeos mais ativos apresentam baixo peso molecular, com até 12 resíduos de aminoácidos.

No presente trabalho, o permeado da membrana com *cut off* de 3kDa apresentou atividade inibitória da ACE mais baixa do que o permeado da membrana com *cut off* de 30kDa e do que o hidrolisado 65A integral. A menor atividade inibitória da ACE observada no permeado da membrana com *cut off* de 3kDa, aliada a menor atividade anti-hipertensiva do hidrolisado integral após administração por via oral, sugere que a absorção dos peptídeos de maior atividade

seja facilitada após a administração intraperitoneal, via pela qual manteve seu efeito hipotensor em ratos SHR durante um período mais prolongado.

#### 4.6. Influência do hidrolisado 65A na função renal dos ratos espontaneamente hipertensos

Para avaliar a natureza dose-dependente da redução da pressão arterial pelo hidrolisado 65A e escolher a concentração de hidrolisado a ser administrada durante os experimentos de estudo do efeito sobre a função renal, foi construída uma curva dose-resposta. Foram injetadas nos animais, via intraperitoneal, soluções contendo de 0,125g/kg a 1,0g/kg de peso corporal. A medida da pressão arterial foi feita duas horas após a administração do hidrolisado aos animais. Os resultados estão apresentados na Figura 37.



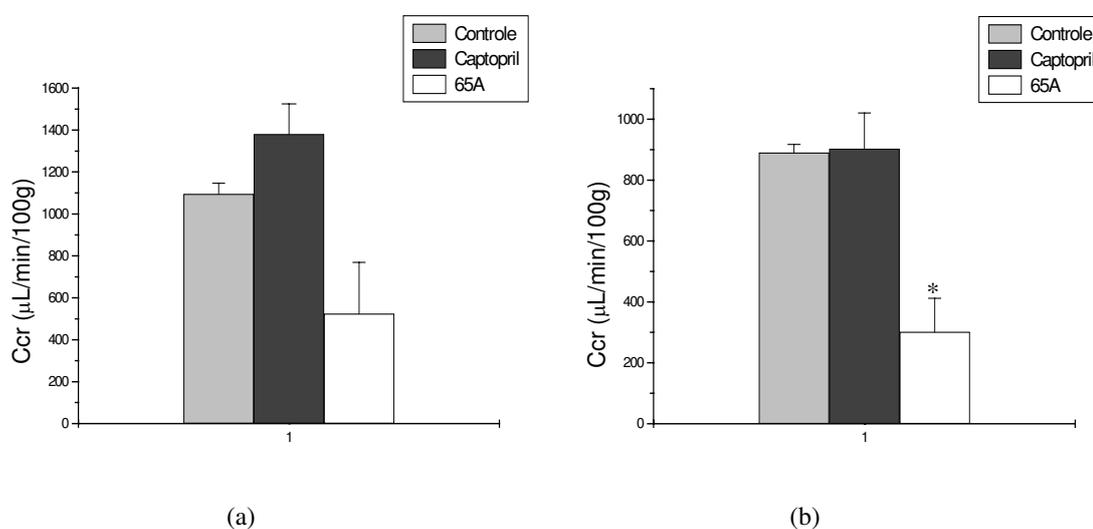
**Figura 37:** Curva dose-resposta da redução da PA em ratos espontaneamente hipertensos para o hidrolisado 65A, após injeção intraperitoneal (\* $p < 0,05$  vs PA basal, teste T).

As doses de 0,5g/kg e 1,0g/kg do hidrolisado 65A foram eficientes para reduzir a pressão arterial dos ratos SHR em 11,9mmHg e 24,7mmHg, respectivamente. Os resultados obtidos com doses inferiores não apresentaram diferença estatística em relação à pressão basal média ( $p < 0,05$ ). As doses mais efetivas na redução da pressão arterial foram utilizadas para estudar a influência do hidrolisado sobre a função renal dos animais.

Por definição a medida de depuração plasmática ou *clearance* renal de uma substância é o volume de plasma que é totalmente depurado da substância, por unidade de tempo. O lítio tem sido considerado um marcador adequado dos fluxos de água e sódio através do néfron, por ser livremente filtrado nos glomérulos; por sua reabsorção ser proporcional à reabsorção da água e do sódio; e por não modificar a função renal. O *clearance* de lítio trata-se de uma técnica simples que determina com precisão o fluxo iônico através dos túbulos renais, aplicável ao homem e a animais, fornecendo uma grande parte dos dados funcionais renais (KOOMANS, 1989).

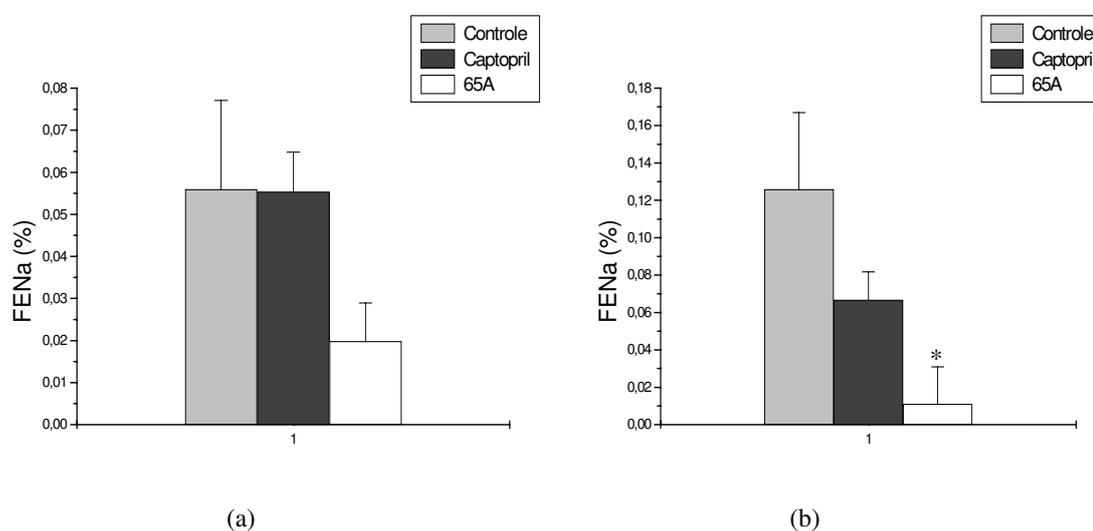
Para o cálculo do *clearance* de lítio, é necessário conhecer a taxa de filtração glomerular, que pode ser estimada pela medida de substâncias que não sejam nem reabsorvidas, nem secretadas pelos túbulos renais. Uma substância que atende a este critério é a creatinina, presente no plasma numa concentração relativamente constante, provavelmente por esta razão, seja o método mais amplamente utilizado para avaliar a filtração glomerular (GUYTON e HALL, 2001).

A Figura 38 apresenta os valores para o *clearance* de creatinina após a administração intraperitoneal de 0,5g/kg e 1,0g/kg do hidrolisado 65A. A administração do hidrolisado 65A resultou em decréscimo significativo na filtração glomerular: de 890,6 $\mu$ L/min/100g para 326,7 $\mu$ L/min/100g, após a administração intraperitoneal da dose de 1,0g/kg. Os resultados obtidos para o *clearance* de creatinina para o grupo que recebeu o medicamento captopril e hidrolisado 65A na dose de 0,5g/kg, não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle.



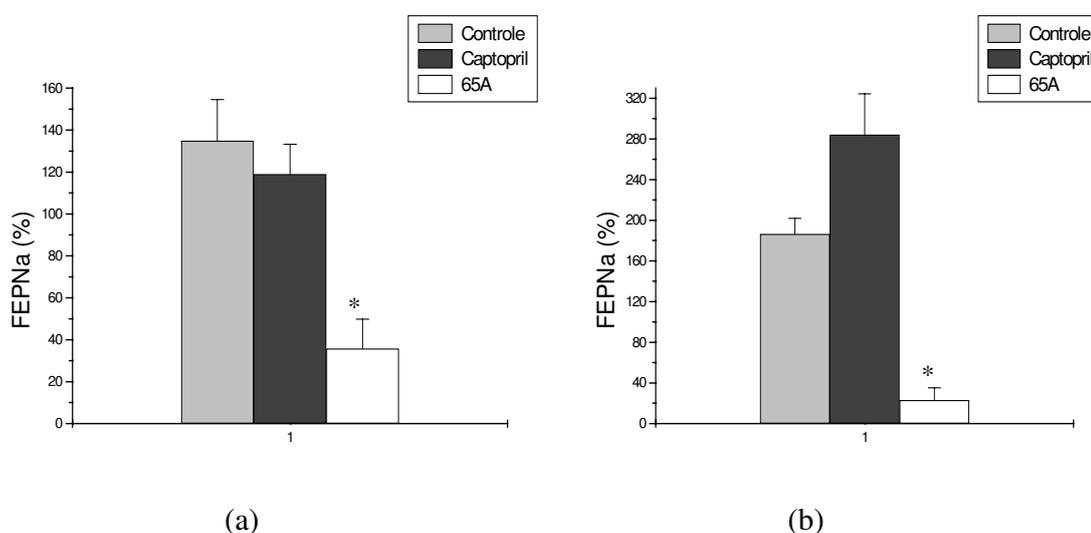
**Figura 38:** Taxa de filtração glomerular estimada pelo *clearance* de creatinina após a administração do hidrolisado nas doses de 0,5g/kg (a) e 1,0g/kg (b) (\* $p < 0,05$  versus Controle, test T).

Após a administração de 0,5g/kg do hidrolisado 65A, não se observou diferença em relação à excreção urinária de sódio (FENa) entre os grupos (Figura 39a). Redução significativa e acentuada foi observada após a administração de 1,0g/kg deste hidrolisado (Figura 39b).



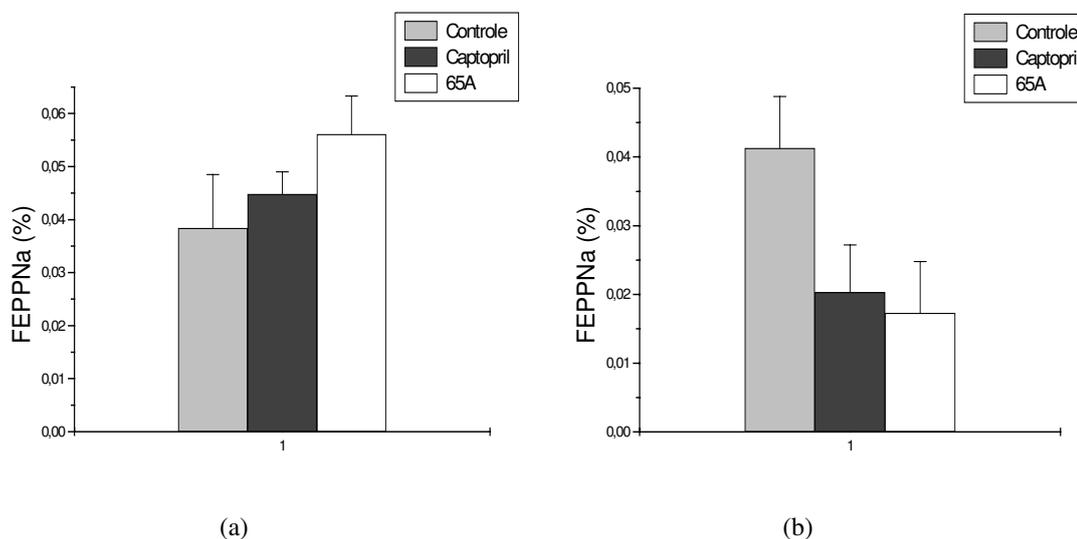
**Figura 39:** Fração de excreção de sódio após a administração de 0,5g/kg (a) e 1,0g/kg (b) do hidrolisado (\* $p < 0,05$  versus Controle, teste T).

As doses de 0,5g/kg e 1,0g/kg do hidrolisado 65A promoveram uma redução significativa da fração de excreção proximal de sódio (FEPNa) quando comparadas ao grupo controle (Figura 40).



**Figura 40:** Fração de excreção proximal de sódio após a administração de 1,0g/kg (a) e 0,5g/kg (b) do hidrolisado 65A (\* $p < 0,05$  versus Controle, test T).

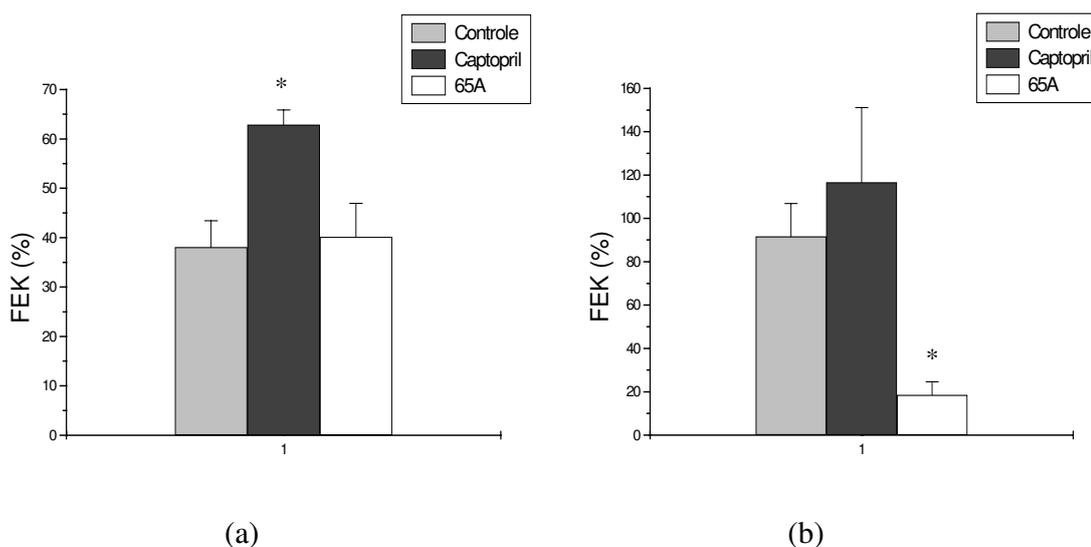
A Figura 41 apresenta os resultados da fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa). Neste caso, o medicamento captopril e o hidrolisado 65A não foram capazes de promover alterações significativas neste parâmetro em relação ao resultado do grupo controle que recebeu solução salina.



**Figura 41:** Fração de excreção pós-proximal de sódio após a administração de 0,5g/kg (a) e 1,0g/kg (b) do hidrolisado 65A.

A Figura 42 apresenta a fração de excreção de potássio (FEK), observa-se que a dose de 0,5g/kg de hidrolisado 65A não promoveu alterações significativas quando comparada ao grupo

controle. Apenas a dose de 1,0g/kg causou uma redução significativa na excreção deste eletrólito, ao passo que com o medicamento captopril, houve uma tendência ao aumento da excreção do potássio. A tendência de aumento na excreção urinária do potássio pode, em parte, ser explicada como consequência de um aumento da reabsorção distal de sódio através da membrana transluminal (GUYTON e HALL, 2001).



**Figura 42:** Fração de excreção de potássio após a administração de 0,5g/kg (a) e 1,0g/kg (b) do hidrolisado (\* $p < 0,05$  versus Controle, teste T)

A redução significativa e dose-dependente da pressão arterial dos ratos SHR após a administração do hidrolisado 65A, promoveu uma redução na taxa de filtração glomerular, determinada pelo *clearance* de creatinina, quando comparada ao grupo controle. Efeito semelhante sobre o *clearance* de creatinina e a pressão arterial, foi reportado por Kavgaci et al. (2002) após o tratamento de indivíduos com os medicamentos inibidores da ACE, losartan e fosinopril e por Yamada et al. (2002), ao avaliarem o efeito de um análogo da prostaciclina na inibição progressiva da disfunção renal em ratos.

O decréscimo da filtração glomerular pode estar relacionado a uma queda no fluxo sanguíneo renal em resposta à redução da pressão arterial induzida pelo hidrolisado 65A. Por sua vez, a redução no fluxo sanguíneo renal pode ter promovido o aumento da reabsorção do sódio pela elevação da pressão coloidosmótica. Tendo em vista estes aspectos, os dados obtidos indicam que houve interferência de mecanismos tubulares na conservação de sódio e água, o que

resultaria em uma resposta anti-natriurética compensatória dos segmentos distais do néfron em resposta à diminuição da pressão arterial induzida pelo hidrolisado 65A (GUYTON e HALL, 2001), sendo necessário avaliar o efeito do hidrolisado a longo prazo e a provável utilização deste produto em conjunto com medicamentos natriuréticos.

Não foram encontrados relatos de trabalhos com pesquisa da interferência de hidrolisados ou peptídeos derivados de proteínas alimentares na função renal humanos ou ratos.

## 5. Conclusões

As principais conclusões obtidas no presente trabalho estão descritas a seguir:

- ✦ O tratamento térmico a 65°C resultou na desnaturação parcial das proteínas do IPSL. Neste tratamento a  $\beta$ -Lg não sofreu perda de solubilidade. O tratamento térmico a 95°C resultou na desnaturação total das proteínas do IPSL. Houve perda na solubilidade da  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La, sendo que a  $\alpha$ -La foi mais afetada, também ocorreu a diminuição da concentração de grupos SH livres que indica a formação de agregados protéicos;
- ✦ Os hidrolisados obtidos apresentaram características físico-químicas diferentes em função do grau de desnaturação do IPSL e do tratamento enzimático. De um modo geral, os hidrolisados obtidos de isolados desnaturados apresentaram maior concentração de peptídeos de baixa hidrofobicidade. A distribuição de peso molecular dos hidrolisados obtidos do IPSL desnaturado a 95°C mostrou a ausência de um pico presente nos perfis cromatográficos dos hidrolisados derivados do isolado nativo ou desnaturado a 65°C, na região de 1kDa;
- ✦ Dentre as enzimas utilizadas, a  $\alpha$ -quimotripsina produziu hidrolisados contendo peptídeos de mais baixo peso molecular, enquanto que o emprego da Alcalase resultou em hidrolisados com maior concentração de peptídeos de alta hidrofobicidade. A hidrólise com Proteomix resultou na formação de peptídeos com peso molecular em torno de 9kDa, independente do tratamento térmico prévio, aplicado ao isolado;
- ✦ Independente da enzima utilizada, a desnaturação parcial do isolado a 65°C, prévia à hidrólise, resultou em hidrolisados com maior atividade inibitória da ACE enquanto que a desnaturação total do isolado (tratado a 95°C) não implicou em hidrolisados com menor da atividade, quando comparados aos hidrolisados provenientes do isolado nativo;
- ✦ A  $\alpha$ -quimotripsina foi a enzima que produziu hidrolisados com maior atividade inibitória da ACE, enquanto que a Proteomix produziu os hidrolisados com menor atividade;

- ☛ O único hidrolisado eficiente em reduzir a pressão arterial dos ratos espontaneamente hipertensos, após a administração por via oral, foi o 65A, obtido com a Alcalase a partir do isolado desnaturado a 65°C;
- ☛ A administração dos hidrolisados por via intraperitoneal demonstrou que o hidrolisado mais eficiente em inibir a atividade da ACE, o hidrolisado 65Q também foi capaz de reduzir significativamente a pressão arterial desses animais;
- ☛ O hidrolisado obtido com a Alcalase a partir do isolado desnaturado a 65°C (65A) teve sua atividade anti-hipertensiva acentuada após a administração intraperitoneal. Este hidrolisado induziu uma redução na filtração glomerular dos animais, provavelmente devido a um efeito vasodilatador e desencadeou a atuação de mecanismos auto-reguladores de conservação de íons e fluidos corporais, evidenciados pelo aumento na reabsorção do sódio. É provável que este hidrolisado, como produto anti-hipertensivo, tenha aplicação em conjunto com a administração de diuréticos;
- ☛ Por se tratar do produto de melhor atividade anti-hipertensiva, o hidrolisado obtido com a Alcalase, a partir do isolado desnaturado a 65°C, foi ultrafiltrado em membranas de 3kDa e 30kDa. O permeato proveniente da membrana com *cut off* de 3kDa apresentou uma atividade inibitória da ACE mais baixa do que o permeato da membrana com *cut off* de 30kDa e o hidrolisado integral, indicando que os peptídeos de maior atividade apresentam peso molecular mais elevado.
- ☛ O mecanismo pelo qual o hidrolisado 65A induz a diminuição da pressão arterial nos ratos SHR não é o mesmo pelo qual atua a droga captopril.

De forma geral, concluiu-se que o tratamento térmico e enzimático das proteínas do soro de leite influem na obtenção de hidrolisados com atividade anti-hipertensiva. O isolado protéico tratado a 65°C, parcialmente desnaturado, e hidrolisado com Alcalase resultaram em um produto com maior atividade, quando comparado aos produtos obtidos de proteínas nativas ou totalmente desnaturadas hidrolisadas com Alcalase,  $\alpha$ -quimotripsina e Proteomix.

## **6. Contribuições e Perspectivas Futuras**

Este trabalho traz como principal contribuição a avaliação do impacto do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados passíveis de serem utilizados como alimento ou ingrediente funcional, coadjuvantes no controle da hipertensão arterial.

Com a comprovação da atividade biológica dos hidrolisados nos animais experimentais, este trabalho abre caminho para a aplicação do isolado protéico de soro, previamente desnaturado e hidrolisado pela Alcalase, como ingrediente anti-hipertensivo. Para isto, é necessário ainda a realização de estudos complementares, tais como:

- ☛ Avaliação da atividade anti-hipertensiva a longo prazo nos animais experimentais para pesquisar a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos, provocados pelo hidrolisado;
- ☛ Avaliação da resistência do hidrolisado às enzimas do trato gastrointestinal em experimentos *in vitro* e *in vivo*;
- ☛ Utilização de técnicas de purificação e identificação da fração de maior atividade, bem como, a investigação de seus mecanismos de ação;
- ☛ Avaliação da estabilidade da atividade biológica do hidrolisado, na presença de sistemas contendo carboidratos e lipídeos;
- ☛ Avaliação da vida de prateleira do hidrolisado de atividade anti-hipertensiva;
- ☛ Desenvolvimento de alimentos funcionais, com características sensoriais adequadas, contendo o hidrolisado anti-hipertensivo;
- ☛ Avaliação da eficácia do hidrolisado em estudos clínicos com humanos.

## Referências Bibliográficas

ABUBAKAR, A.; SAITO, T.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; ITOH, T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.12, p.3131-3138, 1998.

ACTON, G. H. The determination of lactose in cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.32, n.3, p.111, 1977.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier Applied Science Publishers Ltd., 1986, 426.

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, n.6, p.1256-1262, 1979.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL METHODS ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**. 15. ed. Washington: D.C., 1990. 1141 p.

BARUCHEL, S.; VIAU, G.; OLIVIER, R.; BOUNOUS, G.; WAINBERG, M. A. Nutraceutical modulation of glutathione with a humanized native milk serum protein isolate, Immunocal™: application in AIDS and cancer. In: **Oxidative Stress in Cancer, AIDS, and Neurodegenerative Diseases**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998, cap.42. p.477-549.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.7, p.565-598, 1998.

BELLO, J. Los alimentos funcionales o nutraceuticos. I Nueva gama de productos en la industria alimentaria. **Alimentaria**, v.32, n.265, p.25-30, 1995.

BEVERIDE, T.; JONES, L.; TUNG, M. A. Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soy, and albumen protein gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.32, n.2, p.307-313, 1984.

BYUN, H.; KIM, S. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. **Process Biochemistry**, v.36, n.12, p.1155-1162, 2001.

CHABANCE, B.; MARTEAU, P.; RAMBAUD, J. C.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; BOYNARD, M.; PERROTIN, P.; GUILLET, R.; JOLLÈS, P.; FIAT, A. M. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. **Biochimie**, v.80, n.2, p.155-165, 1998.

CHABANET, C. Prediction of peptide retention time in reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.599, n.1-2, p.211-225, 1992.

CHAPLIN, L. C.; LYSTER, R. L. J. Irreversible heat denaturation of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. **Journal of Dairy Research**, v.53, n.2, p.249- , 1986.

CHEVIRON, N.; ROUSSEAU-PLASSE, A.; LENFANT, M.; ADELIN, M. T.; POTIER, P.; THIERRY, J. Coumarin-Ser-Asp-Lys-Pro-OH, a fluorescent substrate for determination of angiotensin-converting enzyme activity via high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.280, n.1, p.58-64, 2000.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Sciences e Technology**, v.11, n.7, p.254-262, 2000.

CONROY, J. M.; LAI, C. Y. A rapid and sensitive fluorescence assay for angiotensin-converting enzyme. **Analytical Biochemistry**, v.87, n. , p.556-561, 1978.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, v.20, n.7, p.1637-1648, 1971.

DE CASTRO, L. N.; TIMMIS, J. **Artificial Immune Systems: A New Computational Intelligence Approach**. London: Springer, 2002. p.357.

DE FELICE, S. L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, n.2, p.59-61, 1995.

DYBING, S. T.; SMITH, D. E. Relation of chemistry and processing procedures to whey protein functionality: a review. **Cultured Dairy Products Journal**, v.26, n.1, 1991.

ERDOGDU, N.; CZUCHAJOWSKA, Z.; POMERANZ, Y. Wheat flour and defatted milk fractions characterized by differential scanning calorimetry. **Cereal Chemistry**, v.72, n.1, p.70-75, 1995.

FACON, M. J.; SKURA, B. J. Antibacterial activity of lactoferricin, lysozyme and EDTA against *Salmonella enteritidis*. **International Dairy Journal**, v.6, n.3, p.303-313, 1996.

FITZGERALD, R. J.; MEISEL, H. Lactokinins: whey protein-derived ACE-inhibitory peptides. **Narung**, v.43, n.3, p.165-167, 1999.

FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. Availability, storage, treatment, composition and feeding value of surplus colostrums: a review. **Journal of Dairy Science**, v.61, n.8, p.1033-1060, 1978.

FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. The development and application of capillary electrophoresis methods for food analysis. **Electrophoresis**, v.20, n. , p.3156-3180, 1999.

FUGLSANG, A.; NILSSON, D.; NYBORG, N. C. B. Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.7, p.3560-3569, 2002.

FUJITA H.; YOKOYAMA; K., YASUMOTO R.; YOSHIKAWA, M. Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, suppl.1, p.304-305, 1995.

FUJITA H.; YOSHIKAWA, M. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. **Immunopharmacology**, v.44, n.1-2, p.123-127, 1999.

FUJITA H.; YOKOYAMA; YOSHIKAWA, M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. **Journal of Food Science**, v.65, n.4, p.564-569, 2000.

FUJITA H.; YAMAGAMI, T.; OHSHIMA, K. Effects of a ace-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. **Nutrition Research**, v.21, n.8, p.1149-1158, 2001.

GÓMEZ-RUIZ, J. A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in manchego cheese manufactured with different starter cultures. **International Dairy Journal**, v.12, n.8, p.697-706, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 10ed. Phyladelphia: Saunders, 2001. 1064p.

HAILESELAASSIE, S. S.; LEE, B. H.; GIBBS, B. F. Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.8, p.1612-1617, 1999.

HATA, Y.; YAMAMOTO, M.; OHNI, M.; NAKAJIMA, K.; NAKAMURA, Y. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.64, n.5, p.767-771, 1996.

HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Characterization of heat-induced aggregates of  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment. **Journal of Dairy Research**, v.68, n.3, p.483-497, 2001.

HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Formation of new protein structures in heated mixtures of BSA and  $\alpha$ -lactalbumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.5, p.1548-1556, 2000.

HAYAKAWA, I.; KAJIHARA, J.; MORIKAWA, K.; ODA, M.; FUJIO, Y. Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin by high pressure, heat and chemicals. **Journal of Food Science**, v.57, n.2, p.288-292, 1992.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; RAMOS, M.; AMIGO, L. Preparation of ovine and caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. **International Dairy Journal**, v.12, n.10, p.805-812, 2002.

HOLMQUIST, B.; BÜNNING, P.; RIORDAN, J. F. A continuous spectrophotometric assay for angiotensin-converting enzyme. **Analytical Biochemistry**, v.95, n.2, p.540-548, 1979.

HONG-, Y., CREAMER, L. K. Changed protein structures of bovine  $\beta$ -lactoglobulin B and  $\alpha$ -lactalbumin as a consequence of heat treatment. **International Dairy Journal**, v. 12, n.4, p.345-359, 2002.

HORIUCH, M.; FUJIMURA, K.; TERASHIMA, T.; ISO, T. Method for determination of angiotensin-converting enzyme activity in blood and tissue by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.233, n.1, p.123-130, 1982.

HYUN, C. K.; SHIN, H. K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Process Biochemistry**, v.36, n.1-2, p.65-71, 2000.

JU, Z. Y.; HETTIARACHCHY, N.; KILARA, A. Thermal properties of whey protein aggregates. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.9, p.1882-1889, 1999.

KADHARMESTAN, C.; BAIK, B. K.; CZUCHAJOWSKA, Z. Thermal behavior of whey protein concentrate treated by heat and high hydrostatic pressure and its functionality in wheat dough. **Cereal Chemistry**, v.75, n.6, p.785-791, 1998.

KAHLON, T. S.; WOODRUFF, C. L. In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten. **Food Chemistry**, v.79, n.4, p.425-429, 2002.

KAVGACI, H.; SAHIN, A. H.; ERSOZ, O.; EREM, C.; OZDEMIR, F. The effects of losartan and fosinopril in hypertensive type 2 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.58, n.1, p. 19-25, 2002.

KAYSER, H.; MEISEL, H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. **FEBS Letters**, v.383, n.1-2, p.18-20, 1996.

KIM, Y. K.; YOON, S.; YU, D. Y.; LÖNNERDAL, B.; CHUNG, B. H. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human  $\alpha_{S1}$ -casein expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Research**, v.66, n.3, p.431-439, 1999.

KINOSHITA, E.; YAMAKOSHI, J.; KIKUCHI, M. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.57, n.7, p.1107-1110, 1993.

KINSELLA, J. E.; WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: Chemical, physical, and functional properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.33, n. , p.343-437, 1990.

KOOMANS, H. A.; BOER, W. H.; MEES, E. J. D. Evaluation of lithium clearance as a marker of proximal tubule sodium handling. **Kidney International**, v.36, n.1, p.2-12, 1989.

KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; RANTAMÄKI, P.; TUPASELA, T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, n.8-9, p.307-319, 1998.

LA FUENTE, M. A.; HEMAR, Y.; TAMEHANA, M.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Process-induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. **International Dairy Journal**, v.12, n.4, p.361-369, 2002.

LA FUENTE, M. A.; SINGH, H.; HEMAR, Y. Recent advances in the characterization of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, n.8, p.262-247, 2002.

LAW, A. J. R.; LEAVER, J. Factors affecting the heat denaturation of whey proteins in cows' milk. **International Dairy Journal**, v.9, n.3-6, p.407-408, 1999.

LEGAY, C.; POPINEAU, Y.; BÉROT, S.; GUÉGUEN, J. Comparative study of enzymatic hydrolysis of  $\alpha/\beta$ - and  $\gamma$ -gliadins. **Narung**, v.41, n.4, p.201-207, 1997.

LI-CHAN, E. Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrate. **Journal of Food Science**, v.48, n.1, p.47-56, 1983.

LEE, S.; MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH. **Journal of Food Science**, v.57, n.5, p.1210-1213, 1992.

LIMA, P. D. Synthesis of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors: an important class of antihypertensive drugs. **Química Nova**, v.22, n.3, p.375-381, 1999.

LOPES-FANDIÑO, R.; CARRASCOSA, A. V.; OLANO, A. The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. **Journal Dairy Science**, v.79, n.6, p.929-936, 1996.

LOVENBERG, W. Techniques for the measurement of blood pressure. **Hypertension**, v.9, n.1, p.5-6, 1987 (Suppl. 1).

MARTIN, D. S. Dietary protein and hypertension: where do we stand? **Nutrition**, v.19, n.4, p.385-389, 2003.

MARUYAMA, S.; NAKAGOMI, K.; TOMIZUKA, N.; SUZUKI, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.49, n.5, p.1405-1409, 1985.

MARUYAMA, S.; SUZUKI, H. A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.46, n.5, p.1393-1394, 1982.

MATSUMURA, Y.; MITSUI, S.; DICKINSON, E.; MORI, T. Competitive adsorption of  $\alpha$ -lactalbumin in the molten globule state. **Food Hydrocolloids**, v.8, n.6, p.555-566, 1994.

MEHANNA, A. S.; DOWLING, M. Liquid chromatographic determination of hippuric acid for the evaluation of ethacrinic acid as angiotensin converting enzyme inhibitor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.19, n.6, p.967-973, 1999.

MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, v.8, n.5/6, p.363-373, 1998.

MEISEL, H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. **Biopolymers**, v.43, n.2, p.119-128, 1997.

MEISEL, H.; GOEPFERT, A.; GÜNTHER, S. ACE-inhibitory activities in milk products. **Milchwissenschaft**, v.52, n.6, p.307-311, 1997.

MILLS, E. N. C.; ALCOCER, M. J. C.; MORGAN, M. R. A. Biochemical interactions of food-derived peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v.3, n., p.64-68, 1992.

MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v.50, n.6, p.1715-1718, 1985.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. **International Dairy Journal**, v.7, n.5, p.299-303, 1997.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Synthetic peptides corresponding to  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. **Biological and Biochemical Hoppe-Seyler**, v.377, n.4, p.259-260, 1996.

MUTILANGI, W. A. M.; PANYAM, D.; KILARA, A. Hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey proteins. **Journal of Food Science**, v.60, n.5, p.1104-1109, 1995.

NAKAMURA, Y.; YAMAMOTO, N.; SAKAI, K.; TAKANO, T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.6, p.1253-1257, 1995.

NURMINEN, M. L.; SIPOLA, M.; KAARTO, H.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; PIIOLA, K.; TOSSAVAINEN, O.; KORHONEN, H.; VAPAATALO, H.  $\alpha$ -Lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive rats and spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v.66, n.16, p.1535-1543, 2000.

PAKKANEN, R.; AALTO, J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. **International Dairy Journal**, v.7, n5, p. 285-297, 1997.

PARK, K. H.; LUND, D. B. Calorimetric study of thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n.8, p.1699-1706, 1984.

PELLEGRINI, A.; THOMAS, U; VONFELLENBERG, R; WILD, P. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against gram-negative and gram-positive bacteria related to their basic character. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, n.3, p.180-187, 1992.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Biocative peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, n.9-10, p.347-356, 2001.

PINTATO, M. E.; MALCATA, F. X. Effect of thermal treatment on the protein of whey from ovine and caprine milk throughout lactation. **International Dairy Journal**, v.6, n.5, p.497-518, 1996.

RAMOS, L. R.; MIRANDA, R. D. Impacto epidemiológico da hipertensão arterial sistólica isolada no idoso, **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.6, n.4, p.370-375, 1999.

RELKIN, P. Thermal unfolding of  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, n.6, p.565-601, 1996.

RELKIN, P.; LAUNAY, B.; EYNARD, L. Effect of sodium addition on thermal denaturation of apo- $\alpha$ -lactalbumin: a differential scanning calorimetric study. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.1, p.36-47, 1993.

RELKIN, P.; LAUNAY, B. Concentration effect on the kinetics of  $\beta$ -lactoglobulin heat denaturation: a differential scanning calorimetric study. **Food Hydrocolloids**, v.4, n.1, p.19-32, 1990.

RIHÄNEM, E. L.; PIHLÄNTO-LEPPÄLÄ, A.; PAHKALA, E. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. **International Dairy Journal**, v.11, n.4-7, p.441-447, 2001.

RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo – Perspectivas e proteção ao meio ambiente. **Food Ingredients**, v. , n.2, p.20-27, 2002.

ROKKA, T.; SYVÄOJA, E.; TUOMINEN, J.; KORHONEN, H. Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk. **Milchwissenschaft**, v.52, n.12, p.675-677, 1997.

ROY, M. K.; WATANABE, Y.; TAMAI, Y. Yeast pretease B-digested skimmed milk inhibits angiotensin-I-converting enzyme activity. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.31, n.4, p.95-100, 2000.

SAITO, H.; MIYAKAWA, H.; TAMURA, Y.; SHIMAMURA, S.; TOMITA, M. Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat-treatment at acidic pH. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.11, p.3724-3730, 1991.

SAWYER, L.; BARLOW, P. N.; BOLAND, M. J.; CREAMER, L. K.; DENTON, H.; EDWARDS, P. J. B.; HOLT, C; JAMESON, G. B.; KONTOPIDIS, G.; NORRIS, G. E.; UHRÍNOVÁ, S.; WU, S. Milk protein structure – what can it tell the dairy industry? **International Dairy Journal**, v.12, n.4, p.299-310, 2002.

SEPPO, L.; KEROJOKI, O.; SUOMALAINEN, T.; KORPELA, R.; The effect of a *Lactobacillus helveticus* LKB-16 H fermented milk on hypertension – a pilot study on humans. **Milchwissenschaft**. v.57, n.3, p.124-127, 2002.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações. São Paulo, 1996. Varela, 517p.

SHIHABI, Z. K. Analysis of angiotensin-converting enzyme by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.853, n.1-2 , p.185-188, 1999.

SHIMIZU, M. Modulation of intestinal functions by food substances. **Narung**, v.43, n.3, p.154-158, 1999.

SIPOLA, M.; FINCKENBERG, P.; VAPAATALO, H.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; KORHONEN, H.; KORPELA, R.; NURMINEN, M. L.  $\alpha$ -Lactorphin and  $\beta$ -lactorphin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v.71, n.11, p.1245-1253, 2002a.

SIPOLA, M.; FINCKENBERG, P.; VAPAATALO.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H.; NURMINEN, M. L. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. **Journal of Dairy Research**, v.69, n.1, p.103-111, 2002b.

SMITHERS, G. W.; BALLARD, F. J.; COPELAAND, A. D.; DE SILVA, K. J.; DIONYSIUS, D. A.; FRANCIS, G. L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P. A.; MCINTOSH, G. H.; MITCHELL, I. R.; PEARCE, R. J.; REGESTER, G. O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.8, p.1454-1459, 1996.

SMYTH, M.; FITZGERALD, R. J. Relationship between some characteristics of wpc hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. **International Dairy Journal**, v.8, n.9, p.819-827, 1998.

STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104 (1995).

SUETSUNA, K.; NAKANO, T. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifada*). **Journal of Nutritional Biochemistry**. v.11, n.9, p.450-454, 2000.

TAKADA, Y.; MATSUYAMA, H.; KATO, K.; KOBAYASHI, N.; YAMAMURA, J.; YAHIRO, M.; AOE, S. Milk whey protein enhances the bone breaking force in ovariectomized rats. **Nutrition Research**, v.17, n.11/12, p.1709-1720, 1997.

TAKADA, Y.; AOE, S.; KUMEGAWA, M. Whey protein stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.233, n.2, p.445-449, 1996.

TAVARES, M. F. M. Separation mechanisms in capillary electrophoresis. **Química Nova**, v.20, n.5, p.493-511, 1997.

TIRELLI, A.; DE NONI, I.; RESMINI, P. Bioactive peptides in milk products. **Italian Journal of Food Science**, v.9, n.2, p.91-99, 1997.

TIZARD, I. R. (1995), **Immunology An Introduction**, 4<sup>th</sup> Ed, Saunders College Publishing: Philadelphia.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. Heat-induced deamidation, dephosphorylation and breakdown of caseinate. **International Dairy Journal**, v.9, n.3-6, p.237-241, 1999.

VAN CAMP, J.; MESSENS, W.; CLÉMENT, J.; HUYGHEBAERT, A. Influence of pH and calcium chloride on the high-pressure-induced aggregation of a whey protein concentrate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.5, p.1600-1607, 1997.

VAN DER VEN, C.; GRUPEN, H.; BONT, D. B. A.; VORAGEN, A. G. J. Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. **International Dairy Journal**, v.12, n.10, p.813-820, 2002.

VAN DYCK, S.; VISSERS, S.; SCHENPDAEL, A. V.; HOOGMARTENS, J. Kinetic study of angiotensin converting enzyme activity by capillary electrophoresis after in-line reaction at the capillary inlet. **Journal of Chromatography A**, v.986, n.1, p.303-311 2003.

WU, J.; ALUKO, R. E.; MUIR, A. D. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. **Journal of Chromatography A**, v.950, n.1-2, p.125-130, 2002.

WU, J.; DING, X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **Food Research International**, v.35, n.4, p.367-375, 2002.

XAVIER, F.; MAGALHÃES, A. M. F.; GONTIJO, J. A. R. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on blood pressure and renal sodium handling in renal denervated rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.3, p.347-54, 2000.

YAMADA, M.; SASAKI, R.; SATO, N.; SUZUKI, M.; TAMURA, M.; MATSUSHITA, T.; KURUMATANI, H. Amelioration by beraprost sodium, a prostacyclin analogue, of established renal dysfunction in rat glomerulonephritis model. **European Journal of Pharmacology**, v.449, n.1/2, p. 167– 176, 2002.

YAMAMORI, Y. The SHR model and its relation to human essential hypertension. In: **Cardiology 1: Hypertension**. London: Butterworth Scientific, 1988. p.57-77.

YAMAMOTO, N.; MAENO, M.; TAKANO, T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.7, p.1388-1393, 1999.

YAMAMOTO, N.; AKINO, A.; TAKANO, T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.4, p.917-922, 1994a.

YAMAMOTO, N.; AKINO, A.; TAKANO, T. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.58, n.4, p.776-778, 1994b.

YAMAMOTO, N.; AKINO, A.; TAKANO, T. Purification and specificity of a cell-wall-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Biochemistry**, v.68, n., p.114-74, 1993.

YUST, M. M.; PEDROCHE, J.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. **Food Chemistry**, v.80, n.1, p.1-7, 2003.