



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

“Ação da α -lactalbumina e seus hidrolisados
na inibição da úlcera gástrica induzida
por diferentes agentes”

Leonice Fátima Höger Mezzaroba
Tecnóloga em Alimentos

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Orientador

Campinas, 2005



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

“Ação da α -lactalbumina e seus hidrolisados
na inibição da úlcera gástrica induzida
por diferentes agentes”

Leonice Fátima Höger Mezzaroba
Tecnóloga em Alimentos

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Orientador

Dissertação apresentada à
Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do título de mestre
em Alimentos e Nutrição.

Campinas, 2005

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

M579a Mezzaroba, Leonice Fátima Höger
Ação da α -lactalbumina e seus hidrolisados na inibição da
úlcera gástrica induzida por diferentes agentes / Leonice Fátima
Höger Mezzaroba. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Lactalbumina. 2 Úlcera gástrica. 3. Prostaglandinas. I.
Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II. Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Action of the α -lactalbumin and its hydrolysates on the inhibition of the induced
gastric ulcer for different agents.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Lactalbumin, Gastric Ulcer, Prostaglandins

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Valdemiro Carlos Sgarbieri

João Ernesto de Carvalho

Célio Kenji Miyasaka

Alexandre Nunes Ponezi

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(Orientador) FEA/UNICAMP

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
(Membro) CPQBA/UNICAMP

Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka
(Membro) FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi
(Membro) CPQBA/UNICAMP

Ao meu esposo Vilmar, pelo exemplo
de vida, amor e grande incentivador
profissional e pessoal.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Engenharia de Alimentos / UNICAMP,
especialmente ao Departamento de Alimentos e Nutrição pela oportunidade
profissional e pessoal.

Ao ITAL,
pela disposição dos laboratórios, e pela equipe do laboratório Química -
Bioquímica que me apoiaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao CPQBA/UNICAMP,
especialmente a Divisão de Microbiologia e Farmacologia, pela disposição dos
laboratórios, aos professores, amigos e colegas que me incentivaram durante a
execução deste trabalho.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

A Davisco Foods International, pela doação da α -lactalbumina.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus,
por ter me iluminado durante a execução deste trabalho.

Agradeço ao meu esposo Vilmar e a todos meus familiares,
pelo apoio emocional, paciência e muito amor.

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri,
pelo apoio e dedicação na competente orientação deste trabalho e ensinamentos
científicos tão importantes a minha formação pessoal.

Ao Prof. Alexandre Nunes Ponezi,
pelo apoio durante a execução deste trabalho e disponibilização do laboratório.

À Janesca que me acolheu e incentivou nos momentos mais difíceis.

À todos, do laboratório de Microbiologia e Farmacologia do CPQBA.

Aos amigos (as), colegas do Depto de Alimentos e Nutrição.

À Danieli e Consuelo,
pela amizade e companheiras do chimarrão de muitas tarde de domingo.

A todos,
que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
CAPÍTULO 1	9
<i>REVISÃO DA LITERATURA</i>	11
1.1 Proteínas do soro de leite.....	11
1.2 Componentes das proteínas do soro.....	11
1.3 Propriedades das proteínas do soro.....	16
1.4 Propriedades da α -Lactalbumina	17
1.5 Úlcera gástrica e citoprotetores da mucosa gástrica.....	20
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 2	35
<i>ISOLAMENTO DA α-LACTALBUMINA E DA β-LACTOGLOBULINA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA E PURIFICAÇÃO DA α-LACTALBUMINA POR EXCLUSÃO MOLECULAR</i>	37
RESUMO.....	37
2.1 INTRODUÇÃO	38
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	40
2.2.1 Obtenção do concentrado de proteínas de soro de leite (CPS)	40
2.2.2 Caracterização do concentrado de soro de leite bovino.....	41
2.2.3 Isolamento e purificação da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina	42
2.2.4 Hidrólise enzimática	45
2.2.5 Fracionamento do hidrolisado	46
2.2.6 Caracterização eletroforética.....	46
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48

2.3.1 Caracterização da matéria-prima	48
2.3.2 Purificação da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina por cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular.....	49
2.3.3 Caracterização eletroforética da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina	54
2.3.4 Hidrólise enzimática da α -lactalbumina e determinação do grau de hidrólise	56
2.4 CONCLUSÃO.....	59
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
CAPÍTULO 3	65
<i>AÇÃO DA α-LACTALBUMINA E SEUS HIDROLISADOS</i>	<i>67</i>
<i>NA INIBIÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA</i>	<i>67</i>
<i>POR INDOMETACINA E ETANOL EM RATOS.....</i>	<i>67</i>
RESUMO.....	67
3.1 INTRODUÇÃO	69
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	71
3.2.1 Animais.....	71
3.2.2 Teste do efeito protetor das amostras em diferentes modelos de indução de úlcera gástrica em ratos.....	71
3.2.3 Determinação da dose efetiva 50% (DE ₅₀).....	76
3.2.4 Estudo das vias e/ou mecanismos de ação específica nos processos de proteção da mucosa gástrica	77
3.2.5 Análise estatística.....	84
3.3 RESULTADOS	85
3.3.1 Avaliação da atividade antiulcerogênica.....	85
3.3.2 Estudo dos mecanismos de ação antiulcerogênica.....	91
3.4 DISCUSSÃO	98
3.5 CONCLUSÕES	106
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
CONCLUSÃO GERAL	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1- Parâmetros físico-químicos das proteínas do soro de leite de acordo com McKenzie (citado por HAHN et al., 1998).....	12
Tabela 2.1- Condições de corrida utilizadas para separar a α -lactalbumina e a β -lactoglobulina das demais proteínas do soro de leite. 43	
Tabela 2.2- Composição centesimal, solubilidade e teor de cálcio do concentrado de soro de leite.....	48
Tabela 2.3- Rendimento (mg) da β -lactoglobulina e da α -lactalbumina obtidas a partir do concentrado de proteínas de soro de leite (CPS) por cromatografia de troca aniônica (<i>Q-Sepharose fast flow</i>) e exclusão molecular (<i>Sephacryl S-200</i>).....	53
Tabela 3.1- Parâmetros utilizados na contagem das lesões ulcerativas de acordo com a metodologia descrita por GAMBERINI et al. (1991).	74
Tabela 3.2- Curva dose efeito da α -lactalbumina comercial (dose repetitiva) no modelo de úlcera induzida por indometacina.	86
Tabela 3.3- Resultados da dose efeito da α -lactalbumina comercial (dose repetitiva) no modelo de úlcera induzida por etanol.	90
Tabela 3.4- Efeitos da administração intraduodenal da α -lactalbumina comercial, das frações maiores e menores que 1 kDa, e da cimetidina sobre o pH, volume gástrico e concentração de ácido total estomacal de ratos com piloro ligado por 4 horas.	91
Tabela 3.5- Efeito do bloqueio das substâncias sulfidríla no índice de lesões ulcerativas para a α -lactalbumina comercial e para as frações F1 e F2 em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos	93
Tabela 3.6- Efeito da α -lactalbumina (produzida em laboratório e comercial), frações do hidrolisado (F1 e F2) e da carbenoxolona sobre a formação de muco gástrico.....	96
Tabela 3.7- Efeito da α -lactalbumina (produzida em laboratório e comercial) e seus hidrolisados na síntese de prostaglandina na mucosa gástrica de ratos.	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Fluxograma do processo de obtenção do concentrado protéico de soro de leite (CPS).....	40
Figura 2.2- Fluxograma do processo de separação da β -lactoglobulina e da α -lactalbumina a partir do concentrado protéico de soro de leite, contendo 80% de proteína.	44
Figura 2.3- Perfil de eluição das proteínas de soro de leite por cromatografia de troca aniônica em coluna preparativa com resina <i>Q Sepharose fast flow</i> em sistema FPLC da Pharmacia.....	50
Figura 2.4- Perfil de eluição da fração α -lactalbumina, isolada por cromatografia de troca aniônica, e purificada por exclusão molecular em coluna preparativa com resina <i>Sephacryl S-200</i> em sistema FPLC da Pharmacia.....	52
Figura 2.5- Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da α -lactalbumina isolada por cromatografia de troca iônica e purificada por exclusão molecular.....	55
Figura 2.6- Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da β -lactoglobulina obtida por cromatografia de troca iônica.	56
Figura 2.7- Curva de hidrólise da α -lactalbumina com pancreatina (P-1750) monitorado pelo “pH-stat”.....	57
Figura 3.1- Fluxograma do tratamento repetitivo das amostras em modelo de úlcera induzida por indometacina em ratos.....	73
Figura 3.2- Fluxograma do tratamento repetitivo das amostras em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.....	76
Figura 3.3- Fluxograma da administração subcutânea de N-etilmaleimida (NEM) em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.	79
Figura 3.4- Fluxograma da administração intraperitoneal de indometacina em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.	81

Figura 3.5- Efeito do tratamento repetitivo da α -lactalbumina (produzida em laboratório, comercial, α -La comercial hidrolisada) e da cimetidina no modelo de úlcera induzida por indometacina.....	85
Figura 3.6- Efeito do tratamento repetitivo da α -lactalbumina (produzida em laboratório, comercial e da α -lactalbumina comercial hidrolisada) e carbenoxolona em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto.....	87
Figura 3.7- Efeito do tratamento repetitivo da fração < 1kDa (F1) e da fração > 1kDa (F2) da α -lactalbumina comercial hidrolisada e carbenoxolona em modelos de úlcera induzida por etanol.....	88
Figura 3.8- Efeito do tratamento repetitivo da α -lactalbumina comercial e da carbenoxolona em modelos de úlcera induzida por etanol+HCl (etanol 60% + 100mM HCl).	89
Figura 3.9- Curva dose efetiva 50% da α -lactalbumina comercial no modelo de úlcera induzida por etanol	90
Figura 3.10- Efeito do tratamento repetitivo da α -lactalbumina (produzida em laboratório e comercial) e das frações do hidrolisado F1 e F2 em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos tratados previamente com indometacina.	94

RESUMO

A α -lactalbumina tem sido recentemente associada com redução de estresse, imunomodulação, atividade antimicrobiana após proteólise, propriedade anticancer e atividade antiulcerogênica. Os objetivos deste trabalho foram definir uma metodologia para a obtenção da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina a partir de um concentrado de proteínas de soro de leite bovino e investigar a atividade antiulcerogênica da α -lactalbumina (produzida em laboratório e uma preparação comercial), da α -lactalbumina comercial hidrolisada e duas frações de seu hidrolisado (F1 < 1kDa e F2 > 1kDa) na proteção da mucosa gástrica em modelos de úlcera induzida por indometacina e etanol absoluto em ratos, bem como, avançar na investigação das vias metabólicas de ação protetora. Para o isolamento da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina a partir do concentrado de soro de leite bovino utilizou-se o sistema FPLC da Pharmacia e coluna de troca aniônica (resina *Q Sepharose fast flow*), e a fração correspondente a α -lactalbumina foi em seguida purificada por exclusão molecular utilizando-se a resina *Sephacryl S-200*. A β -lactoglobulina foi facilmente isolada por cromatografia de troca iônica apresentando-se quase homogênea e com um rendimento de 82%; para a α -lactalbumina, foi necessária uma etapa de purificação, e a proteína semi purificada apresentou contaminantes e baixo rendimento (32%). Para avaliar a ação antiulcerogênica da α -lactalbumina e de seus hidrolisados em modelo de úlcera induzido por indometacina ou por etanol absoluto os animais receberam duas doses das amostras teste em dias consecutivos. Para avaliar possíveis vias de ação protetora foram estudadas suas participações na secreção ácida gástrica através da ligadura do piloro, a participação de substâncias sulfidríla e prostaglandinas na citoproteção gástrica em modelos de úlcera induzida por etanol absoluto. A α -lactalbumina comercial (Davisco Foods International, INC.) foi à amostra que apresentou maior porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas no modelo de úlcera induzida por indometacina. No modelo de úlcera

induzida por etanol absoluto, a α -lactalbumina (produzida em laboratório e a comercial) e frações de seu hidrolisado (F1 e F2) inibiram as lesões gástricas em níveis significativos na mesma ordem. A investigação das vias metabólicas de ação protetora, mostraram que as amostras não alteraram a concentração ácida total após 4 horas de piloro ligado, sugerindo que a atividade antiulcerogênica desta proteína parece não ser mediada pela via da secreção ácida gástrica. A alquilação de grupamentos sulfidríla, envolvidos no mecanismo de citoproteção gástrica com N-etilmaleimida (NEM), eliminou o efeito protetor da α -lactalbumina e de frações de seu hidrolisado à mucosa gástrica, sugerindo que a ação antiulcerogênica parece depender da participação destas substâncias. A inibição da síntese de prostaglandina pela indometacina, bloqueador da síntese de prostaglandinas pela inibição da ciclooxigenase, não impediu que a α -lactalbumina (produzida em laboratório e a comercial) e a fração do hidrolisado de peso molecular $>1\text{kDa}$ protegesse a mucosa gástrica a níveis significativos, sugerindo uma menor dependência de prostaglandina para a ação protetora dessas amostras. Já a fração do hidrolisado de peso molecular $<1\text{kDa}$ perdeu sua atividade, evidenciando a participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica por esta fração peptídica. A confirmação do envolvimento de prostaglandinas no mecanismo de ação antiulcerogênica por peptídios derivados da α -lactalbumina foi realizada através da quantificação do muco gástrico e da determinação da concentração de PGE_2 na mucosa gástrica. Os resultados obtidos sugerem que há um conjunto de mecanismos envolvidos na proteção exercida pela α -lactalbumina e frações de seu hidrolisado enzimático sobre a mucosa gástrica, sendo estes, a participação de substâncias sulfidríla e aumento dos níveis de prostaglandina E_2 na mucosa gástrica.

ABSTRACT

The α -lactalbumin has been recently associated with reduction of stress, immunomodulation, antimicrobial activity after proteolysis, anticancer and antiulcerogenic activity. The purpose of this work was to define a methodology for obtaining α -lactalbumin and β -lactoglobulin from a bovine whey protein concentrate and to investigate the antiulcerogenic activity of the α -lactalbumin (produced in laboratory and a commercial preparation – Davisco Foods International, INC.), of the hydrolyzed commercial α -lactalbumin and two fractions of this hydrolysate (F1<1kDa and F2 >1kDa), in the protection of gastric mucosa induced by indomethacin or absolute ethanol induced ulcer in rats, as well as, to advance in the inquiry of the metabolic pathways of protective actions. For the isolation of the α -lactalbumin and of β -lactoglobulin from the bovine whey protein concentrate a Pharmacia FPLC system with anion exchange column (Q-Sepharose fast flow resin) was used. Alpha-lactalbumin was further purified by molecular exclusion chromatography using Sephacryl S-200 column. The β -lactoglobulin was easily isolated from ionic exchange chromatography presenting good purity and 82% yield; for the α -lactalbumin, a second stage of purification was necessary, and the partially purified protein still presented some contaminants and a low yield (35%). To evaluate the antiulcerogenic action of the α -lactalbumin and its hydrolysates for indomethacin and absolute ethanol induced ulcer in rats, the animals received two doses of the samples in consecutive days. To determine possible mechanisms of protection to the gastric mucosa, the effect in the gastric acid secretion through the tied piloro technique, the participation of sulfhydryl substances and prostaglandins were studied. For the indomethacin induced ulcer only the commercial α -lactalbumin inhibited the gastric injuries, while in the absolute ethanol induced ulcer all the samples were able to reduce the gastric injuries at significant levels. The inquiry of the metabolic pathways of protective action showed that the samples did not modify the concentration of the total acid after 4 hours tied piloro, suggesting that the antiulcerogenic activity of these proteins and peptides seem not to be

mediated by the mechanism of gastric acid secretion. The alkylation of sulfhydryl groups with N-ethylmaleimide (NEM), partially eliminate the protective effect of the α -lactalbumin and its hydrolysates on the gastric mucosa, suggesting the participation of these groups in the antiulcerogenic action. The inhibition of the prostaglandin synthesis with indomethacin did not eliminate the protection offered by α -lactalbumin and the hydrolysate fraction of molecular weight > 1 kDa. However the protection offered by the hydrolysate fraction of molecular weight < 1 kDa was completely neutralised by the indomethacin cyclooxygenase inhibition, suggesting that α -lactalbumin low peptides seem to protect the gastric mucosa via the prostaglandin cycle. The confirmation of the involvement of prostaglandins in the mechanism of antiulcerogenic action by α -lactalbumin peptides was substantiated through the quantification of gastric mucus and the determination of the PGE₂ concentration in the gastric mucosa. These results suggest that there are more than one mechanism for the stomach cytoprotection against ulcerogenic factors by α -lactalbumin and its hydrolysates. While intact α -lactalbumin and high molecular weight peptides seem to depend on the sulfhydryl groups for protection, low molecular weight peptides (MW < 1 kDa) seem to act by stimulation of prostaglandin synthesis.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Por muito tempo se pensou que as proteínas alimentares tinham somente a função de fornecer aminoácidos para o organismo construir novos tecidos. Hoje se sabe que, durante o processo digestivo, as proteínas geram peptídios que podem cumprir outras funções, antes de renderem seus aminoácidos para nutrir os tecidos (AMAYA-FARFÁN, 2003).

Os recentes avanços na bioquímica nutricional e pesquisas biomédicas têm ajudado a desvendar as complexas relações existentes entre nutrição e doenças, sugerindo que proteínas dos alimentos e peptídios derivados, tanto no processo digestivo como na proteólise *in vitro*, podem desempenhar funções importantes na prevenção e/ou tratamentos de condições patológicas provenientes da desnutrição, de agentes patológicos e injúrias. Alguns desses agentes funcionais poderiam ser importantes na preservação da saúde, na promoção do bem-estar e no aumento da longevidade (SGARBIERI, 2000).

As proteínas do soro possuem propriedades que resultam em possíveis funções biológicas benéficas à saúde humana, como o fortalecimento do sistema imunológico (WONG, WATSON, 1995) e a diminuição do risco de doenças degenerativas como certos tipos de câncer (BOUNOUS, 2000).

A α -lactalbumina, segunda proteína mais abundante no soro de leite, tem sido recentemente associada com redução de estresse (MARKUS et al., 2000), propriedade anticancer com a α -lactalbumina humana (SVENSSON et al., 1999; SVENSSON et al., 2000), imunomodulação (MONTAGNE et al., 2000) e atividade antimicrobiana após proteólise (PIHLANTO-LEPPÄLÄ et al., 1999; PELLIGRINI et al., 1999).

A α -lactalbumina tem mostrado diferentes funções biológicas dependendo do estado conformacional (SVENSSON et al., 2000). Recentemente, foi demonstrado que algumas variantes enoveladas “folding variants” da α -lactalbumina apresentam atividade bactericida (HAKANSSON et al., 2000) e podem induzir a morte celular de células tumorais (HAKANSSON et al., 1995; SVENSSON et al., 1999).

Entre outras propriedades, as proteínas do soro e a α -lactalbumina, vem se destacando em um dos problemas que afeta um grande número de pessoas, a úlcera gástrica. Foi demonstrado recentemente que concentrados de proteínas de soro de leite (ROSANELI, 2002; ROSANELI et al., 2002) e a α -lactalbumina (MATSUMOTO et al., 2001) apresentaram atividade antiulcerogênica em modelos de úlcera gástrica induzida em ratos. Os mecanismos pelos quais estas proteínas protegem a mucosa gástrica não estão totalmente elucidados. Entretanto, foi observado que há a participação da síntese da glutathione (ROSANELI, 2002; ROSANELI et al., 2002) e a síntese de prostaglandinas (MATSUMOTO et al., 2001; USHIDA et al., 2003).

Os objetivos desta pesquisa foram: a) padronizar uma metodologia para o isolamento e purificação das duas principais proteínas do soro de leite bovino, isto é, a α -lactalbumina e a β -lactoglobulina; b) comparar a bioatividade da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina intacta e seus hidrolisados na inibição da úlcera gástrica induzida por diferentes agentes ulcerogênicos; c) determinar as possíveis vias de ação específicas destes componentes na proteção da mucosa gástrica em ratos.

O presente trabalho está dividido em três capítulos. O capítulo 1, aborda uma revisão da literatura sobre as proteínas do soro de leite bovino, bem como, as suas principais propriedades. Aborda também a úlcera gástrica, fatores que levam ao seu desenvolvimento e os principais citoprotetores da mucosa gástrica. O capítulo 2, trata da obtenção da α -lactalbumina e β -lactoglobulina por métodos

cromatográficos e a hidrólise enzimática da α -lactalbumina com pancreatina em “pH-stat” e seu fracionamento para posterior utilização em testes biológicos. E o capítulo 3, refere-se à ação antiulcerogênica da α -lactalbumina e de seus hidrolisados em modelos de úlcera induzidas por indometacina e etanol absoluto, e a investigação de prováveis vias de ação protetora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMAYA-FARFÁN, J. Avanços no conhecimento sobre a função das proteínas nas dietas para desempenho físico. In: 5^o Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos – Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Inovação na Indústria de Alimentos. 2003, Campinas-Unicamp, 2003.
2. BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, v.20, n.6C, p.4785-4792, 2000.
3. HAKANSSON, A.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; SABHARWAL, H.; SVANBORG, C. Apoptosis induced by a human milk protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v.92, n.17, p.8064-8068, 1995.
4. HAKANSSON, A.; SVENSSON, M.; MOSSBERG, A.K.; SABHARWAL, H.; LINSE, S.; LAZOU, I.; LÖNNERDAL, B.; SVANBORG, C. A folding variant of α -lactalbumin with bactericidal activity on *Streptococcus pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, Salem, v.35, n.3, p.589-600, 2000.
5. MARKUS, C.R.; OLIVIER, B.; PANHUYSEN G.E.M.; GUGTEN, J. VAN DER; ALLES, M.S.; TUITEN, A.; WESTENBERG, H.G.M, FEKKES, D.; KOPPERSCHAAR, H.F.; HAAN, E. The bovine α -lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.71, n.6, p.1536-1544, 2000.
6. MATSUMOTO, H; SHIMOKAWA, Y; USHIDA, Y; TOIDA, T; HAYASAWA, H. New biological function of bovine α -lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. **Bioscience**,

- Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, Maio, v.65, n.5, p.1104-1111, 2001.
7. MONTAGNE, P.M.; CUILLIERE, M.L.; MOLE, C.M.; BENE, M.C.; FAURE, G.C. Dynamics of the main immunologically and nutritionally available proteins of human milk during lactation. **Journal of Food of Composition and Analysis**, Orlando, v.13, n.2, p.127-137, 2000.
8. PELLIGRINI, A., THOMAS, U.; BRAMAZ, N.; HUNZIKER, P.; FELLEBERG, R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, Amsterdam, v.1426, n.3, p.439-448, 1999.
9. PIHLANTO-LEPPALA, A.; MARNILA, P.; HUBERT, L.; ROKKA, T.; KORHONEN, H.J.T.; KARP, M. The effect of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of Escherichia coli JM103. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.87, n.4, p.540-545, 1999.
10. ROSANELI, C. F. Atividade antiulcerogênica de um concentrado de soro de leite bovino em modelos experimentais com ratos. Campinas, 2002. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
11. ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, v.5, n.4, p.221-228, 2002.
12. SGARBIERI, V.C. Proteínas e Peptídios com Propriedades Funcionais Fisiológicas. In: Simpósio Alimentos Funcionais para o Novo Milênio: qualidade de vida e saúde. 2000, Campinas. **Anais**. Campinas-Unicamp, p. 14-15, 2000.

13. SVENSSON, M.; SABHARWAL, H.; HAKANSSON, A.; MOSSBERG, A.K.; LIPNIUNAS, P.; LEFFLER, H.; SVANBORG, C.; LINSE, S. Molecular characterization of α -lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.274, n.10, p.6388-6396, 1999.
14. SVENSSON, M.; HAKANSSON, A.; MOSSBERG, A.K.; LINSE, S.; SVANBORG, C. Conversion of α -lactalbumin to a protein inducing apoptosis, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.97, n.8, p.4221-4226, 2000.
15. WONG, C.W.; WATSON, D.L. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.62, p.359-368, 1995.
16. USHIDA, Y; SHIMOKAWA, Y; MATSUMOTO, H; TOIDA, T; HAYASAWA, H. Effects of bovine alpha-lactalbumin on gastric defense mechanisms in naive rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, Março, v.67, n.3, p.577-583, 2003.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Proteínas do soro de leite

O leite é reconhecido como uma excelente fonte de proteínas (MILLER et al., 2000) constituindo uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e de humanos de todas as idades (SGARBIERI, 1996). O leite bovino contém aproximadamente 3,2% de proteínas (FOX, McSWEENEY, 1998), sendo que 80% são caseínas e 20% são proteínas do soro.

As proteínas do soro de leite são compostos nitrogenados remanecentes no líquido sobrenadante após separação da caseína. Quando a remoção da caseína é feita através da precipitação ácida no ponto isoelétrico, pH 4,6 a 20°C (NAKAI, MODLER, 1996), o soro é denominado “soro ácido”; porém ao ser feito o processo de coagulação pela ação da enzima renina, é denominado “soro doce” (FOX, McSWEENEY, 1998).

1.2 Componentes das proteínas do soro

O soro, contém como proteína basicamente a β -lactoglobulina (β -Lg) e a α -lactalbumina (α -La), e outras proteínas presentes em menor quantidade, como a soroalbumina bovina (BSA), imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM), proteose-peptonas, lactoferrina e transferrina (MILLER et al., 2000). A Tabela 1.1 apresenta alguns parâmetros físico-químicos das proteínas do soro de leite.

Tabela 1.1- Parâmetros físico-químicos das proteínas do soro de leite de acordo com McKenziey (citado por HAHN et al., 1998).

Proteínas	Concentração (g/L)	Massa molecular KDa	Ponto isoelétrico pI
β -lactoglobulina	3 – 4	18,4	5,2
α -lactalbumina	1,5	14,2	4,7 – 5,1
Soroalbumina	0,3 – 0,6	69	4,9
IgG, IgA, IgM	0,6 – 0,9	150 – 900	5,8 – 7,3
Lactoperoxidase	0,06	78	9,6
Lactoferrina	0,05	78	8,0
Proteose-Peptona	0,5	4 – 20	

- **β -Lactoglobulina**

A β -lactoglobulina é a proteína mais abundante representando aproximadamente 50% do total das proteínas do soro de leite e 12% do total das proteínas do leite (FOX, McSWEENEY, 1998). A β -lactoglobulina é uma proteína globular, com estrutura primária de 162 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 18,4 kDa. O monômero da β -lactoglobulina tem uma sulfidril livre e duas pontes dissulfeto (NAKAI, MODLER, 1996). É uma proteína rica em aminoácidos sulfurados que lhe garante alto valor nutritivo. A β -lactoglobulina pode se ligar ao retinol protegendo-o contra oxidações (FOX, McSWEENEY, 1998).

A conformação da β -Lg é dependente do pH (IMAFIDON et al., 1997). Entre valores de pH de 5,2 e 7,2, esta proteína apresenta-se como dímero com peso molecular de 36,0 kDa (NAKAI, MODLER, 1996). Em pH baixo, ocorre associação com formação de octâmeros, e em alta temperatura o dímero se dissocia liberando monômeros. Sua solubilidade depende do pH e da carga iônica, mas não precipita com a acidificação do leite (WALSTRA et al., 1999).

- **α -Lactalbumina**

A α -lactalbumina é a segunda proteína quantitativamente mais representativa do soro, perfazendo aproximadamente 20% das proteínas do soro bovino e 3,5% do total das proteínas do leite (FOX, McSWEENEY, 1998), sendo a proteína de menor peso molecular e a menos resistente à temperatura (IMAFIDON et al., 1997).

A α -lactalbumina tem um elevado conteúdo do aminoácido triptofano (4 resíduos por mol), que é um precursor da niacina (MILLER et al., 2000). É uma proteína rica em aminoácidos sulfurados, principalmente cisteína (4 pontes dissulfeto intramolecular por mol) e metionina. Todos os resíduos de aminoácidos sulfurados estão envolvidos por pontes dissulfeto intramolecular, ligando os resíduos de cisteína 6-120, 28-111, 61-77 e 73-91 (MORR, HA, 1993; FOX, McSWEENEY, 1998).

Em nível de estrutura terciária a α -lactalbumina é uma proteína globular compacta consistindo, de 26% de α -hélice, 14% de estrutura- β e 60% de outras estruturas. A estrutura terciária é muito similar a lisozima (FOX, McSWEENEY, 1998). Sua função biológica inclui a participação na síntese da lactose, atuando como coenzima (WALSTRA et al., 1999).

A α -lactalbumina apresenta alta afinidade por Ca^{2+} e outros cátions divalentes (REN, STUART, ACHARYA, 1993), sendo a ligação com Ca^{2+} conhecida por estabilizar a conformação do domínio da folha β da α -lactalbumina (PERMYAKOV, BERLINER, 2000). As características físicas e propriedades de enovelamento “folding” são significativamente afetadas por específicas interações com Ca^{2+} . A remoção da ligação com Ca^{2+} diminui consideravelmente a estabilidade térmica da α -lactalbumina, mas a proteína retém essencialmente a mesma conformação nativa (PFEIL, SADOWSKI, 1985).

A α -lactalbumina é reconhecida por formar uma variedade de estados enovelados “folding” sob diferentes condições do solvente. Um estado parcial desenovelado “unfolding”, o estado “apo”, é formado em pH neutro quando o íon Ca^{2+} é removido por EDTA (KUWAJIMA et al., 1985; PFEIL, 1987; KUWAJIMA, 1996). O estado “apo” conserva essencialmente a estrutura secundária, mas apresenta flutuações na estrutura terciária (DOLGIKH et al., 1981).

A α -lactalbumina é uma das proteínas mais estudadas para entender o mecanismo de estabilidade protéica, de enovelamento/desenovelamento “folding” e “unfolding” (CHANG, BULYCHEV, LI, 2000). Sob uma variedade de condições, como em: baixo pH (DOLGIKH et al., 1985); alta temperatura (VANDERHEEREN, HANSSENS, 1994); ou em moderadas concentrações de desnaturantes, tal como hidrocloreto de guanidina (KUWAJIMA, 1989) a α -lactalbumina adota uma estrutura conformacional parcial denominada “molten globule”. A remoção da ligação de Ca^{2+} em pH neutro e baixa força iônica pode produzir um estado intermediário termodinamicamente equivalente a este estado de “molten globule” (KUWAJIMA, 1996).

O estado “molten globule” da α -lactalbumina é caracterizado por um alto grau de estrutura secundária como a nativa e uma estrutura terciária flexível (DOLGIKH et al., 1981; KUWAJIMA, 1989; PTITSYN, 1995). O estado “molten globule” tem surgido como um intermediário no equilíbrio cinético entre o estado nativo e desenovelado para um variado número de proteínas globulares que podem ser estáveis sob certas condições (ARAI, KUWAJIMA, 2000).

A estrutura do estado “molten globule” da α -lactalbumina é altamente heterogênea, tem a estrutura predominante em α -hélice formada principalmente por interações hidrofóbicas fracas, enquanto o domínio em folha β é significativamente mais desenovelado (KUWAJIMA, 1996). Para KUWAJIMA (1996), a α -lactalbumina exibe o mais bem caracterizado estado “molten globule” e é, o melhor modelo de proteína para estudos do enovelamento de proteínas.

- **Soroalbumina**

A soroalbumina é derivada diretamente do sangue e representa de 0,7 – 1,3% das proteínas do soro de leite (NAKAI, MODLER, 1996). Sua molécula apresenta 582 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 66 kDa. A molécula contém 17 ligações dissulfeto e uma sulfidril livre (FOX, McSWEENEY, 1998). Não se conhece nenhuma função biológica específica para a soroalbumina, a não ser a de transportar nutrientes hidrofóbicos na corrente sangüínea.

- **Imunoglobulinas**

As imunoglobulinas representam de 1,9 – 3,3% do total das proteínas do leite e são derivadas do soro sangüíneo (NAKAI, MODLER, 1996). As imunoglobulinas apresentam-se em três classes distintas: IgM, IgA e IgG (IgG₁ e IgG₂), sendo a IgG₁ a principal imunoglobulina presente no leite bovino e no colostro (NAKAI, MODLER, 1996), enquanto que no leite humano é a IgA. A função fisiológica das Igs é fornecer vários tipos de imunidade ao corpo. As Igs consistem de duas cadeias polipeptídicas pesadas e duas cadeias leves que estão ligadas por pontes dissulfeto (FOX, McSWEENEY, 1998).

- **Lactoferrina**

A Lactoferrina é uma proteína que se liga ao ferro e está presente no soro de leite bovino em uma concentração de aproximadamente 0,1 mg/mL (FONSECA et al., 1999). Esta proteína também tem propriedades bacteriostáticas (NAKAI, MODLER, 1996), atuando como inibidor de muitas bactérias inclusive *Bacillus Stearothermophilus* e *Bacillus subtilis*. A inibição é causada pela remoção do íon ferro presente no soro. Está presente no leite bovino em baixa concentração e no leite humano em concentrações mais elevadas (WALSTRA et al., 1999).

Estão também presentes, no soro de leite bovino, pequenas quantidades de substâncias bioativas, incluindo hormônios, fatores de crescimento e citocinas, em concentrações que podem ter considerável significado fisiológico (McINTOSH et al., 1998).

1.3 Propriedades das proteínas do soro

O soro de leite é formado por um grupo heterogêneo de proteínas com características especiais (PARODI, 1998), além da grande importância na alimentação, apresentam uma rica e variada mistura de proteínas com propriedades químicas, físicas, funcionais tecnológicas e fisiológicas (McINTOSH et al., 1998).

Com base nestas propriedades, cada vez mais as proteínas individuais e o concentrado protéico de soro de leite vêm despertando particular interesse da indústria e outros órgãos envolvidos no desenvolvimento de formulações de alimentos. Estas propriedades são importantes em duas áreas: na nutrição, especialmente no fornecimento de energia e no suprimento de importantes aminoácidos essenciais para o crescimento, saúde e reparação celular; na área da funcionalidade, onde incluem propriedades físicas importantes para a textura, estrutura e aparência global dos alimentos, tal como a formação de gel, espuma, retenção de água; e propriedades fisiológicas ou biológicas com efeitos terapêuticos (REGESTER et al., 1996).

Estudos experimentais e epidemiológicos sugerem que dietas contendo proteínas do soro de leite exercem efeitos inibitórios no desenvolvimento de vários tipos de patologias, como cancer (BOUNOUS, BATIST, GOLD, 1991). Estudos realizados por BOUNOUS, KONGSHAVN, GOLD (1988) e WONG, WATSON (1995) mostraram que as proteínas do soro podem elevar a resposta imune tanto celular como humoral. Em estudos realizados pelos mesmos pesquisadores, foi observado que as proteínas do soro desencadearam uma resposta imune significativamente maior quando comparados com dietas contendo caseína ou proteínas de soja.

A investigação do mecanismo pelo qual as proteínas do soro de leite estimulam o sistema imune concentra-se no papel desempenhado pelos seus

aminoácidos. As proteínas do soro contêm substancialmente mais cisteína em relação à caseína. A cisteína é considerada como um substrato limitante para a síntese da glutathione que é necessária para a proliferação de linfócitos (BOUNOUS, BATIST, GOLD, 1989; ANDERSON, 1998).

A glutathione é composta por três aminoácidos, ácido glutâmico, cisteína e glicina, formando o tripeptídeo γ -glutamilcisteinilglicina (ANDERSON, 1998). É uma molécula amplamente distribuída nas células de todo o organismo e desempenha várias funções de defesa celular incluindo proteção contra estresse oxidativo, possui efeitos desintoxicantes e antioxidantes, capazes de proteger o organismo de doenças como o câncer (BOUNOUS, BATIST, GOLD, 1991; BARUCHEL et al., 1995; REGESTER et al., 1996; ANDERSON, 1998; BOUNOUS, 2000). Estudos têm mostrado que dietas de proteínas do soro resultam no aumento da concentração de glutathione em diversos tecidos, e muitos dos efeitos benéficos, atribuídos às proteínas do soro de leite, são anulados pela inibição da síntese da glutathione (BOUNOUS, BATIST, GOLD, 1989;1991).

1.4 Propriedades da α -Lactalbumina

Suplementação Protéica

A α -lactalbumina bovina, por apresentar um conteúdo maior de cisteína e triptofano em relação as proteínas do leite humano, é recomendada como suplemento protéico em formulas infantis (HEINE, KLEIN, REEDS, 1991). A cisteína é considerada como o substrato limitante para a síntese da glutathione, que é um importante elemento do sistema antioxidante (HEINE, KLEIN, REEDS, 1991) e está envolvida no transporte de aminoácidos (ANDERSON, 1998). O triptofano é o precursor do neurotransmissor serotonina e do hormônio neurosecretor melatonina. A serotonina e a melatonina regulam muitos efeitos neuro-comportamentais tal como apetite, saciedade, humor, modulador das vias senso-perceptivas (interfere no limite da sensação da dor), e o ritmo para dormir e

acordar (YOGMAN, ZEISEL, ROBERTS, 1982; HEINE, KLEIN, REEDS, 1991; LIEN, 2003).

Atividade Antiestresse

O alto conteúdo de triptofano na α -lactalbumina tem mostrado que esta proteína reduz a vulnerabilidade ao estresse, vários pesquisadores observaram um aumento significativo nas concentrações de triptofano no plasma em relação à soma de outros aminoácidos neutros (leucina, isoleucina, valina, tirosina, triptofano e fenilalanina) após indivíduos do sexo masculino altamente vulneráveis ao estresse, consumirem dieta de α -lactalbumina. O aumento da concentração de triptofano no plasma em relação à soma de outros aminoácidos neutros foi considerado um fator indireto do aumento das funções da serotonina no cérebro. O resultado sugere que dietas protéicas ricas em α -lactalbumina melhorem o desempenho cognitivo de pessoas vulneráveis ao estresse por aumentar o conteúdo de triptofano no cérebro e a atividade da serotonina (MARKUS et al., 2000; MARKUS, OLIVIER, HAAN, 2002). MARKUS, OLIVIER, HAAN (2002).

Apoptose de Células Tumorais

Vários estudos tem mostrado que as proteínas do soro tem efeitos inibitórios no desenvolvimento de vários tipos de patologias, incluindo atividade antitumoral. Esta propriedade também foi recentemente identificada na α -lactalbumina humana. HAKANSSON et al. (1995), identificaram um complexo de α -lactalbumina, formado por precipitação ácida da caseína de leite humano, caracterizada como uma forma multimérica da α -lactalbumina humana, que induz a apoptose em células tumorais e células imaturas. SVENSSON et al. (1999) através de uma comparação entre α -lactalbumina nativa monomérica e na forma “molten globule” mostraram que a fração ativa, ou seja, a fração que induz a apoptose em células tumorais, contém oligômeros de α -lactalbumina que sofreram uma alteração conformacional para o estado “molten globule”. Para SVENSSON et al. (1999) a α -lactalbumina é o exemplo de uma proteína que pode adquirir diferentes funções dependendo do seu estado de enovelamento.

Foi demonstrado recentemente por SVENSSON et al. (2000) que variantes conformacionais estáveis de uma proteína podem apresentar distintas regiões funcionais e desta forma, diferir na atividade biológica da forma nativa. Se variantes enoveladas de α -lactalbumina diferem na atividade biológica, será possível converter a α -lactalbumina nativa para a forma ativa que induz a apoptose, alterando sua conformação (SVENSSON et al., 2000).

Atividade Bactericida

HAKANSSON et al., (2000) identificaram uma variante enovelada da α -lactalbumina com forte atividade bactericida contra *Streptococcus pneumoniae*. O composto ativo que apresenta atividade bactericida foi isolado da caseína de leite humano por cromatografia de troca iônica seguida de cromatografia de exclusão molecular. Os autores demonstraram que a forma ativa da molécula estava em um estado enovelado diferente, com estrutura secundária idêntica à α -lactalbumina do soro de leite humano, mas com flutuações na estrutura terciária. A α -lactalbumina nativa pode ser convertida para a forma bactericida ativa. Essa conversão requer que a proteína esteja no estado “apo” e na presença de um composto estabilizador presente na caseína, identificado como um ácido graxo C18:1.

Peptídios com Propriedades Antibacteriana

As proteínas do leite, além do seu papel nutricional, são proteínas que tem importância fisiológica e são uma fonte de peptídios biologicamente ativos. Estes peptídios, que se encontram inativos dentro da seqüência da proteína precursora, podem ser liberados das proteínas do leite na hidrólise enzimática durante a digestão gastrointestinal ou durante processamento dos alimentos (TESCHEMACHER, KOCH, BRANTL, 1997).

PELLIGRINI et al. (1999) demonstraram que a digestão proteolítica de α -lactalbumina por tripsina e quimotripsina produz três peptídios com propriedades bactericidas. Segundo os autores, os polipeptídios na maioria das vezes, são

ativos contra bactérias gram-positivas, sugerindo uma possível função antimicrobiana da α -lactalbumina após sua digestão parcial por endopeptidases do sistema digestivo.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ et al., (1999) observaram que a α -lactalbumina e β -lactoglobulina hidrolisada por diferentes enzimas proteolíticas apresentaram atividade antibacteriana. A α -lactalbumina e a β -lactoglobulina apresentaram a maior inibição da atividade bioluminescente da *E. coli* JM103 quando essas proteínas foram hidrolisadas a um grau de hidrólise aproximado de 20% e 15%, respectivamente. Os autores atribuíram a atividade à presença de peptídios com diferentes seqüências.

Atividade Antiúlcera

Desde 1987, o leite é reconhecido por ser eficiente na prevenção de úlceras induzidas experimentalmente por irritantes como o etanol, ácido clorídrico, aspirina e estresse (DIAL, LICHTENBERGER, 1987).

ROSANELI, (2002) demonstrou que o concentrado de soro de leite apresenta atividade antiúlcera em modelos de úlcera induzida por etanol e indometacina, demonstrando ainda que o efeito gastroprotetor do concentrado protéico de soro foi mais eficaz a partir da segunda dose administrada. Observou-se que, as substâncias sulfidrilas participaram na citoproteção da mucosa gástrica. MATSUMOTO et al. (2001) identificaram que a α -lactalbumina tem marcante atividade antiúlcera, e sugere que essa proteína pode proteger a mucosa gástrica contra injúrias, em parte através do estímulo à produção de prostaglandinas.

1.5 Úlcera gástrica e citoprotetores da mucosa gástrica

O estômago é dividido em quatro regiões anatômicas, cárdia, fundo, corpo e antro, que são revestidas pela mucosa gástrica constituída de uma série de depressões e glândulas. Nas depressões estão as células epiteliais superficiais,

enquanto que as glândulas são constituídas por três tipos distintos de células. As parietais que são as responsáveis pela secreção de ácido, as endócrinas pela secreção de muco e as principais que secretam o pepsinogênio. As células parietais e as células principais estão localizadas principalmente no fundo e no corpo. Já no antro, estão localizadas as células G responsáveis pela secreção de gastrina (WINGATE, 1986).

As paredes gástricas são constituídas de quatro camadas dispostas em superposição na seguinte ordem, de fora para dentro: serosa, muscular, submucosa e mucosa. A mucosa gástrica é uma das mais importantes do organismo, por suas funções, sua estrutura e pelos processos patológicos que nela se desenvolvem (MELO et al., 1993). A mucosa gástrica é constantemente exposta a vários irritantes, mas ela mantém a sua integridade devido à várias linhas de defesa, incluindo secreção muco-bicarbonato, hidrofobicidade da mucosa, alto fluxo sangüíneo na mucosa, estabilização de lisossomos nos tecidos, manutenção de substâncias sulfidrilas na mucosa, e rápida proliferação e remoção de células da mucosa (KONTUREK, 1990).

A mucosa gástrica excreta para a luz do tubo digestivo substâncias que atendem a diversas finalidades. Entre elas, incluem-se o ácido, o muco, bicarbonato e substâncias antibacterianas como imunoglobulinas e lactoferrina, as quais, constituem o primeiro nível de defesa da mucosa gástrica (WALLACE, CHIN, 1997). A proteção da parede do estômago é feita principalmente pela barreira de muco constituída por água, mucopolissacarídeos e eletrólitos (bicarbonato, sódio, potássio, cloreto, fosfato e sulfato) (PETROIANU, MELO, CASTRO, 1993). O muco e o bicarbonato formam uma camada gelatinosa imóvel que protege a mucosa da ação do suco gástrico por neutralizar o ácido clorídrico (ALLEN et al., 1993). Os íons bicarbonato ficam presos no muco, criando um gradiente de pH de 1-2 na luz para 6-7 ao nível da superfície da mucosa (RANG, DALE, RITTER, 1997). A regulação da secreção ácida pelas células parietais é particularmente importante nos tratamentos da úlcera péptica. A terapia anti-

secretora para úlcera péptica procura reduzir a secreção do ácido com antagonistas dos receptores de H₂ ou inibidores da bomba de prótons, e/ou neutralização do ácido secretado, com antiácidos (RANG, DALE, RITTER, 1997).

O fluxo sangüíneo é essencial para muitos mecanismos de proteção (ABDEL-SALAM et al., 2001). A microcirculação também contribui para a defesa da mucosa gástrica, e é significativamente regulada pelo sistema nervoso. O sangue dilui e/ou neutraliza ácidos/toxinas e previne sua acumulação no tecido da mucosa (WALLACE, CHIN, 1997). As lesões produzidas por agentes tóxicos podem resultar no acúmulo de radicais livres tóxicos nas células da mucosa (SZABO, TRIER, FRANKEL, 1981). As substâncias sulfidrilas (SH) são alguns dos agentes protetores intracelulares e extracelulares mais amplamente distribuídos no organismo, e estão envolvidos na proteção contra agentes químicos de indução de lesões na maioria dos órgãos e tecidos (SZABO, TRIER, FRANKEL, 1981; SZABO, 1984; KONTUREK et al., 1987; KONTUREK, 1990; SZABO et al., 1992).

Os efeitos benéficos das sulfidrilas (SH) são usualmente atribuídas à glutathione, que é a maior fração de grupos sulfidrilas não protéicos, embora os grupos SH das proteínas também sejam cruciais para a manutenção da integridade e permeabilidade da membrana celular, tanto para liberação como para a atividade de certas enzimas e peptídios reguladores (SZABO, TRIER, FRANKEL, 1981; SZABO, 1984; SZABO et al., 1992). A glutathione e os grupos SH das proteínas podem atuar diretamente como antioxidantes, seqüestrantes (*scavengers*) de radicais livres e reguladores da integridade da membrana, e das atividades secretoras e enzimáticas (SZABO et al., 1992). A glutathione é um dos protetores químicos endógenos da mucosa gástrica, assim como as prostaglandinas. A depleção destes agentes agrava úlceras e erosões gástricas induzidas por agentes químicos e estresse. A gastroproteção pode ser encontrada mesmo na presença de baixas concentrações de glutathione e prostaglandinas na mucosa, indicando que outros agentes químicos de proteção (poliaminas, fatores

de crescimento, neurotransmissores, esteróides) também estão presentes e atuantes no estômago (SZABO et al., 1992).

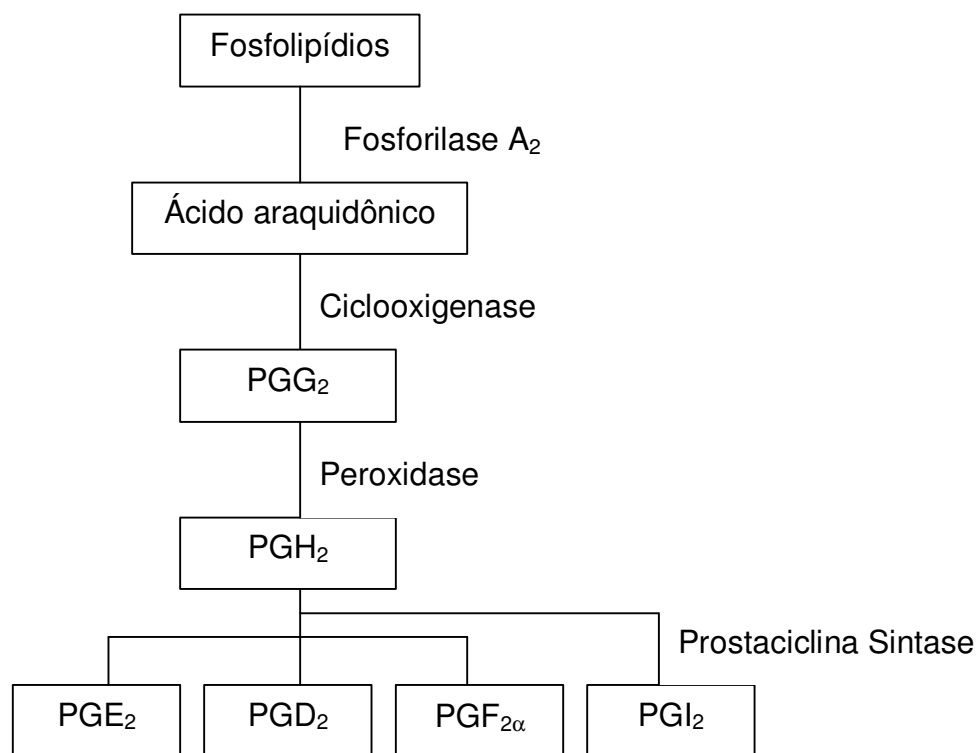
Lesões induzidas por etanol diminuem a concentração de SH de natureza não protéica na mucosa gástrica, conseqüentemente diminui a citoproteção da mucosa. A ocorrência natural de aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) e sulfidrilas sintéticas (cisteaminas) previne estas lesões (SZABO, TRIER, FRANKEL, 1981).

As prostaglandinas, presentes em pequenas quantidades em quase todos os tecidos do corpo, exercem importantes efeitos intracelulares e algumas delas são liberadas nos líquidos teciduais locais e no sangue, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (GUYTON, HALL, 1997).

As famílias das prostaglandinas (PG), leucotrienos e compostos relacionados são chamados de eicosanóides, pois são derivados dos ácidos graxos essenciais compostos de 20 carbonos, que contém 3, 4 e 5 duplas ligações (MORROW, ROBERTS, 2001). O ácido araquidônico é o precursor da classe predominante das prostaglandinas, que é derivado do ácido linoléico dietético, ou ingerido como um composto da dieta (MORROW, ROBERTS, 2001).

A síntese das prostaglandinas é executada em etapas por um complexo de enzimas microssomais. A primeira enzima nesta síntese é a sintase do endoperóxido da prostaglandina, também chamada de ciclooxigenase dos ácidos graxos (MORROW, ROBERTS, 2001). Existem duas isoformas dessa enzima, ciclooxigenase-1 e ciclooxigenase-2 (SMITH et al., 1996). As ciclooxigenases apresentam duas atividades distintas: uma atividade de sintase dos endoperóxidos, que oxigena e forma estruturas com anel fechado a partir do ácido graxo precursor não-esterificado para formar o endoperóxido cíclico PGG; e uma atividade de peroxidase, que converte a PGG em PGH. As PGG e PGH são quimicamente instáveis, porém podem ser transformadas enzimaticamente em

vários produtos, incluindo prostaciclina (PGI_2), tromboxana, prostaglandinas E, F ou D (MORROW, ROBERTS, 2001). O esquema que segue, está representando a formação de prostaglandinas.



As prostaglandinas E₂ e I₂ predominantes, sintetizadas pela mucosa gástrica (BRUNTON, 1996), inibem a secreção ácida do estômago estimulada pela alimentação, histamina ou gastrina. O volume das secreções, a acidez e o conteúdo de pepsina são também reduzidos pelas prostaglandinas provavelmente por uma ação exercida diretamente sobre as glândulas secretoras. Além disso, essas prostaglandinas são vasodiladoras na mucosa gástrica e a PGI₂ pode estar envolvida na regulação local do fluxo sanguíneo (MORROW, ROBERTS, 2001). As prostaglandinas também estimulam a secreção de muco e bicarbonato pelas células epiteliais superficiais adjacentes, contribuindo para os efeitos citoprotetores de prostaglandinas endógenas da série E (ROBERT, 1979; BRUNTON, 1996). Estes efeitos ajudam a manter a integridade da mucosa

gástrica e são descritos como propriedades citoprotetoras das PGEs (ROBERT, 1979; KONTUREK, 1990; MORROW, ROBERTS, 2001).

A presença de prostaglandinas nas células parece ser necessária para as células epiteliais gastrointestinais manterem sua integridade. Se o conteúdo de prostaglandinas for reduzido por pré-tratamentos com compostos anti-inflamatórios não esteróides ou um corticosteróide, estas células se tornam vulneráveis podendo não resistir aos efeitos prejudiciais causados pelo ácido, pepsina e substâncias ingeridas (VANE, 1971; ROBERT, 1979).

Acredita-se que a ulcerogênese péptica (gástrica ou duodenal) pode ser causada por um desequilíbrio entre os fatores agressivos (ácidos, pepsina, infecção por *Helicobacter pylori*) e as defesas locais da mucosa (secreção de muco e bicarbonato, fluxo sanguíneo e prostaglandinas PGE₂ e PGI₂) (BRUNTON, 1996). Os agentes antiulcerogênicos estão envolvidos na redução de fatores agressores ou no fortalecimento das defesas da mucosa gástrica com os chamados agentes citoprotetores (MORIMOTO et al., 1991; BRUNTON, 1996).

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-SALAM, O.M.E.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology – Paris**, Paris, v.95, n.1-6, p.105-127, 2001.
2. ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G.; GARNER, A.; KIVILAASKO, E. Gastroduodenal mucosal protection. **Physiological Reviews**, Baltimore, v.73, n.4, p.823-857, 1993.
3. ANDERSON, M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemico-Biological Interaction**, Limerick, v.111-112, p.1-14, 1998.
4. ARAI, M.; KUWAJIMA, K. Role of the molten globule state in protein folding. **Advances in Protein Chemistry**, New York, v.53, p.209-282, 2000.
5. BARUCHEL, S.; WANG, T.; FARAH, R.; JAMALI, M.; BATIST, G. In vivo modulation of tissue glutathione in rat mammary carcinoma model. **Biochemical Pharmacological**, New York, v.50, n.9, p.1505-1508, 1995.
6. BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P.A.L.; GOLD, P. The immunoenhancing property of dietary whey protein concentrate. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v.11, n.4, p.271-278, 1988.
7. BOUNOUS, G.; BATIST, G.; GOLD, P. Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v.12, n.3, p.154-161, 1989.
8. BOUNOUS, G.; BATIST, G.; GOLD, P. Whey proteins in cancer prevention. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.57, n.2, p.91-94, 1991.

9. BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, v.20, n.6C, p.4785-4792, 2000.
10. BRUNTON, L.L. Fármacos para controle da acidez gástrica e tratamentos de úlcera pépticas. In: Hardman, J.; Limbird, L.E. **Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 9^a ed. México: Mc Grawhill, 1996, cap.37, p.663-674.
11. CHANG, J.; BULYCHEV, A.; LI, L. A stabilized molten globule protein. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.487, n.2, p.298-300, 2000.
12. DIAL, E.J.; LICHTENBERGER, L.M. Milk protection against experimental ulcerogenesis in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v.32, n.10, p.1145-1150, 1987.
13. DOLGIKH, D.A.; GILMANSHIN, R.I.; BRAZHNIKOV, E.V.; BYCHKOVA, V.E.; SEMISOTNOV, G.V.; VENYAMINOV, S.; PTITSYN, O.B. Alpha-lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? **FEBS Letters**, Amsterdam, v.136, n.2, p.311-315, 1981.
14. DOLGIKH, D.A.; ABATUROV, I.A.; BOLOTINA, BRAZHNIKOV, E.V.; BYCHKOVA, V.E.; E.V.; GILMANSHIN, R.I.; LEBEDEV, Y.O.; SEMISOTNOV, G.V.; TIKTOPULO, E.I.; PTITSYN, O.B. Compact state of a protein molecule with pronounced small-scale mobility. **European Biophysics Journal**, New York, v.13, n.2, p.109-121, 1985.
15. FONSECA, M.L.; FONSECA, C.S.P.; BRANDÃO, S.C.C. Propriedades anticarcinogênicas de componentes do leite. **Indústria de Laticínios**, Porto Alegre, v.4, n.21, p.5-55, 1999.

16. FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Milk Proteins. In: "Dairy Chemistry and Biochemistry". London, Blackie Academic & Professional, 1998.
17. GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Controle Local do Fluxo Sangüíneo pelos Tecidos e sua Regulação Humoral. In: **Tratado de Fisiologia Médica**, 9 ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1997, cap.17, p.181-189.
18. HAHN, R.; SCHULZ, P.M.; SCHAUPP, C.; JUNGBAUER, A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.795, n.2, p.277-287, 1998.
19. HAKANSSON, A.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; SABHARWAL, H.; SVANBORG, C. Apoptosis induced by a human milk protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.92, n.17, p.8064-8068, 1995.
20. HAKANSSON, A.; SVENSSON, M.; MOSSBERG, A.K.; SABHARWAL, H.; LINSE, S.; LAZOU, I.; LÖNNERDAL, B.; SVANBORG, C. A folding variant of α -lactalbumin with bactericidal activity *Streptococcus pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, Salem, v.35, n.3, p.589-600, 2000.
21. HEINE, W.E.; KLEIN, P.D.; REEDS, P.J. The importance of α -lactalbumin in infant nutrition. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.121, n.3, p.277-283, 1991.
22. IMAFIDON, I.G.; FARKYE, Y.N.; SPANIER, M.A. Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: A review. **Food Science and Nutrition**, London, v.37, n.7, p.663-689, 1997.
23. KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKI, T.; PIASTUCKI, T.; DUPUY, D.; SZABO, S. Gastric mucosal protection by agents altering gastric mucosal sulfhydryls. Role of endogenous prostaglandins. **Digestion**, Basel, v.37, n.2, p.67-71, 1987.

24. KONTUREK, S.J. Mechanisms of gastroprotection. **Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplementum**, Oslo, v.174, p.15-28, 1990.
25. KUWAJIMA, K.; HIRAOKA, Y.; IKEGUCHI, M.; SUGAI, S. Comparison of the transient folding intermediates in lysosyme and α -lactalbumin. **Biochemistry**, Easton, v.24, n.4, p.874-881, 1985.
26. KUWAJIMA, K. The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein struture. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, New York, v.6, n.2, p.87-103, 1989.
27. KUWAJIMA, K. The molten globule state of α -lactalbumin. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.10, n.1, p.102-109, 1996.
28. LIEN, E.L. Infant formulas with increased concentrations of α -lactalbumin. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.77, n.6, p.1555S-1558S, 2003.
29. MARKUS, C.R.; OLIVIER, B.; PANHUYSEN G.E.M.; GUGTEN, J. VAN DER; ALLES, M.S.; TUITEN, A.; WESTENBERG, H.G.M, FEKKES, D.; KOPPERSCHAAR, H.F.; HAAN, E. The bovine apha-lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.71, n.6, p.1536-1544, 2000.
30. MARKUS, C.R.; OLIVIER, B.; HAAN, E. Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improve cognitive performance in stress-vulnerable subjects. **American Journal of clinical Nutrition**, New York, v.75, n.6, p.1051-1056, 2002.

31. MATSUMOTO, H.; SHIMOKAWA, Y.; USHIDA, Y.; TOIDA, T.; HAYASAWA, H. New biological function of bovine alpha-Lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.65, n.5, p.1104-1111, 2001.
32. MCINTOSH, G.H.; ROYLE, P.J.; LE LEU, R.K.; REGESTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L.; KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey proteins as functional food ingredients? **International Dairy Journal**, Barking, v.8, n.5-6, p. 425-434, 1998.
33. MELO, J.R.C.; CASTRO, L.P.; LANNA, J.C.B.D.; GUIMARÃES, J.T.; SOBRINHO, J.M.D.L. Anatomia do estômago e anatomia do desenvolvimento, *in: Gastroenterologia Clínica*, Volume 1, 3ª edição, Ed. Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 1993, p. 449-459.
34. MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; MCBEON, L.D. Handbook of: Dairy Foods and Nutrition. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2000.
35. MORR, C.V.; HA, Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Food Science and Nutrition**, London, v.33, n.6, p. 431-476, 1993.
36. MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; KAKAYUKI, S. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal loss and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japan Journal Pharmacological**, Osaka, v.57, n.4, p.495-505, 1991.
37. MORROW, J.D.; ROBERTS II, L.J. Lipid-derived autacoids, Eicosanoids and Platelet-Activating Factor. In: **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10 ed., 2001, cap. 26, p.669-685.

38. NAKAI, S.; MODLER, H.W. Food Proteins, Properties and Characterization. Wiley – VCH, 1996.
39. PARODI, P.W. A role for milk protein in cancer prevention. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.53, n.1, p.37-47, 1998.
40. PELLIGRINI, A., THOMAS, U.; BRAMAZ, N.; HUNZIKER, P.; FELLEBERG, R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, Amsterdam, v.1426, n.3, p.439-448, 1999.
41. PERMYAKOV, E.A.; BERLINER, L.J. α -Lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.473, n.3, p.269-274, 2000.
42. PETROIANU, A.; MELO, J.R.C.; CASTRO, L.P. Fisiologia, *in*: Gastroenterologia Clínica, Volume 1, 3ª edição, Ed. Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 1993, p. 460-468.
43. PFEIL, W.; SADOWSKI, M.I. A scanning calorimetric study of bovine and human apo- α -lactalbumin. **Stud. Biophys**, v.100, p.163-170, 1985.
44. PFEIL, W. Is thermally denatured protein unfolded? The example of α -lactalbumin, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, Amsterdam, v.911, n.1, p.114-116, 1987.
45. PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; MARNILA, P.; HUBERT, L.; ROKKA, T.; KORHONEN, H.J.T.; KARP, M. The effect of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of Escherichia coli JM103. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.87, n.4, p.540-545, 1999.

46. PTITSYN, O.B. Structures of folding intermediates. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v.5, n.1, p.74-78, 1995.
47. RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.
48. REGESTER, G.O.; McINTOSH, G.H.; LEE, V.W.K.; SMITHERS, G.W. Whey proteins as nutritional and functional food ingredients. **Food Australia**, North Sydney, v.48, n.3, p.123-127, 1996.
49. REN, J.; STUART, D.I.; ACHARYA, K.R. Alfa-lactalbumin possesses a distinct zinc binding site. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.268, n.26, p.19292-19298, 1993.
50. ROBERT, A. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.77, n.4, p.761-767, 1979.
51. ROSANELI, C. F. Atividade antiulcerogênica de um concentrado de soro de leite bovino em modelos experimentais com ratos. Campinas, 2002. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
52. SMITH, G.S.S.; TORNWALL, M.S.; BARRETO, J.C.; MILLE, T.A. Gastric injury and protection against alcohol and acid: influence of perturbations in glutathione metabolism. **Journal of Surgical Research**, San Diego, v.61, n.2, p.395-403, 1996.
53. SGARBIERI, V.C. Proteínas em Alimentos Protéicos: propriedades, degradações, modificações, Varela, São Paulo, p.139-157, 1996.

54. SVENSSON, M.; SABHARWAL, H.; HAKANSSON, A.; MOSSBERG, A.K.; LIPNIUNAS, P.; LEFFLER, H.; SVANBORG, C.; LINSE, S. Molecular characterization of α -lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.274, n.10, p.6388-6396, 1999.
55. SVENSSON, M.; HAKANSSON, A.; MOSSBERG, A.K.; LINSE, S.; SVANBORG, C. Conversion of α -lactalbumin to a protein inducing apoptosis, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.97, n.8, p.4221-4226, 2000.
56. SZABO, S.; TRIER, J.S.; FRANKEL, P.W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, Washington, v.214, n.4517, p.201-202, 1981.
57. SZABO, S. Peptides, sulfhydryls, and glucocorticoids in gastric mucosal defense: coincidence or connection? **Gastroenterology**, Philadelphia, v.87, p.228-229, 1984.
58. SZABO, S.; NAGY, L.; PEVEBANI, M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteinases in gastric mucosal injury and protection. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.206, n.1-2, p.95-105, 1992.
59. TESCHEMACHER, H.; KOCH, G.; BRANTL, V. Milk protein-derived opioid receptor ligands. **Biopolymers**, New York, v.43, n.2, p.99-117, 1997.
60. VANDERHEEREN, G.; HANSSENS, I. Thermal unfolding of bovine α -lactalbumin. Comparison of circular dichroism with hydrophobicity measurements. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.269, n.10, p.7090-7094, 1994.

61. VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature - New Biology**, London, v.231, p.232-235, 1971.
62. WALLACE, L.J.; CHIN, B.C. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v.214, n.3, p.192-203, 1997.
63. WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A.; TELLEMA, A.; M.A.J.S. van BOCKEL. Principles of milk properties and processes. In: "Dairy Technology". Marcel Dekker, INC. New York, Basel, 1999.
64. WINGATE, D.L. Neurophysiology of the gastrointestinal tract. **The Gastroenterology Ann**, v.3, p.258-283, 1986. In: BIGHETTI, A.E. Atividade antiulcerogênica do extrato bruto e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schultz Bip. Campinas, 1999. Dissertação (Mestre em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.
65. WONG, C.W.; WATSON, D.L. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.62, p.359-368, 1995.
66. YOGMAN, M.W.; ZEISEL, S.H.; ROBERTS, C. Assessing effects of serotonin precursors on newborn behavior. **Journal of Psychiatric Research**, Elmsford, v.17, n.2, p.123-133, 1982.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

***ISOLAMENTO DA α -LACTALBUMINA E DA β -LACTOGLOBULINA
POR CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA E PURIFICAÇÃO DA
 α -LACTALBUMINA POR EXCLUSÃO MOLECULAR***

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a atividade antiulcerogênica da α -lactalbumina, tanto da proteína intacta como de seus hidrolisados, na inibição da úlcera gástrica induzida por diferentes agentes ulcerogênicos, definiu-se uma metodologia para a obtenção da α -lactalbumina e β -lactoglobulina a partir de um concentrado de soro de leite contendo 80% de proteína. Utilizou-se o sistema FPLC da Pharmacia e coluna de troca aniônica (resina *Q Sepharose fast flow*) para o isolamento da α -lactalbumina e β -lactoglobulina a partir do concentrado de soro de leite, e a fração correspondente à α -lactalbumina foi em seguida purificada por exclusão molecular utilizando-se a resina *Sephacryl S-200*. A homogeneidade destas frações foi testada por eletroforese SDS-PAGE demonstrando que a β -lactoglobulina foi facilmente isolada por cromatografia de troca iônica e apresentou-se quase que homogênea com 82% de rendimento. Para a α -lactalbumina foi necessária uma etapa de purificação, e a proteína parcialmente purificada por exclusão molecular apresentou contaminantes e baixo rendimento (35%). A α -lactalbumina comercial (Davisco Foods International, INC.) foi submetida à hidrólise parcial com um complexo enzimático obtido de pâncreas suíno (Pancreatina) até atingir um grau de hidrólise de 21,1%. O grau de hidrólise foi monitorado pela técnica do “pH-stat” e determinado através da reação com TNBS e grupos amina sob condições alcalinas. A α -lactalbumina hidrolisada foi submetida a ultrafiltração tangencial em membrana com porosidade de corte para 1 kDa, separando-se o hidrolisado em duas frações (peptídios < e > que 1 kDa), as quais foram testadas para atividade antiúlcera.

2.1 INTRODUÇÃO

O processamento das proteínas do soro de leite bovino é relativamente recente e tornou-se possível com o desenvolvimento de novas tecnologias, especialmente a ultrafiltração, que facilitou a produção de concentrados protéicos de soro (CPS), com concentração variando entre 30 a 80% de proteína, apresentando-se em seu estado nativo e com boas propriedades funcionais (FOX, McSWEENEY, 1998).

Aplicações do soro de leite bovino estão aumentando constantemente, em parte, devido aos progressos nas técnicas de separação (ultracentrifugação, ultrafiltração, microfiltração, osmose reversa, eletroforese e cromatografia) e hidrólise enzimática (SPREER, 1998). Técnicas para isolamento das proteínas individuais do soro, em escala laboratorial, tais como “salting-out”, cromatografia de troca iônica e/ou cristalização, têm sido utilizadas há aproximadamente 40 anos (SMITHERS et al., 1996).

Vários tipos de cromatografia líquida são utilizados industrialmente para separar e purificar proteínas do soro de leite. Estes incluem exclusão molecular, troca iônica, processos cromatográficos de adsorção e afinidade. Os métodos cromatográficos, particularmente processos de adsorção por troca iônica, tem sido desenvolvidos e utilizados com sucesso em escala comercial para a separação das proteínas do soro e produção de concentrados protéicos de soro de leite (GERBERDING, BYERS, 1998). As proteínas do soro são moléculas anfóteras. Em pH menor que seu ponto isoelétrico ($\text{pH} < 5,2$) elas podem ser adsorvidas em coluna de troca catiônica; e quando em pH maior que seu pI elas podem ser adsorvidas em coluna de troca aniônica (MAUBOIS, OLLIVIER, 1997), sendo esta, uma propriedade utilizada para fracionar e purificar as proteínas do soro de leite.

Vários métodos de cromatografia líquida são usados para a separação de proteínas e diferem entre si, principalmente quanto ao tipo de fase estacionária.

Um deles é a filtração em gel, uma técnica que separa as substâncias por diferenças de massa molecular (HAGEL, 1989). A matriz de filtração em gel contém poros que permitem a entrada do tampão e pequenas proteínas, mas que excluem proteínas de alto peso molecular e complexos de proteínas (BOLLAG et al., 1996). A cromatografia de permeação em gel é mais utilizada na separação de proteínas de componentes de baixa massa molecular ou como estágio final de purificação de proteínas, podendo também ser utilizada para determinar o peso molecular (NAKAI, MODLER, 1996) e desalinizar soluções de proteínas provenientes de outros métodos de obtenção (HAGEL, 1989).

A separação das proteínas do soro de leite por sistemas FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) por cromatografia de troca iônica tem sido investigada por diversos pesquisadores (ANDREWS, TAYLOR, OWEN, 1985; MANJI et al., 1985; GIRARDET, PAQUET, LINDEN, 1989; GERBERDING, BYERS, 1998; KRISTIANSEN et al., 1998; HAHN et al., 1998; YE, YOSHIDA, NG, 2000).

Os avanços da tecnologia de fracionamento das proteínas do soro de leite permitem estudos das propriedades imunobiológicas de alguns componentes do soro com alta pureza, com a perspectiva de possíveis aplicações industriais e biomédicas (WONG et al., 1997).

Os objetivos deste trabalho foram padronizar a metodologia para o isolamento e purificação das duas principais proteínas do soro de leite bovino, isto é, α -lactalbumina e β -lactoglobulina a partir de um concentrado de soro de leite, e a sua obtenção para avaliar a atividade antiulcerogênica. Em testes preliminares, a β -lactoglobulina não apresentou atividade antiúlcera, sendo então os trabalhos direcionados para a utilização da α -lactalbumina intacta e seus hidrolisados (GH=21,1%) para testes de atividade antiulcerogênica.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Obtenção do concentrado de proteínas de soro de leite (CPS)

Todo o processo de obtenção do CPS foi efetuado na planta piloto de leite – TecnoLat (ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas – SP). A matéria-prima foi obtida da Cooperativa de Produtores de Leite da Região de Campinas, Jaguariúna, SP.

A Figura 2.1 mostra o fluxograma seguido para a obtenção do concentrado de soro de leite.

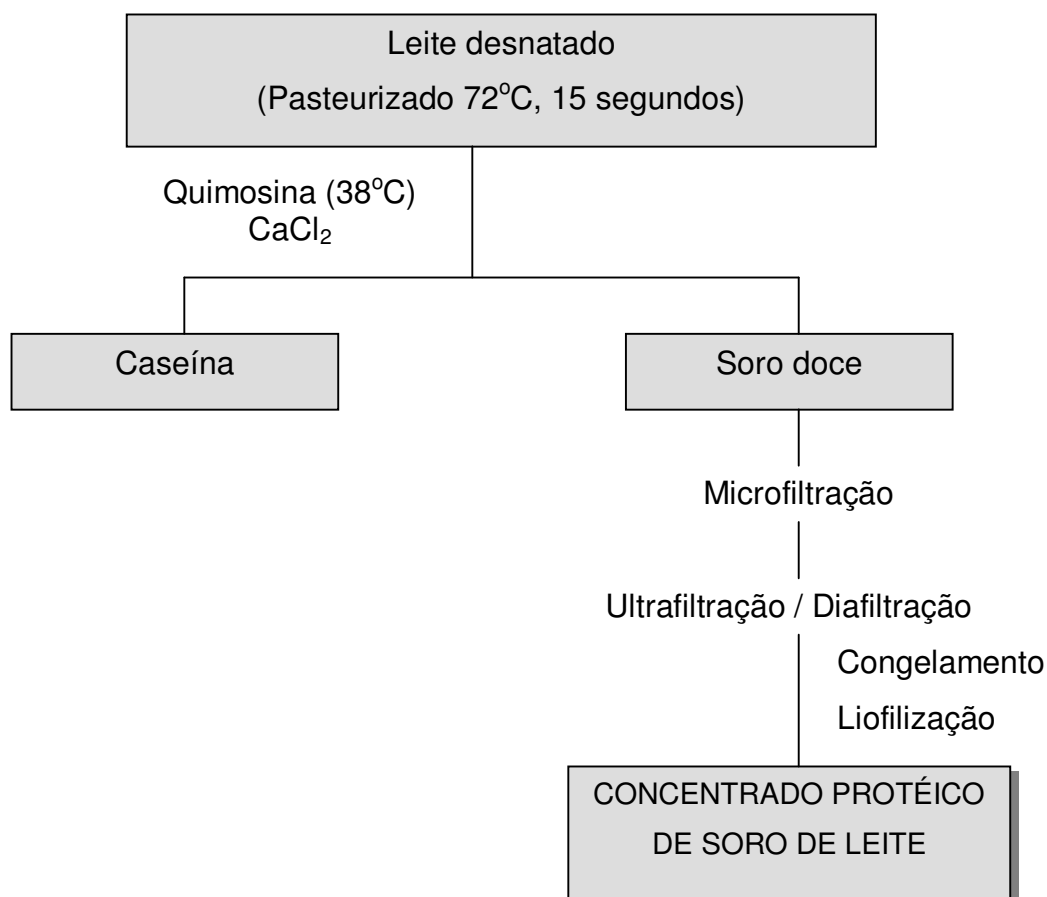


Figura 2.1- Fluxograma do processo de obtenção do concentrado protéico de soro de leite (CPS).

O CPS foi produzido a partir do leite tipo B, desnatado e pasteurizado (72°C, 15 segundos). Após a separação da caseína por coagulação (coalho comercial - CHR Hansen, Valinhos, SP), o soro foi microfiltrado, em membrana polimérica de 1µm, com a finalidade de eliminar glóbulos de gordura e microrganismos. O soro microfiltrado foi submetido a ultrafiltração/diafiltração, em membrana com porosidade de corte para 10 kDa, para a concentração das proteínas do soro. Posteriormente o concentrado foi congelado e desidratado por liofilização, obtendo-se um concentrado protéico desidratado (BORGES et al., 2001).

2.2.2 Caracterização do concentrado de soro de leite bovino

- **Nitrogênio total:** foi determinado pelo método microKjeldahl, segundo procedimento descrito no manual da AOAC (1990). A proteína bruta foi obtida multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 6,38.
- **Umidade:** foi determinado de acordo com os procedimentos descritos no manual da AOAC (1990). Fundamenta-se na evaporação da água presente no alimento.
- **Resíduo mineral (cinza):** foi determinado de acordo com os procedimentos descritos no manual da AOAC (1990). Baseia-se na determinação gravimétrica do resíduo inorgânico fixo após calcinação da matéria orgânica da amostra.
- **Lipídios totais:** foram determinados pelo método descrito por BLIGH & DYER (1959), empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água (10, 20 e 8 mL, respectivamente) para extração dos lipídios.
- **Cálcio:** foi determinado pelo método descrito no manual da AOAC (1998).

- **Solubilidade:** foi determinada em água ajustando o pH 4,6, utilizando-se o método de MORR et al., (1985).

2.2.3 Isolamento e purificação da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina

O isolamento e purificação da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina, foi realizado na Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Foi utilizado um sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) da Pharmacia composto de controlador, bomba, coletor de frações, registrador e unidade de UV (280 nm).

- **Cromatografia de troca iônica**

O sistema foi preparado com uma coluna preparativa XK50/30 preenchida com resina de troca aniônica (*Q-Sepharose fast flow*) da Pharmacia, medindo 100 mm de altura por 50 mm de diâmetro e equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,0 (tampão A). A eluição foi efetuada em passos (*stepwise elution*) com aumento gradativo da concentração do tampão B (tampão A + 1 M NaCl) na seguinte ordem: 0%, 0,5%, 10%, 20%, 30% e 100%. A Tabela 2.1 mostra as condições de corrida utilizada para separar a α -lactalbumina e a β -lactoglobulina das demais proteínas do soro de leite em um sistema FPLC da Pharmacia.

Tabela 2.1- Condições de corrida utilizadas para separar a α -lactalbumina e a β -lactoglobulina das demais proteínas do soro de leite.

Tempo (min.)		0	50	125	175	237,5	287,5	387,5
Volume (mL)		-	200	500	700	950	1150	1550
Tampão	A	100	95	90	80	70	0	100
(%)	B	0	5	10	20	30	100	0

Amostras do concentrado protéico de soro de leite foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,02M, pH 7,0 (tampão A) para conter 4% de proteína e injetadas na coluna de troca aniônica previamente equilibrada com o mesmo tampão. Após a aplicação da amostra, passou-se 200 mL do tampão A para remover as proteínas que não foram adsorvidas à resina, em seguida, iniciou-se a eluição das proteínas adsorvidas com aumento da força iônica conforme descrito na Tabela 2.1. Para regenerar a coluna foram passados mais 400 mL do tampão A.

As frações, correspondentes à α -lactalbumina e à β -lactoglobulina foram coletadas, sendo dialisadas e concentradas em uma membrana Biomax (*polyethersulfone*) com porosidade de corte para 10 kDa (*Pellicon XL Filter Devise with Biomax 10kD*). Posteriormente estas frações concentradas foram congeladas e desidratadas por liofilização.

• Cromatografia de exclusão molecular

O sistema foi preparado com uma coluna preparativa HR XK50/100 preenchida com resina *Sephacryl S-200* da Pharmacia, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,0. Amostras da fração de α -lactalbumina isolada na cromatografia de troca iônica, foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,02 M pH 7,0 e permeadas a um fluxo de 8,5mL/minuto.

A α -lactalbumina purificada foi dialisada e concentrada em membrana Biomax (*polyethersulfone*) com porosidade de corte para 10 kDa (*Pellicon XL Filter*

Devise with Biomax 10kD), posteriormente o concentrado foi congelado e desidratado por liofilização. A Figura 2.2 ilustra os passos seguidos para a obtenção da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina por métodos cromatográficos a partir de um concentrado de soro de leite contendo 80% de proteína.

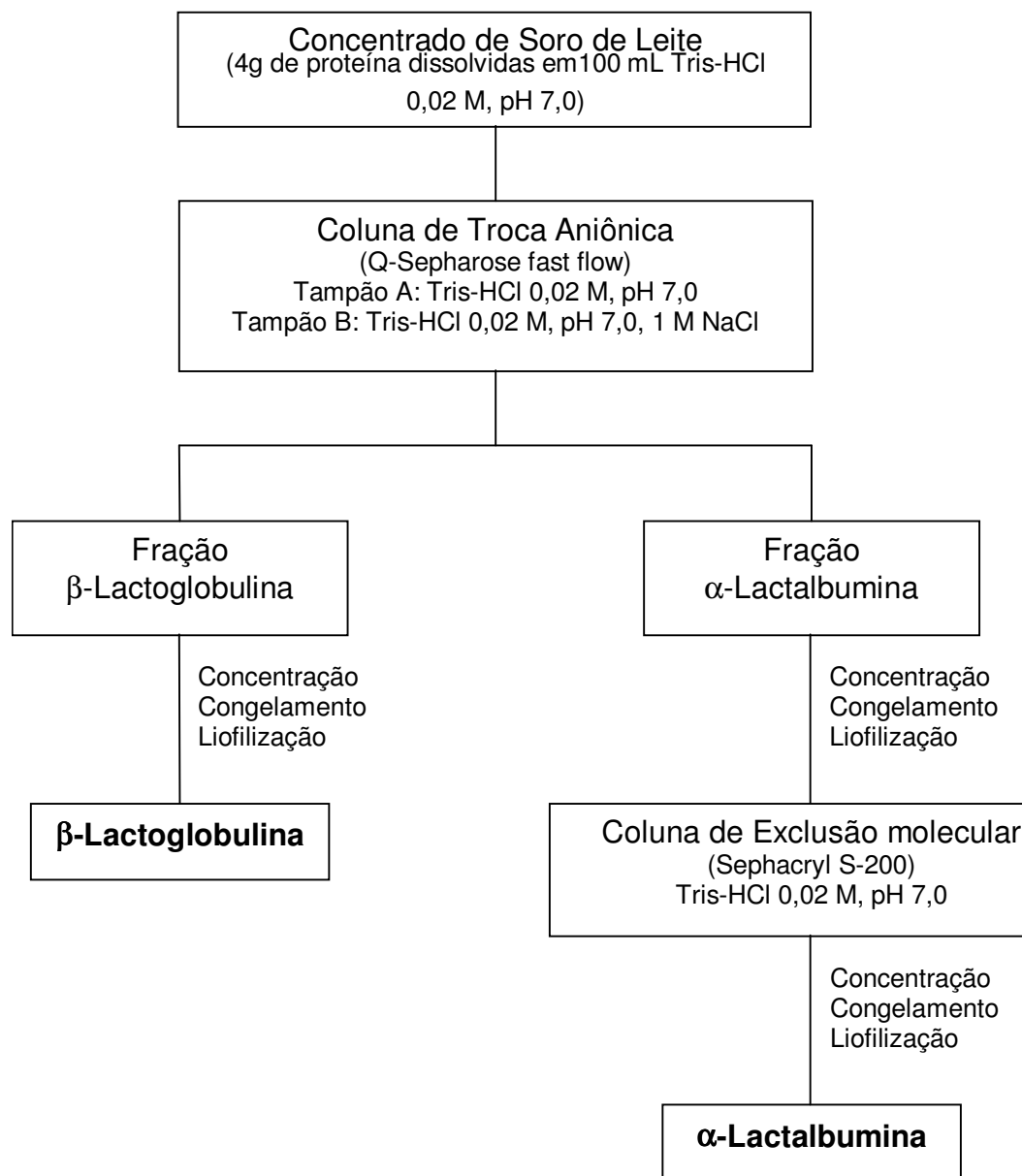


Figura 2.2- Fluxograma do processo de separação da β -lactoglobulina e da α -lactalbumina a partir do concentrado protéico de soro de leite, contendo 80% de proteína.

2.2.4 Hidrólise enzimática

A α -lactalbumina comercial foi submetida à proteólise, com um complexo enzimático obtido de pâncreas suíno (Pancreatina-Sigma P-1750), sendo a hidrólise conduzida em “pH-stat” (modelo 716, Methron, Les Uleis, France), conforme o método proposto por SCHMIDT et al., (1995), com algumas modificações. Preparou-se uma solução aquosa contendo 10% de proteína (p/v), sendo esta solução incubada a uma temperatura de 40°C em pH 7,5. Posteriormente, adicionou-se a enzima na proporção de 4% (p/p) iniciando-se assim a hidrólise. A hidrólise foi conduzida no “pH-stat” até alcançar um grau de hidrólise aproximado de 20%. Após o período de incubação as enzimas foram inativadas por aquecimento a 85°C por 15 minutos, e posteriormente, o hidrolisado foi congelado e desidratado por liofilização.

- **Determinação do grau de hidrólise (GH)**

Usando-se a técnica do “pH-stat” o grau de hidrólise foi obtido diretamente pelo volume de base consumida durante a hidrólise pela seguinte fórmula:

$$GH(\%) = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

Sendo:

B = Volume de base consumida (mL)

N_b = normalidade da base

$\frac{1}{\alpha}$ = valor tabelado (α =grau de dissociação)

MP = massa de proteína em gramas

h_{tot} = número total de ligações peptídicas no substrato de proteínas (meq./g de proteína)

Para a obtenção do hidrolisado de α -lactalbumina o grau de hidrólise foi monitorado pela técnica do “pH-stat”, sendo o grau de hidrólise final, obtido após período de incubação de 240 minutos, determinado conforme o método proposto por ADLER-NIESSEN (1979), que consiste na medida espectrofotométrica do cromóforo formado pela reação entre o ácido 2, 4, 6-trinitro-benzenosulfônico (TNBS) e grupos amina sob condições alcalinas. O GH(%) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$GH(\%) = \frac{n^{\circ} \text{ de ligações peptídicas clivadas}}{n^{\circ} \text{ total de ligações peptídicas}} \times 100$$

2.2.5 Fracionamento do hidrolisado

A α -lactalbumina hidrolisada foi dissolvida em água e submetida a filtração tangencial em membrana com porosidade de corte para 1 kDa (Prep/Scale™ - TFF cartridges 1ft²), coletando-se o permeado e o retentado. Posteriormente, as frações coletadas foram congeladas e desidratadas por liofilização.

2.2.6 Caracterização eletroforética

A homogeneidade (pureza) da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina isoladas por métodos cromatográficos foi examinada por eletroforese SDS-PAGE (gel de poliacrilamida em presença de β -mercaptoetanol e dodesil sulfato de sódio), realizada em aparelho vertical Bio-Rad da Pharmacia, segundo LAEMMLI (1970).

Preparou-se o gel de concentração a 4% de acrilamida e o gel de separação com 12% de acrilamida. As amostras foram dissolvidas em solução tampão contendo 62,5mM Tris-HCl, 10% de glicerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, pH 6,8, sendo posteriormente aquecida a 95°C por 4 minutos para ocorrer a desnaturação. Uma alíquota de 35 μ L de cada amostra (contendo

38µg de proteínas) foi aplicada ao gel. A corrida foi efetuada em temperatura ambiente com uma corrente fixa de 35mA.

O gel foi corado com solução de Coomassie Brilliant Blue R 350 (0,1%) e ácido acético 20% (na proporção de 1:1) durante duas horas. Posteriormente, o gel foi descorado com solução contendo água, metanol e ácido acético (na proporção de 5:3:1).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização da matéria-prima

A Tabela 2.2 apresenta a composição centesimal, solubilidade e o teor de cálcio do concentrado protéico de soro de leite obtido em planta piloto.

Tabela 2.2- Composição centesimal, solubilidade e teor de cálcio do concentrado de soro de leite.

Componente	Porcentagem (base seca)
Proteína (N x 6,38)	80,18 ± 0,77
Umidade	3,94 ± 0,05
Cinza	2,31 ± 0,01
Lipídios totais	6,43 ± 0,09
Carboidrato*	11,08
Cálcio (mg/100g)	599 ± 22
Solubilidade	87,10 ± 0,84

* Calculado por diferença = 100 – (proteína + lipídios totais + cinza).

Resultados são média de 3 determinações ± desvio padrão, exceto para carboidrato.

O concentrado protéico de soro de leite produzido na planta piloto do Ital, apresentou 80,18% de proteína. Como nosso objetivo foi isolar as duas principais proteínas do soro de leite (β -lactoglobulina e α -lactalbumina), quanto maior o teor de proteína mais fácil seria o isolamento, uma vez que, a presença de minerais, carboidratos e gordura interferem na seletividade da coluna utilizada para o fracionamento e pureza das frações obtidas. O teor de proteína no concentrado protéico de soro de leite pode ser aumentado pelo aumento do número de ciclos

de diafiltração. À medida que se aumenta o número de ciclos de diafiltração, as concentrações de carboidrato e cinza diminuem e a proteína aumenta.

O teor de lipídios determinado no concentrado protéico de soro de leite foi maior que o teor determinado por BORGES et al. (2001). Segundo Borges et al. (2001) o teor final de lipídios no concentrado irá depender, em parte, da eficiência do desnate da matéria-prima.

A baixa solubilidade (87,10%) pode estar relacionada ao alto teor de lipídios e carboidratos presentes no concentrado protéico de soro de leite, os quais afetam a solubilidade das proteínas.

2.3.2 Purificação da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina por cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular

Estudos prévios tem mostrado que as proteínas do soro podem ser separadas em escala laboratorial por cromatografia de troca aniônica com resina *Q Sepharose* da Pharmacia (GERBERDING, BYERS, 1998; KRISTIANSEN et al., 1998), e por permeação em gel usando a resina *Sephacryl S-200* (YOSHIDA, 1990).

Vários métodos cromatográficos preparativos tem sido publicados para o fracionamento das proteínas do soro. Sendo que, a cromatografia de troca aniônica tem-se mostrado eficiente para a separação da β -lactoglobulina (GERBERDING, BYERS, 1998; KRISTIANSEN et al., 1998). KRISTIANSEN et al. (1998) utilizaram a cromatografia de troca aniônica (coluna preenchida com resina *Q Sepharose fast flow*) para purificar a β -lactoglobulina e obtiveram qualidade similar ou melhor que os produtos comerciais.

Através da cromatografia de troca aniônica as proteínas do soro foram separadas em cinco frações conforme pode ser visualizado na Figura 2.3. A

primeira fração corresponde a proteínas que não se adsorvem a coluna, sendo eluída somente com o tampão A (F1); a segunda fração foi eluída quando a concentração do tampão B foi aumentada para 5% (F2); a terceira fração foi eluída a uma concentração de 10% do tampão B (F3); a quarta fração foi eluída quando a concentração do tampão B foi aumentada para 20% (F4); e a quinta fração foi eluída a uma concentração de 30% do tampão B (F5) conforme Figura 2.3.

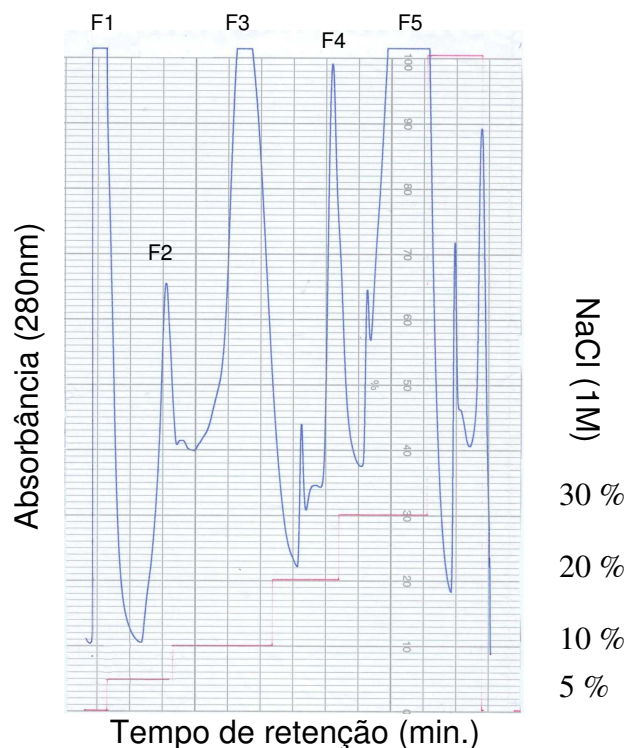


Figura 2.3- Perfil de eluição das proteínas de soro de leite por cromatografia de troca aniônica em coluna preparativa com resina *Q Sepharose fast flow* em sistema FPLC da Pharmacia. Condições de corrida: Amostra de CPS (40mg/mL) dissolvidas em 50 mL de tampão A foi aplicada à coluna e eluída em passos (0, 5%, 10%, 20%, 30% e 100% do tampão B) a um fluxo de 4 mL/min. Fase móvel: tampão A (Tris-HCl 0,02M, pH 7,0), tampão B (Tris-HCl 0,02M, pH 7,0 + 1M NaCl).

A α -lactalbumina foi identificada por eletroforese SDS-PAGE na terceira fração (F3) com vários contaminantes e a β -lactoglobulina identificada na quinta fração (F5), conforme pode ser visualizado na Figura 2.5, linha 2 e Figura 2.6, linha 2.

Observou-se que a α -lactalbumina foi uma das primeiras proteínas a ser eluída da coluna. Sua eluição se deu quando aumentou-se a concentração do tampão B para 10% sendo que nesta concentração foram eluídas várias proteínas presentes no concentrado de soro de leite. A β -lactoglobulina foi eluída da coluna quando o tampão B atingiu uma concentração de 30%.

A ordem de eluição das proteínas de soro está de acordo com GIRARDET, PAQUET, LINDEN (1989). Segundo GIRARDET, PAQUET, LINDEN (1989), a separação das proteínas do soro por troca aniônica em pH 6-8 foi obtido com boa resolução na seguinte ordem de volume de eluição: Ig< α -La<BSA< β -Lg B< β -Lg A. Os autores observaram ainda que a Ig não foi eluída totalmente no primeiro volume de eluição, sendo eluída progressivamente com o aumento da força iônica, contaminando a fração subsequente. Este fenômeno pode provavelmente resultar de modificações estruturais desta proteína, causada pelo modelo de preparação das frações protéicas do leite.

A cromatografia de troca iônica (resina de troca aniônica) mostrou-se eficiente para o isolamento da β -lactoglobulina. Isto ocorreu devido a β -lactoglobulina ter uma alta afinidade à resina utilizada, sendo eluída quando a concentração do tampão B atinge 30%, e sendo uma das últimas proteínas a serem eluídas da coluna, uma vez que, as demais proteínas e contaminantes presentes no concentrado de soro de leite foram eluídas anteriormente.

A β -lactoglobulina por representar 50% do total das proteínas do soro, dificultou a obtenção da α -lactalbumina, que foi eluída quando o tampão B atingiu uma concentração de 10% arrastando contaminantes como imunoglobulinas e a

β -Lg que está presente em grande concentração no concentrado protéico de soro de leite. Através da cromatografia de troca iônica não conseguimos boa pureza para a α -lactalbumina, sendo necessária outra etapa de purificação. Utilizou-se a troca aniônica como fase de polimento, onde isolou-se a α -lactalbumina a partir do concentrado de soro de leite, e a filtração em gel como fase de purificação da fração isolada por cromatografia de troca iônica. A Figura 2.4 mostra o perfil de eluição da fração de α -lactalbumina (F3), isolada a partir do concentrado de soro de leite por troca aniônica, seguida de purificação por exclusão molecular em resina *Sephacryl S-200*.

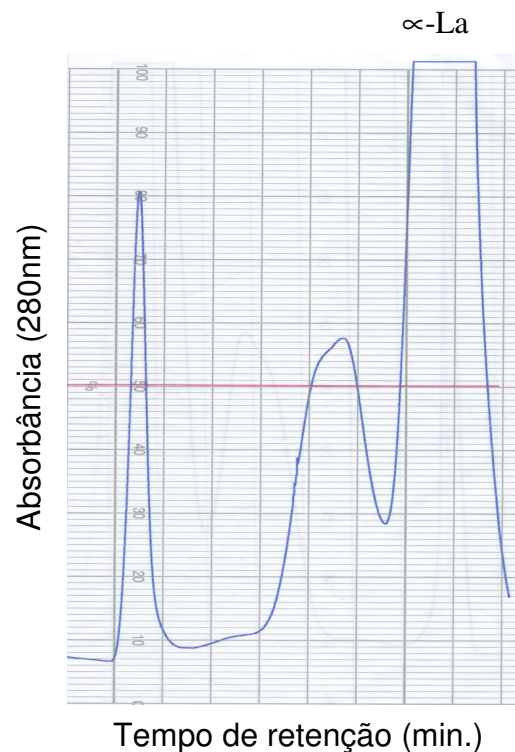


Figura 2.4- Perfil de eluição da fração α -lactalbumina, isolada por cromatografia de troca aniônica, e purificada por exclusão molecular em coluna preparativa com resina *Sephacryl S-200* em sistema FPLC da Pharmacia. Uma amostra de 5 mL da fração de α -lactalbumina (40 mg/mL) dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,02M, pH 7,0 foi aplicada e eluída da coluna a um fluxo 8,5 mL/min, sendo o tempo total de eluição 3:08 horas e um volume total de tampão (Tris-HCl 0,02M, pH 7,0) 1600 mL.

Segundo FELIPE, LAW, (1997) a cromatografia de troca aniônica e filtração em gel em sistema FPLC podem ser utilizadas para a preparação de frações protéicas do soro em escala laboratorial. Porém, há algumas indicações que através da troca aniônica em sistema FPLC não é possível a completa separação da β -lactoglobulina e da α -lactalbumina das outras frações protéicas menores presentes no soro (GIRARDET, PAQUET, LINDEN, 1989).

Na Tabela 2.3, estão representados o rendimento da β -lactoglobulina, obtida por troca aniônica e da α -lactalbumina obtido por troca aniônica seguida de exclusão molecular.

Tabela 2.3- Rendimento (mg) da β -lactoglobulina e da α -lactalbumina obtidas a partir do concentrado de proteínas de soro de leite (CPS) por cromatografia de troca aniônica (*Q-Sepharose fast flow*) e exclusão molecular (*Sephacryl S-200*).

Etapas do fracionamento	Proteína	
	β -lactoglobulina (mg)	α -lactalbumina (mg)
Amostra injetada (solução de CPS contendo 4% de proteína -100 mL)	2000	800
Troca aniônica	1640	540
Exclusão molecular	-	280
Recuperação final (%)	82	32

A recuperação da β -lactoglobulina obtida por cromatografia de troca iônica foi de 82%. Essa alta recuperação pode ser atribuída ao método e a resina específica utilizados para seu isolamento, uma vez que, alguns estudos (GERBERDING, BYERS, 1998; KRISTIENSEN et al., 1998) mostraram que a cromatografia de troca aniônica em resina *Q Sepharose* é eficiente para a separação da β -lactoglobulina das demais proteínas do soro. Outro fator que

facilitou o isolamento da β -lactoglobulina é o fato desta ser a proteína predominante, representando 50% do total das proteínas no soro.

Para a α -lactalbumina a recuperação foi de 32%. Na troca aniônica recuperou-se 540 mg na fração F3 (Figura 2.3), de uma amostra de CPS contendo 800 mg de α -lactalbumina. A fração F3 foi purificada por exclusão molecular recuperando-se 280 mg de α -lactalbumina da amostra aplicada à coluna de troca aniônica (800 mg de α -lactalbumina), o que representou recuperação final de 32% da α -lactalbumina aplicada. Pode-se visualizar na Figura 2.4 que a fração F3 obtida na troca aniônica apresenta a contaminação de duas frações, reduzindo o rendimento da α -lactalbumina.

A maior dificuldade encontrada para o isolamento da β -lactoglobulina e da α -lactalbumina, mesmo utilizando colunas preparativas, foi o tempo consumido em cada corrida.

2.3.3 Caracterização eletroforética da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina

Na Figura 2.5 estão demonstrados o perfil eletroforético (SDS-PAGE) da α -lactalbumina isolada por cromatografia de troca iônica e purificada por exclusão molecular, o padrão da α -lactalbumina (Sigma), a α -lactalbumina comercial (Davisco Foods) e o CPS.

Observou-se que a α -lactalbumina e outras proteínas presentes em menor concentração no soro apresentaram uma menor afinidade (adsorvida fracamente) pela resina de troca aniônica em relação a β -lactoglobulina. Isto pode ser observado na Figura 2.5 linha 2, onde a fração que está presente a α -lactalbumina apresenta vários contaminantes.

Passando-se a fração de α -lactalbumina, isolada na cromatografia de troca iônica, na coluna de exclusão molecular foi possível remover as proteínas de alto peso molecular e uma pequena contaminação de β -lactoglobulina, conforme pode ser observado na Figura 2.5 linha 3. Essa contaminação de β -Lg ocorre devido os peso moleculares da α -La e β -Lg serem próximos não sendo possível a completa separação. Observa-se na Figura 2.5 linha 4 que a α -La comercial também apresenta esta contaminação com β -lactoglobulina.

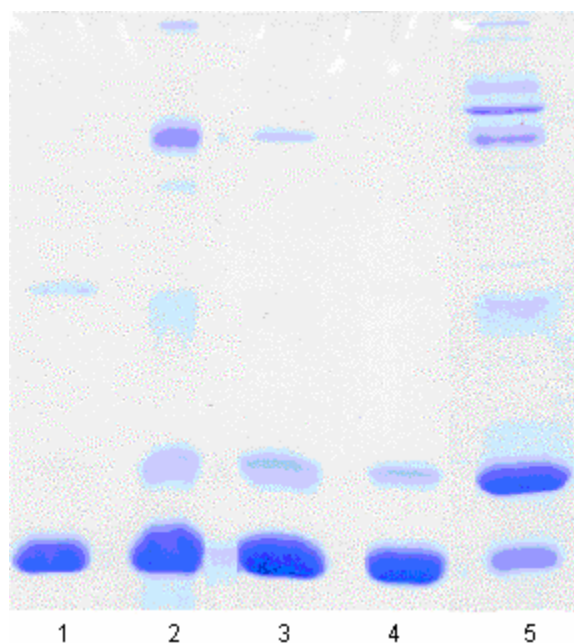


Figura 2.5- Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da α -lactalbumina isolada por cromatografia de troca iônica e purificada por exclusão molecular. Linha 1 padrão Sigma (α -La); Linha 2 α -La isolada por cromatografia de troca iônica a partir do concentrado protéico de soro de leite (CPS); Linha 3 α -La purificada por exclusão molecular a partir da fração isolada por troca iônica; Linha 4 α -La comercial (Daviisco Foods) e Linha 5 CPS.

Na Figura 2.6 estão demonstrados o perfil eletroforético (SDS-PAGE) da β -lactoglobulina obtidas por cromatografia de troca iônica, o padrão da β -lactoglobulina (Sigma) e o CPS.

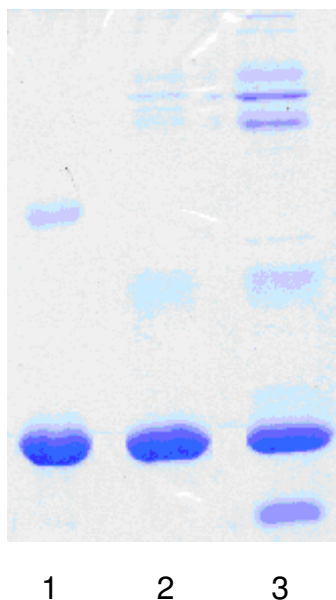


Figura 2.6- Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da β -lactoglobulina obtida por cromatografia de troca iônica. Linha 1 padrão Sigma (β -Lg); Linha 2 β -Lg obtida por troca iônica a partir do CPS e Linha 3 concentrado de proteínas de soro de leite.

Observa-se na Figura 2.6 linha 2, que a β -Lg é facilmente isolada por cromatografia de troca aniônica e apresenta-se com alto grau de pureza.

2.3.4 Hidrólise enzimática da α -lactalbumina e determinação do grau de hidrólise

A pancreatina é um extrato bruto obtido de pâncreas suíno que contém muitas enzimas, incluindo amilase, tripsina, lipase, ribonuclease e protease (SCHMIDT, POLL, 1991).

Na Figura 2.7 está representada a curva de hidrólise em função do tempo de incubação, onde o grau de hidrólise foi monitorado pelo “pH-stat”. O grau de

hidrólise, da α -lactalbumina quando submetida a proteólise com pancreatina na proporção [enzima]/[substrato] = 1:25, após um período de incubação de 4 horas, foi de 21,10% segundo o método proposto por ADLER-NIESSEN (1979). Observou-se que o valor do grau de hidrólise determinado pelo cálculo direto do volume de base consumido durante a hidrólise e a reação com TNBS foi muito próximo.

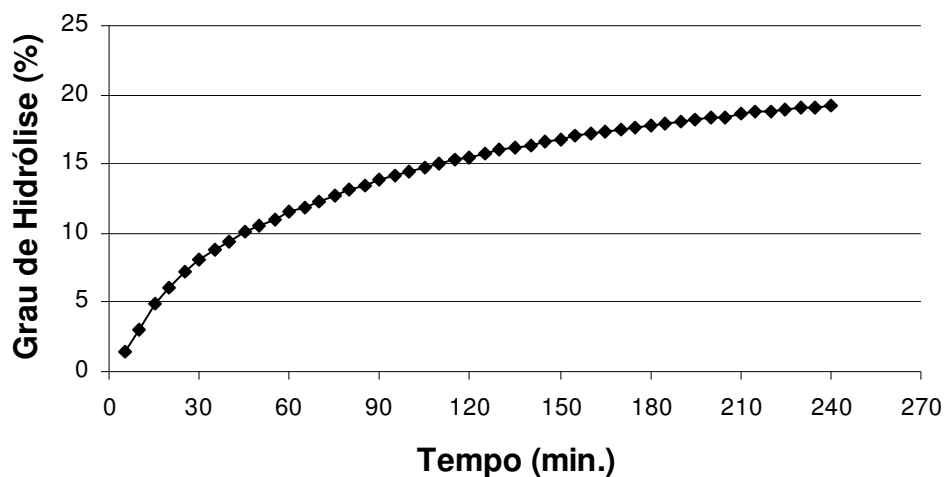


Figura 2.7- Curva de hidrólise da α -lactalbumina com pancreatina (P-1750) monitorado pelo “pH-stat”. Condições de hidrólise: [S]=10% de proteína (p/v); [E]=4% de enzima (p/p); volume 200mL; temperatura de incubação 40°C em pH 7,5.

Observa-se na Figura 2.7 que a velocidade de hidrólise foi maior na primeira hora de incubação, tornando-se cada vez mais lenta, caracterizando o perfil típico da curva de hidrólise da reação enzimática. Segundo GONZALES-TELLO et al. (1994) a diminuição da velocidade da reação enzimática em função do tempo, pode ser devido a três fatores: a) exaustão do substrato, ocasionando decréscimo do número de ligações peptídicas susceptíveis à ação de proteases; b) possível inibição da enzima, causada pelos produtos da hidrólise; c) perda da atividade enzimática por desnaturação da enzima.

SCHMIDT, POLL, (1991) observaram que a α -lactalbumina em tampão bicarbonato de amônio é hidrolisada com um grau de hidrólise muito maior com pancreatina em relação à tripsina, e considerável proporção de peptídios são formados de cadeias longas, que desaparecem depois de prolongado tempo de hidrólise. Neste trabalho não foram calculadas as proporções das frações de alto e baixo peso molecular após seu fracionamento em membrana. Esta caracterização pode ser realizada em trabalhos posteriores, uma vez que, levaria tempo para se definir uma metodologia específica para a identificação destes peptídios.

A α -lactalbumina produzida em laboratório, a α -lactalbumina comercial, a α -lactalbumina comercial hidrolisada e suas frações (maiores e menores que 1 kDa) foram utilizadas em testes biológicos de ação antiulcerogênica.

2.4 CONCLUSÃO

A cromatografia de troca aniônica em resina *Q Sepharose fast flow* mostrou-se adequada para o isolamento da β -lactoglobulina, com 82% de recuperação e elevada pureza. Para a α -lactalbumina esse mesmo sistema não foi totalmente satisfatório pelo fato desta ser eluída com contaminantes de proteínas do soro de leite.

A purificação parcial da α -lactalbumina foi conseguida através da cromatografia de exclusão molecular em resina *Sephacryl S-200*, que ainda foi eluída com alguma contaminação da β -lactoglobulina. A recuperação final da α -lactalbumina, após segunda cromatografia foi de apenas 32%.

O grau de hidrólise da α -lactalbumina pela pancreatina foi de 21,10% após um período de incubação de quatro horas.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.27, n.6, Nov/Dez., p.1256-1262, 1979.
2. ANDREWS, A.T.; TAYLOR, M.D.; OWEN, A.J. Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.348, p.177-185, 1985.
3. A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis, W. Horwitz (ed.), 15th edition, Washington, D. C., 1990.
4. A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis, Cunnif, P. 16th edition, Arlington, Virginia, 1998.
5. BOLLAG, D.M.; ROZYCKI, M.D.; EDLSTEIN, S.J. Proteins Methodos. Second Edition. Wiley-Liss, New York, 1996.
6. BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ohawa v.37, n.8, p.911-917, 1959.
7. BORGES, P.F.Z; SGARBIERI, V.C; JACOBUCCI, H.B; PACHECO, M.T.B; BALDINI, V.L.S. Produção piloto de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v.4, n.52, p.1-8, 2001.
8. FELIPE, X.; LAW, A. J. R. Preparative-scale fractionation of bovine, caprine and ovine whey proteins by gel permeation chromatography. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.64, p. 459-464, 1997.

9. FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Milk Proteins. In: "Dairy Chemistry and Biochemistry". London, Blackie Academic & Professional, 1998.
10. GERBERDING, S.J.; BYERS, C.H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of chromatography A**, Amsterdam, v.808, n.1-2, p.141-151, 1998.
11. GIRARDET, J.M.; PAQUET, D.; LINDEN, G. Effects of chromatography parameters on the fractionation of whey proteins by anion exchange FLPC. **Milchwissenschaft**, Munchen, v.44, n.11, p.692-696, 1989.
12. GONZALES-TELLO, P.; JURADO, E.; PAEZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: 1- Kinetic Models. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.44, n.4, p.523-528, 1994.
13. HAGEL, L. Gel filtration. In: "Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications". Ed. Jan-Christer Janson and Lars Rydén, New York, 1989.
14. HAHN, R.; SCHULZ, P.M.; SCHAUPP, C.; JUNGBAUER, A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.795, n.2, p. 277-287, 1998.
15. KRISTIANSEN, K.R.; OTTE, J.; IPSEN, R.; QVIST, K.B. Large-scale preparation of β -lactoglobulin A and B by ultrafiltration and ion-exchange chromatography. **International Dairy Journal**, Barking, v.8, n.2, p.113-118, 1998.
16. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n.15, p.680-685, 1970.

17. MANJI, B.; HILL, A.; KAKUDA, Y.; IRVINE, DM. Rapid separation of milk whey proteins by anion exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, n.12, p.3176-3179, 1985.
18. MAUBOIS, J.L.; OLLIVIER, G. Extration of milk proteins. In Food Proteins and Their Applications, ed. S. Damodaran and A. Marcel Dekker, New York, p. 575-595, 1997.
19. MORR, C.V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.P.; BUREN, V.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.6, p.1715-1718, 1985.
20. NAKAI, S.; MODLER, H.W. Food Proteins, Properties and Characterization. Wiley – VCH, 1996.
21. SCHMIDT, D.G.; POLL, J.K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v.45, n.4, p.225-240, 1991.
22. SCHMIDT, D.G.; MEIJER, R.J.G.M.; SLANGEN, C.J.; VAN BERESTEIJN, E.C.H. Raising the pH of the pepsin-catalysed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v.25, n.10-12, p.1007-1017, 1995.
23. SMITHERS, G.W.; BALLARD, F.J.; COPELAND, A.D.; 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**, Champaign, v.79, n.8, p.1454-1459, 1996.

24. SPREER, E. Milk as a raw material and food. In "Milk and Dairy product Technology". Translated by Axel Mixa. New York – Edited by Marcel Dekker, Inc., 1998.
25. WONG, C.W.; SEOW, H.F.; HUSBAND, A.J.; REGESTER, G.O.; WATSON, D.L. Effects of purified bovine whey factors on cellular immune functions in ruminants. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, Maio, v.56, n.1-2, p.85-96, 1997.
26. YE, X.; YOSHIDA, S.; NG, T.B. Isolation of lactoperoxidase, lactoterrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin B e β -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Oxford, v.32, n.11-12, p.1143-1150, 2000.
27. YOSHIDA, S. Isolation of β -lactoglobulina and α -lactalbumin by gel filtration using Sephacryl S-200 and purification by Diethylaminoethyl ion-exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, n.9, p.2292-2298, 1990.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

***AÇÃO DA α -LACTALBUMINA E SEUS HIDROLISADOS
NA INIBIÇÃO DE ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA
POR INDOMETACINA E ETANOL EM RATOS***

RESUMO

Os objetivos desta pesquisa foram investigar a atividade antiulcerogênica da α -lactalbumina (produzida em laboratório e comercial) e os hidrolisados da α -lactalbumina (frações de pesos moleculares maiores e menores que 1kDa) na proteção da mucosa gástrica em modelos de úlcera induzidas por indometacina e etanol absoluto em ratos, e investigar as vias metabólicas de ação protetora. Para avaliar a atividade sobre a secreção ácida gástrica foi utilizado o modelo de ligadura do piloro. A participação de substâncias sulfidríla e prostaglandinas na citoproteção gástrica foi avaliada em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto. No modelo de úlcera induzida por indometacina a α -lactalbumina comercial foi a amostra que apresentou ação antiulcerogênica mais significativa, sendo esta não dependente da dose administrada. Para o modelo de úlcera induzida por etanol absoluto a α -lactalbumina (produzida em laboratório e a comercial) e seus hidrolisados (hidrolisado total, fração > 1 kDa e a fração < 1 kDa) apresentaram ação antiulcerogênica na mesma proporção, sendo a ação neste modelo dose-dependente. Quanto à participação na secreção ácida gástrica, observou-se que a fração menor que 1kDa (F1) alterou o volume do conteúdo gástrico e a concentração hidrogeniônica, aumentando o pH estomacal após 4 horas de piloro ligado. A participação de substâncias sulfidríla na citoproteção gástrica foi avaliada pelo seu bloqueio através de um agente alquilante (N-etilmaleimida). A alquilação de grupamentos sulfidríla, eliminou o efeito protetor da α -lactalbumina e seus hidrolisados sobre a mucosa gástrica,

sugerindo que a atividade antiulcerogênica dessa proteína e seus hidrolisados dependem da participação destas substâncias. O tratamento prévio dos animais com indometacina, reduziu a atividade antiulcerogênica sugerindo a participação das prostaglandinas no efeito protetor da α -lactalbumina e seus hidrolisados. A confirmação do envolvimento de prostaglandinas na citoproteção gástrica foi evidenciada pela dosagem de muco aderido à mucosa gástrica e pela quantificação da prostaglandina E₂ na mucosa. A α -lactalbumina intacta (produzida em laboratório e a comercial) aumentou significativamente a concentração de muco aderido (74,11% e 53,83% respectivamente), enquanto que a fração menor que 1kDa aumentou o muco aderido em 34,03%. A fração maior que 1kDa produziu um aumento significativamente menor, de apenas 9,76%. A concentração de PGE₂ na mucosa gástrica também aumentou significativamente tanto para a proteína intacta (α -lactalbumina produzida em laboratório (164,87%) e α -lactalbumina comercial (142,28%). Para as frações do hidrolisado houve um estímulo maior (535,74% para a fração < 1kDa (F1) e 172,93% para a fração > 1 kDa (F2). Estes resultados sugerem portanto que a α -lactalbumina e as frações do hidrolisado protegem a mucosa gástrica estimulando a síntese de prostaglandina.

3.1 INTRODUÇÃO

A integridade da mucosa gástrica é mantida por um balanço entre os fatores agressores e um conjunto de mecanismos de defesa conhecidos como defesa ou barreiras da mucosa gástrica (WALLACE, CHIN, 1997; ABDEL-SALAM et al., 2001).

Existem basicamente dois conjuntos de mecanismos de ação para as drogas antiulcerogênicas. O primeiro deles, refere-se aos mecanismos que controlam o processo de secreção ácida gástrica. O segundo, refere-se aos mecanismos que aumentam a resistência das células da mucosa gástrica contra fatores agressivos, como o ácido clorídrico, a pepsina, a ingestão de etanol e de drogas antiinflamatórias não esteróides e/ou que limitam o acesso destes agentes às células da mucosa (ALLEN et al., 1993).

As prostaglandinas estimulam vários fatores importantes para a manutenção da integridade da mucosa gástrica, tal como a síntese e secreção de muco, secreção de bicarbonato, mantém o fluxo sanguíneo e reparação celular (WILSON, 1991). As prostaglandinas podem prevenir a formação de lesões gástricas, incluindo necroses produzidas em ratos, por uma variedade de agentes necrotizantes, sem reduzir a secreção ácida gástrica (ROBERT, 1979). Possuem propriedades antiulcerogênicas por estimular a secreção de muco e bicarbonato. O muco forma uma camada de gel, que na presença de bicarbonato, dá origem a uma barreira muco-bicarbonato na parede do estômago, que neutraliza o ácido a partir da mucosa gástrica até o duodeno (SELLERS, CARROLL, ALLEN, 1986; ALLEN et al., 1993). A barreira muco-bicarbonato constitui uma das principais defesas da mucosa gástrica, ao ataque do ácido clorídrico, pepsina e substâncias tóxicas às quais o estômago está constantemente exposto (WALLACE, CHIN, 1997).

A mucosa gástrica contém concentrações elevadas de glutathione reduzida, um dos maiores componentes endógenos de substâncias sulfidrilas não protéicas, as quais são significativamente reduzidas pelo etanol. A glutathione e substâncias sulfidrilas protéicas podem estar envolvidas nos mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica por impedirem a ação de radicais livres tóxicos às células da mucosa. Sabe-se, entretanto, que a ocorrência natural de aminoácidos sulfurados como a cisteína e metionina e substâncias sulfidrilas sintéticas podem prevenir essas lesões (SZABO, TRIER, FRANKEL, 1981). As proteínas do soro de leite, por serem ricas em aminoácidos sulfurados e conterem substratos para a síntese da glutathione (BOUNOUS, GOLD, 1991; PARODI, 1998) podem estar envolvidas nos mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos para determinar a atividade antiulcerogênica da α -lactalbumina foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

As amostras estudadas foram a α -lactalbumina produzida em laboratório, a α -lactalbumina comercial (Davisco Foods International, INC.), a α -lactalbumina comercial hidrolisada e duas frações da α -lactalbumina comercial hidrolisada (F1 = fração < 1kDa e F2 = fração > 1 kDa). Em função do baixo rendimento e tempo gasto na obtenção da α -lactalbumina produzida em laboratório utilizamos a α -lactalbumina comercial para obtenção dos hidrolisados e para a determinação da dose efetiva 50% (DE₅₀).

3.2.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso corporal entre 200 e 250g. Os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP e utilizados nos experimentos, após período mínimo de sete dias de adaptação ao biotério, em ciclo de claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 20°C, com água e ração comercial *ad libitum*.

3.2.2 Teste do efeito protetor das amostras em diferentes modelos de indução de úlcera gástrica em ratos

- **Úlcera induzida por indometacina**

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, divididos em grupos de 6 ratos. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada

grupo recebeu, via oral por gavagem, o tratamento correspondente. Tratou-se um dos grupos com solução salina (NaCl 0,9%) no volume de 10 mL/kg de peso corpóreo (pc), (controle negativo), outro grupo com suspensão aquosa de cimetidina (agente antiulcerogênico) na dose de 100 mg/kg de pc (controle positivo), e os demais grupos receberam as diferentes amostras (substâncias teste) na dose de 200 mg/kg de pc, dissolvido em 10 mL de solução salina (grupos teste). Em seguida, os ratos foram alimentados por 8 horas recebendo ração e água, e após jejum de 16 horas receberam a segunda administração dos tratamentos.

Após 30 minutos da administração da segunda dose, cada animal recebeu uma injeção subcutânea de uma suspensão aquosa de indometacina, na dose de 60 mg/kg de pc, de acordo com a metodologia descrita por MORIMOTO et al. (1991).

Seis horas após a administração da indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo seus estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina. Posteriormente, foi realizada a contagem e avaliação das lesões produzidas. O protocolo seguido para o tratamento repetitivo das amostras em modelo de úlcera induzida por indometacina está ilustrado na Figura 3.1.

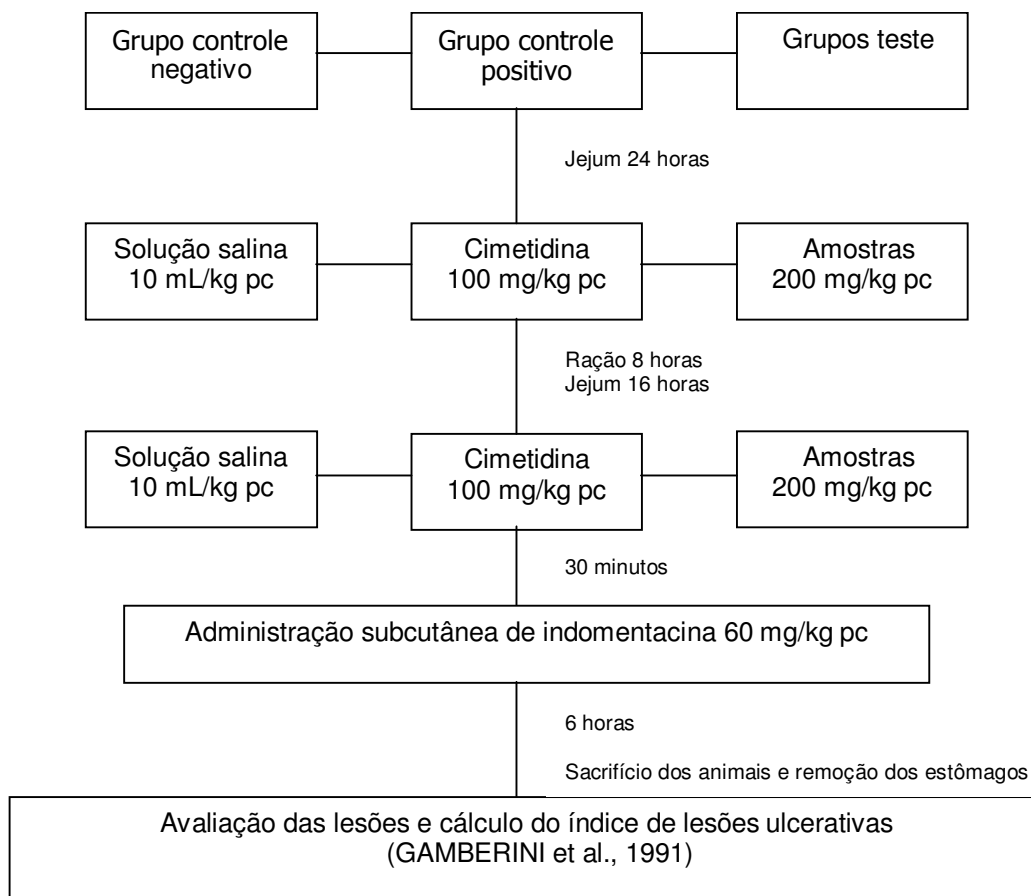


Figura 3.1- Fluxograma do tratamento repetitivo das amostras em modelo de úlcera induzida por indometacina em ratos.

- **Contagem e classificação das lesões**

O índice de lesões ulcerativas (ILU) foi calculado através da somatória dos parâmetros apresentados na Tabela 3.1, de acordo com a metodologia descrita por GAMBERINI et al. (1991).

Tabela 3.1- Parâmetros utilizados na contagem das lesões ulcerativas de acordo com a metodologia descrita por GAMBERINI et al. (1991).

Até 10 petéquias	1 ponto
Até 20 petéquias	2 pontos
Até 30 petéquias	3 pontos
Úlceras de até 1 mm	*n x 2
Úlceras maiores que 1 mm	*n x 3
Hemorragia	1 ponto
Perda de pregas	1 ponto
Perda de coloração	1 ponto

*n = número de lesões encontradas; petéquias (hemorragias puntiformes)

Para a determinação da porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas, apresentados pelo grupo controle positivo e grupo teste, em relação ao grupo controle negativo, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição do ILU} = \frac{\text{média controle negativo} - \text{média amostra}}{\text{média controle negativo}} \times 100$$

• Úlcera induzida por etanol

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, divididos em grupos de 6 ratos. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo recebeu, via oral por gavagem, o tratamento correspondente. Tratou-se um dos grupos com solução salina (NaCl 0,9%) no volume de 10 mL/kg de peso corpóreo (pc), (controle negativo), outro grupo com solução aquosa de carbenoxolona (agente antiulcerogênico) na dose de 200 mg/kg de pc (controle positivo), e os demais grupos receberam as diferentes amostras na dose de 200 mg/kg de pc, dissolvidas em 10 mL de solução salina (grupos teste). Em seguida, os ratos foram alimentados por 8 horas recebendo ração comercial e água, e após

jejum de 16 horas receberam a segunda administração dos respectivos tratamentos.

Após 30 minutos da administração da segunda dose, cada animal recebeu por via oral 1,0 mL de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por ROBERT (1979).

Após 1 hora da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo seus estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para a realização da contagem e avaliação das lesões produzidas. Posteriormente, foi calculado o ILU, de acordo com a metodologia descrita por GAMBERINI et al. (1991), conforme descrito na Tabela 3.1. O protocolo seguido para o tratamento repetitivo das amostras em modelo de úlcera induzida por etanol está ilustrado na Figura 3.2.

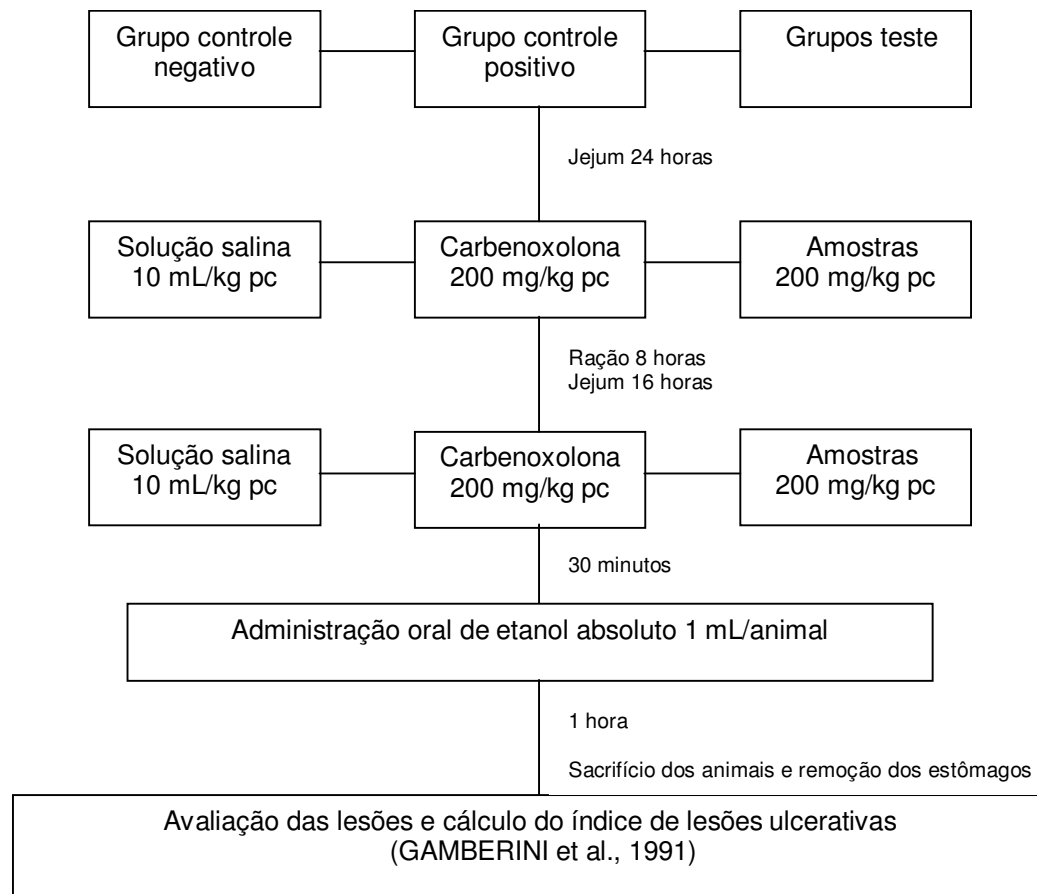


Figura 3.2- Fluxograma do tratamento repetitivo das amostras em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.

3.2.3 Determinação da dose efetiva 50% (DE₅₀)

A dose efetiva 50% (DE₅₀) corresponde a dose necessária para produzir inibição de 50% nas lesões observadas, em comparação com o controle negativo, sendo esta, determinada para o modelo de úlcera induzida por indometacina (MORIMOTO et al., 1991) e úlcera induzida por etanol absoluto (Robert, 1979). A dose efetiva 50% foi determinada somente para a α -lactalbumina comercial, onde os ratos receberam duas doses da proteína em dias consecutivos.

A dose efetiva (DE_{50}), foi estimada através da construção de uma curva dose-efeito. Para tanto, os animais foram tratados oralmente com doses crescentes da α -lactalbumina comercial (100, 200, 350 e 500 mg/kg de peso corpóreo).

A DE_{50} foi determinada através de equação de regressão linear ($y = ax + b$), bem como seu coeficiente de correlação (r).

3.2.4 Estudo das vias e/ou mecanismos de ação específica nos processos de proteção da mucosa gástrica

- **Ligadura do piloro**

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g. Após um período de 24 horas em jejum, com livre acesso à água, os animais foram divididos em grupos de 7 ratos, anestesiados por inalação de éter etílico. Em seguida foi realizada tricotomia na região abdominal, incisão para exposição do estômago e duodeno, e a ligadura do piloro com linha cirúrgica de algodão.

Após a ligadura, cada grupo de animais recebeu, por via intraduodenal, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 mL/kg de peso corpóreo (controle negativo), outro grupo com suspensão aquosa de cimetidina, na dose de 100 mg/kg de pc (controle positivo) e os demais grupos receberam as diferentes amostras, na dose de 200 mg/kg de pc (grupos teste), dissolvidas em solução salina.

O abdômen foi então suturado e após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e posterior retirada e abertura do estômago. Segundo a metodologia de SHAY et al. (1945), foi determinado o volume do conteúdo estomacal, seu pH e a quantidade de íons H^+ (mEq/L),

através de titulação com solução de NaOH 0,1N, utilizando-se solução de fenolftaleína a 1% como indicador. A concentração de ácido total em mEq/L foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$[\text{total de ácido}] = \frac{\text{fator } 1,825 \times \text{Volume NaOH (mL)}}{\text{Volume Gástrico (mL)}}$$

• Participação das substâncias sulfidrila na citoproteção gástrica

Para estudar a possível participação de substâncias sulfidrila na citoproteção gástrica utilizou-se o modelo de úlcera induzida por etanol.

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, divididos em grupos de 6 ratos. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, um grupo controle negativo e os grupos teste, receberam tratamentos prévios com uma solução aquosa de N-etilmaleimida (NEM) na dose de 10 mg/kg (2,5 mL/kg pc) de peso corpóreo, por via subcutânea, de acordo com a metodologia descrita por SZABO, TRIER, FRANKEL (1981).

Após 30 minutos da administração subcutânea de NEM, os animais dos grupos controle negativo foram tratados com solução salina no volume de 10mL/kg de pc, e os grupos teste receberam as diferentes amostras na dose de 200 mg/kg de pc, dissolvidas em solução salina.

Após 30 minutos da administração das amostras, cada animal recebeu por via oral 1,0mL de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por ROBERT (1979).

Decorrida 1 hora da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo seus estômagos retirados, abertos

ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para a realização da contagem e avaliação das lesões produzidas. Posteriormente, foi calculado o ILU, de acordo com a metodologia descrita por GAMBERINI et al. (1991), conforme descrito na Tabela 3.1. O protocolo seguido para o modelo de indução de úlcera por etanol absoluto com tratamento prévio de NEM está ilustrado na Figura 3.3.

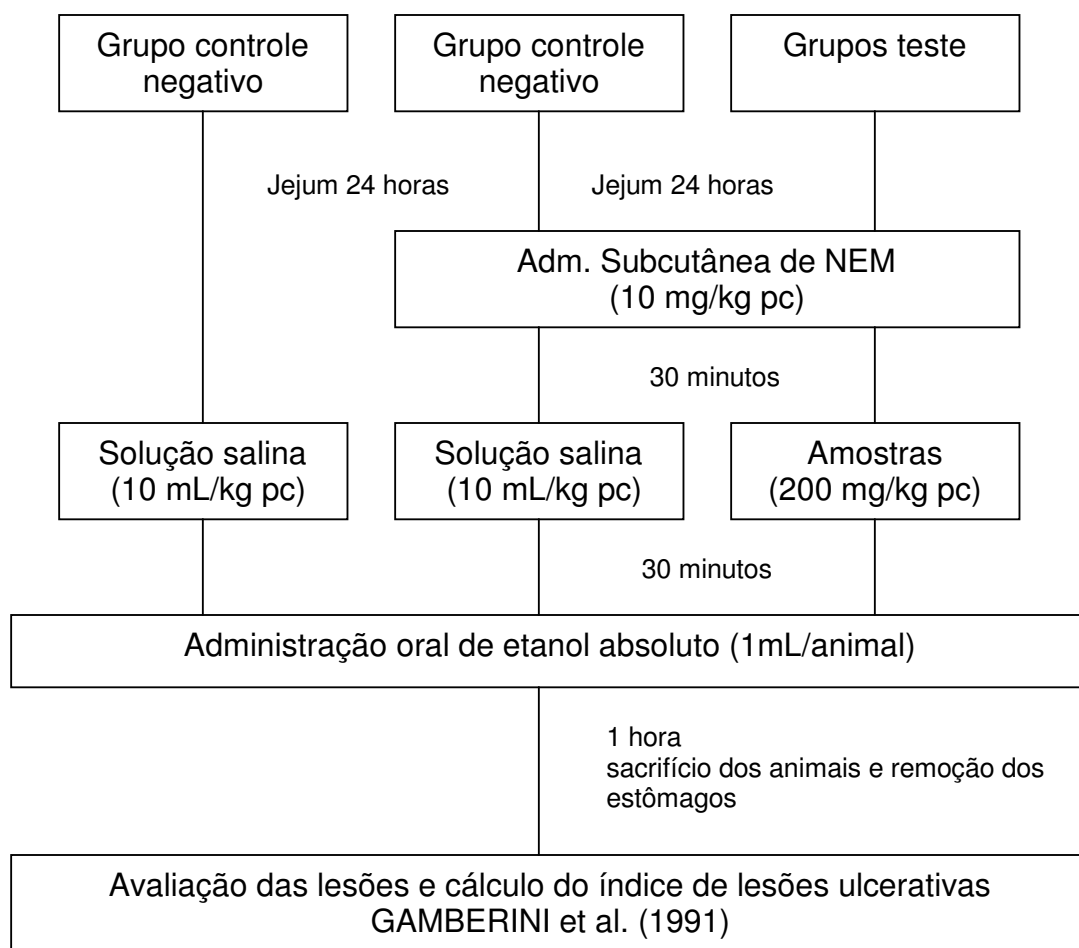


Figura 3.3- Fluxograma da administração subcutânea de N-etilmaleimida (NEM) em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.

- **Participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica**

Para estudar a possível participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica utilizou-se o modelo de indução de úlcera por etanol absoluto.

Foram utilizados ratos *wistar* machos, pesando entre 200 e 250 g, divididos em grupos de 6 ratos. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, os animais dos grupos teste receberam as diferentes amostras na dose de 200 mg/kg de pc. Em seguida, os ratos dos grupos controle negativo e grupos teste foram alimentados por 8 horas recebendo ração e água. Após um período de jejum de 16 horas, um grupo controle negativo e os grupos teste, receberam tratamentos prévios de indometacina na dose de 5 mg/kg de pc, em solução aquosa, na dose de 10mL/kg pc por via intraperitoneal, de acordo com a metodologia descrita por KONTUREK e PAWLINK (1986).

Trinta minutos após a administração intraperitoneal de indometacina, os animais dos grupos controle negativo foram tratados com solução salina no volume de 10 mL/kg de pc, e os grupos teste receberam a segunda dose de amostras (200 mg/kg de pc), dissolvidas em solução salina.

Após 30 minutos da administração da segunda dose, cada animal recebeu por via oral 1,0 mL de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por ROBERT (1979).

Decorrido 1 hora da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo seus estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para a realização da contagem e avaliação das lesões produzidas. Posteriormente, foi calculado o ILU, de acordo com a metodologia descrita por GAMBERINI et al. (1991), conforme descrito na Tabela 3.1.

O protocolo seguido para o modelo de indução de úlcera por etanol com o bloqueio da síntese de prostaglandinas pela indometacina está ilustrado na Figura 3.4.

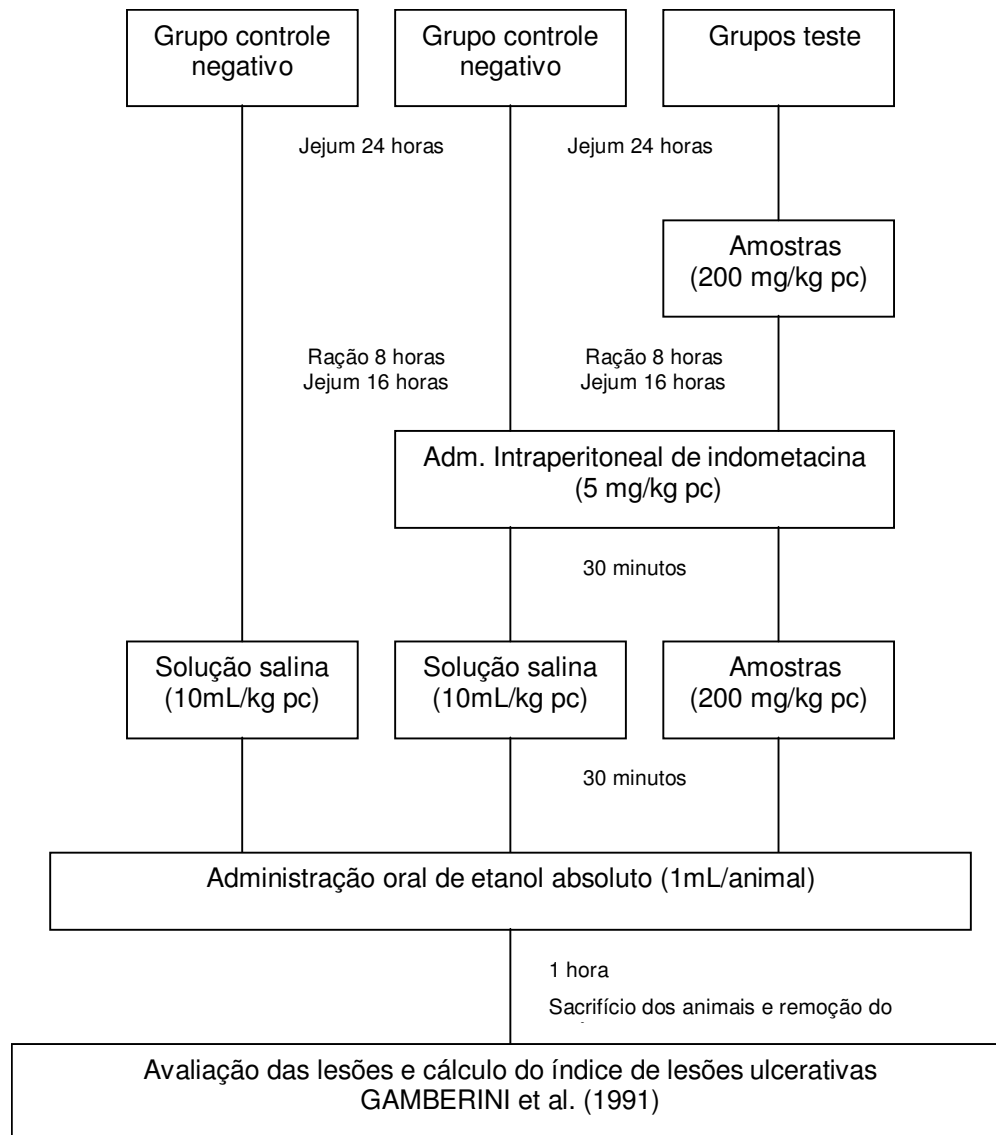


Figura 3.4- Fluxograma da administração intraperitoneal de indometacina em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.

- **Determinação quantitativa de muco aderido à mucosa gástrica**

Após um período de 24 horas em jejum, com livre acesso a água, os animais foram divididos em grupos de 6 ratos. Cada grupo de animais recebeu por via oral, o tratamento correspondente, ou seja, solução salina (10 mL/kg de peso corpóreo) como controle negativo, carbenoxolona na dose de 200 mg/kg de pc

(controle positivo), e os demais grupos receberam as diferentes amostras (α -La produzida em laboratório, α -La comercial, F1 e F2) na dose de 200 mg/kg de pc, administradas em dois dias consecutivos (dose repetitiva). Após uma hora da segunda administração, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0,9% para a posterior determinação quantitativa do muco gastroprotetor.

Assim, foi retirada a região fúndica do estômago, sendo o corpo glandular pesado e mergulhado em 10 mL de solução “Alcian Blue” 0,1% por um período de 2 horas. Em seguida, os estômagos foram submetidos à lavagem com 10 mL de solução de sacarose 0,25 M por 2 vezes, sendo a primeira por 15 minutos e a segunda por 45 minutos.

A seguir, os estômagos foram transferidos para tubos contendo 10 mL de solução de $MgCl_2$ 0,5 M por duas horas para a extração do corante complexado com o muco gástrico. Com a solução obtida foi feita uma emulsão com 10 mL de éter etílico. Esta emulsão foi centrifugada por 15 minutos a 3600 rpm, sendo a fase etérea desprezada e a fase aquosa, submetida à leitura espectrofotométrica em 598 nm, conforme a metodologia modificada de CORNE et al. (1974). A concentração de “Alcian Blue” ligado ao muco gástrico foi determinada por interpolação na curva padrão do corante expressa em μg de corante/g de tecido úmido.

• Determinação quantitativa de prostaglandina E_2 (PGE_2) na mucosa gástrica em ratos

Após um período de 24 horas em jejum, com livre acesso à água, os animais foram divididos em grupos de 6 ratos. Cada grupo de animais recebeu por via oral, o tratamento correspondente, ou seja, solução salina (10 mL/kg) como

controle negativo, e os demais grupos receberam as amostras (α -La produzida em laboratório, α -La comercial, e das frações do hidrolisado F1 e F2) na dose de 200 mg/kg de pc, administradas em dois dias consecutivos (dose repetitiva).

Após uma hora da segunda administração, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0,9%. A porção fúndica foi removida e a porção glandular inteira que constituiu o material de análise neste modelo, foi pesada e cortada em minúsculos fragmentos com o auxílio de tesoura e bisturi. Estes fragmentos, foram imediatamente colocados em tubos de polipropileno contendo 6 mL de etanol gelado (mantido em freezer) contendo indometacina a 100 μ M, substância utilizada para bloquear neste momento, a síntese de prostaglandinas. Os tubos foram agitados vigorosamente por cerca de um minuto e posteriormente, foram centrifugados a 2500 rpm por cinco minutos.

Após a centrifugação, 1 mL do sobrenadante obtido, foi transferido para um outro tubo de polipropileno contendo 10 μ L de ácido acético glacial. Estes tubos foram novamente centrifugados por três minutos a 2500 rpm e o sobrenadante obtido, foi utilizado como amostra contendo a prostaglandina do tipo E₂ (PGE₂) a ser quantificada.

A purificação de cada uma das amostras obtidas na etapa anterior, foi realizada em minicolunas cromatográfica C18 AMPREP Amersham Pharmacia Biotech. Estas minicolunas foram inicialmente tratadas com 2 mL (volume da coluna = 1 mL) de etanol a 10 %. Sequencialmente, 0,8 mL do sobrenadante obtido a partir dos tubos centrifugados na etapa anterior foram aplicados sobre as colunas, sempre com auxílio de um dispositivo que permite o encaixe de uma seringa, para que seja exercida pressão durante a aplicação das amostras. Após este procedimento, foi realizada a lavagem das minicolunas com 1 mL de água destilada e posteriormente, com 1 mL de hexano, tendo sido descartados estes solventes. A seguir, foi feita a eluição das minicolunas, para a obtenção da PGE₂,

a ser quantificada, com dois volumes de 0,75 mL de acetato de etila, que foram coletados em novos tubos de polipropileno.

Estas amostras, em acetato de etila, presentes nos tubos de polipropileno foram levadas à secura em concentrador específico, à vácuo, a uma temperatura de 30° C. Após a secura, o material presente nos tubos (PGE₂), foi ressuspendido em 500 µL do tampão do ensaio já diluído, fornecido pelo kit Amersham Pharmacia Biotech (RPN 222).

Este material ressuspendido no tampão foi utilizado na execução do ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as normas gerais do protocolo nº 1 do referido kit (Amersham Pharmacia Biotech RPN 222).

3.2.5 Análise estatística

Todos os resultados dos experimentos com a participação das frações protéicas na proteção da mucosa gástrica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste de *Duncan*, para os quais, foi utilizado como critério de significância estatística o nível crítico de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Avaliação da atividade antiulcerogênica

- Úlcera induzida por indometacina

No modelo de úlcera induzida por indometacina a α -lactalbumina comercial, em dose repetitiva de 200 mg/kg de peso corpóreo (pc), apresentou uma porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas (%ILU) de 49,63%, a α -lactalbumina produzida em laboratório 30,81% e a α -lactalbumina comercial hidrolisada 25,83%. A droga antiulcerogênica (cimetidina) utilizada como controle positivo, na dose de 100 mg/kg de pc, reduziu o ILU em 69,00%. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU e a % de inibição do ILU estão apresentados na Figura 3.5.

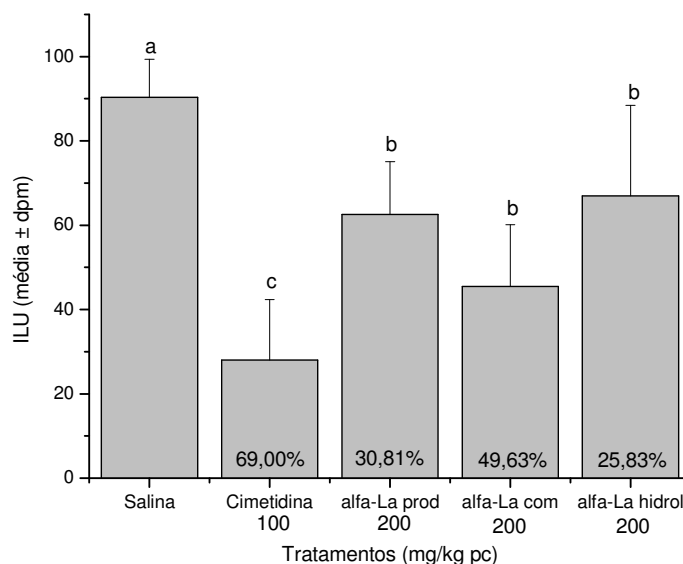


Figura 3.5- Efeito do tratamento repetitivo da α -lactalbumina (produzida em laboratório, comercial, α -La comercial hidrolisada) e da cimetidina no modelo de úlcera induzida por indometacina. (ANOVA $F_{(4,19)} = 8,85$ $p < 0,001$). Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% significância ($p < 0,05$), em relação à salina.

- **Determinação da dose efetiva 50% (DE₅₀) no modelo de úlcera induzida por indometacina**

A atividade antiulcerogênica apresentada pela α -lactalbumina comercial no modelo de úlcera induzida por indometacina, quando administrada oralmente em doses repetitivas de 100, 200, 350 e 500 mg/kg de pc, mostrou-se não dependente da dose administrada. Os resultados expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU e a % de inibição do ILU estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Curva dose efeito da α -lactalbumina comercial (dose repetitiva) no modelo de úlcera induzida por indometacina.

Tratamento	Dose	ILU (média \pm dpm)	% inibição ILU
Salina	10 mL	108,33 \pm 21,43 ^a	
α -La comercial	100 mg/kg pc	110,00 \pm 9,54 ^a	0
α -La comercial	200 mg/kg pc	56,00 \pm 12,33 ^b	48,31
α -La comercial	350 mg/kg pc	52,75 \pm 14,13 ^b	51,31
α -La comercial	500 mg/kg pc	52,30 \pm 16,29 ^b	51,54

ANOVA $F_{(4,18)} = 15,56$ $p < 0,001$. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), em relação à salina.

- **Úlcera induzida por etanol absoluto**

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto a α -lactalbumina (produzida em laboratório, comercial e α -La comercial hidrolisada) administrada por gavagem, em dose repetitiva de 200 mg/kg de pc, apresentaram inibição do ILU de 40,21%, 38,96% e 41,47% respectivamente, enquanto a carbenoxolona

(controle positivo), administrada pela mesma via, na dose de 200 mg/kg de pc, foi capaz de reduzir o ILU em 90,80%. Os resultados de inibição do ILU foram estatisticamente significativos ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU e a % de inibição do ILU estão apresentados na Figura 3.6.

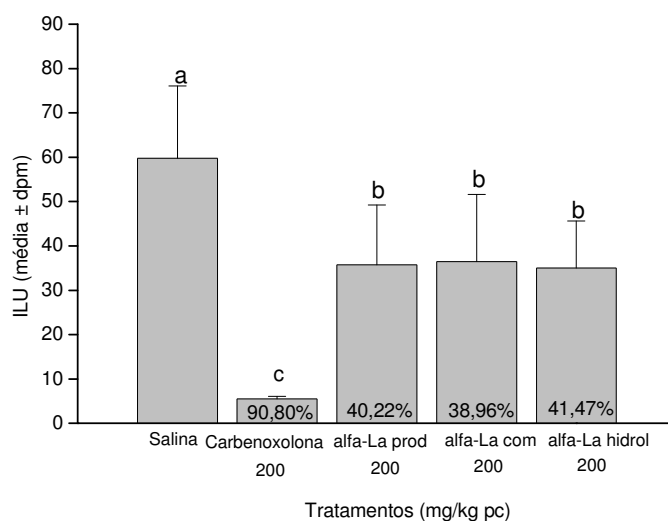


Figura 3.6- Efeito do tratamento repetitivo da α -lactalbumina (produzida em laboratório, comercial e da α -lactalbumina comercial hidrolisada) e carbenoxolona em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto. (ANOVA $F_{(4,19)} = 9,70$ $p < 0,001$). Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), em relação à salina.

Uma vez que a α -lactalbumina comercial hidrolisada apresentou atividade antiulcerogênica (41,47%) no modelo úlcera induzida por etanol, determinou-se a atividade de duas frações de seu hidrolisado. Na Figura 3.7 estão representadas a inibição do ILU das duas frações da α -lactalbumina comercial hidrolisada em relação à salina. A fração F1, de peso molecular menor que 1kDa, apresentou uma inibição do ILU de 43,34% e a fração F2, correspondente a fração de peso molecular maior que 1kDa, inibiu o ILU em 42,59%.

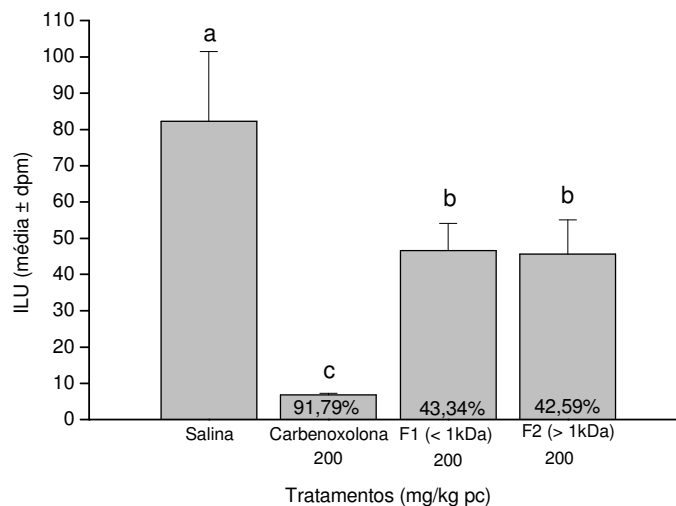


Figura 3.7- Efeito do tratamento repetitivo da fração < 1kDa (F1) e da fração > 1kDa (F2) da α -lactalbumina comercial hidrolisada e carbenoxolona em modelos de úlcera induzida por etanol. (ANOVA $F_{(3,15)} = 32,11$ $p < 0,001$). Letras diferentes indicam diferença ao nível 5% de significância ($p < 0,05$), em relação à salina.

- **Úlcera induzida por etanol 60% + 100 mM HCl**

Realizou-se este experimento para comparar a diferença entre o modelo de indução de úlcera utilizado por MATSUMOTO et al. (2001) e o modelo de indução de úlcera utilizado nesta pesquisa. MATSUMOTO et al. (2001) induziram a úlcera com etanol 60% + 100 mM HCl.

No modelo de úlcera induzida por etanol 60% + 100 mM HCl a α -lactalbumina comercial administrada por gavagem, em dose repetitiva de 200 mg/kg de pc, apresentou inibição do ILU de 46,49%, enquanto a carbenoxolona, administrada na mesma via, na dose de 200 mg/kg de pc, foi capaz de reduzir o ILU em 90,27%. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU e a % de inibição do ILU estão apresentados na Figura 3.8.

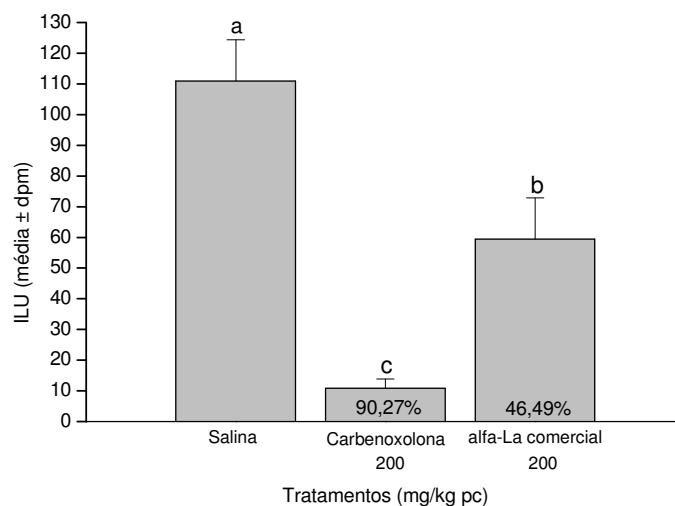


Figura 3.8- Efeito do tratamento repetitivo da α -lactalbumina comercial e da carbenoxolona em modelos de úlcera induzida por etanol+HCl (etanol 60% + 100mM HCl). (ANOVA $F_{(2,12)} = 101,24$ $p < 0,001$). Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), em relação à salina.

- **Determinação da dose efetiva 50% (DE₅₀) no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto**

A atividade antiulcerogênica apresentada pela α -lactalbumina comercial no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, quando administrada oralmente em doses repetitivas de 100, 200, 350 e 500 mg/kg de pc, apresentou uma DE₅₀, calculada por regressão linear, de 256,87 mg/kg de pc. Os resultados expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU e a % de inibição do ILU estão apresentados na Tabela 3.3 e o valor da DE₅₀ foi calculado pela equação da reta $y = 0,16x + 8,90$ e está apresentada na Figura 3.9.

Tabela 3.3- Resultados da dose efeito da α -lactalbumina comercial (dose repetitiva) no modelo de úlcera induzida por etanol.

Tratamento	Dose	ILU (média \pm dpm)	% inibição ILU
Salina	10 mL	77,50 \pm 18,58 ^a	
α -La comercial	100 mg/kg pc	61,60 \pm 20,72 ^a	20,52
α -La comercial	200 mg/kg pc	31,33 \pm 6,06 ^b	59,57
α -La comercial	350 mg/kg pc	23,40 \pm 6,69 ^b	69,81
α -La comercial	500 mg/kg pc	15,80 \pm 6,10 ^b	79,61

Anova $F_{(4,22)} = 21,29$ $p < 0,001$. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), em relação à salina.

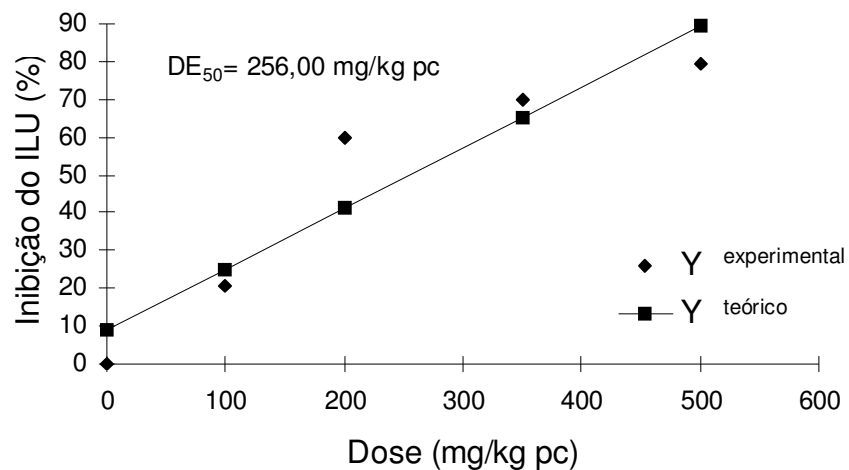


Figura 3.9- Curva dose efetiva 50% da α -lactalbumina comercial no modelo de úlcera induzida por etanol ($y = 0,16x + 8,90$ e $r = 0,95$).

3.3.2 Estudo dos mecanismos de ação antiulcerogênica

• Ligadura do piloro

Para avaliar a participação da secreção ácida gástrica na atividade antiulcerogênica, a α -lactalbumina comercial e seus hidrolisados foram testados em ratos submetidos à ligadura pilórica. Foram avaliados os efeitos dos tratamentos sobre o pH, volume e concentração do ácido total estomacal. A Tabela 3.4 apresenta o efeito das amostras sobre o pH, volume gástrico e concentração do ácido total estomacal após 4 horas de piloro ligado.

Tabela 3.4- Efeitos da administração intraduodenal da α -lactalbumina comercial, das frações maiores e menores que 1 kDa, e da cimetidina sobre o pH, volume gástrico e concentração de ácido total estomacal de ratos com piloro ligado por 4 horas.

Amostra	Dose (mg/kg pc)	Nº de animais	Volume gástrico (mL)	pH gástrico	[H ⁺] (mEq/L)
Controle	10 mL/kg	5	3,0 ± 0,2 ^a	1,5 ± 0,6 ^c	1,2 ± 0,2 ^a
Cimetidina	100	4	1,4 ± 0,4 ^b	4,5 ± 0,6 ^a	0,6 ± 0,2 ^b
α -La comercial	200	5	3,4 ± 0,2 ^a	1,5 ± 0,5 ^c	1,2 ± 0,1 ^a
F1 (< 1kDa)	200	5	1,9 ± 0,6 ^b	3,0 ± 0,6 ^b	1,0 ± 0,1 ^b
F2 (> 1kDa)	200	5	2,3 ± 0,4 ^b	1,5 ± 0,5 ^c	1,2 ± 0,1 ^a

(Volume gástrico anova $F_{(4,20)} = 16,38$ $p < 0,001$; pH anova $F_{(4,21)} = 24,4$ $p < 0,001$; [H⁺] anova $F_{(4,24)} = 13,84$ $p < 0,001$). Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), em relação à salina.

Os resultados revelaram que a α -lactalbumina comercial não alterou o volume gástrico, pH e a concentração de ácido total. A fração menor que 1kDa (F1) diminuiu o volume gástrico, aumentou o pH e diminuiu a acidez total da secreção. A fração maior que 1 kDa (F2) reduziu o volume gástrico e não alterou o pH e a concentração hidrogeniônica do estômago.

• **Estudo da participação das substâncias sulfidríla na citoproteção gástrica**

Para avaliar a participação de substâncias sulfidríla na citoproteção gástrica, administrou-se previamente aos tratamentos N-etilmaleimida (NEM), um alquilante dos grupos sulfidríla, na dose de 10 mg/kg de pc, por via subcutânea 30 minutos antes da administração das amostras (α -lactalbumina comercial, e das frações do hidrolisado F1 e F2).

Observa-se na Tabela 3.5, que há um aumento no índice de lesões ulcerativas quando os ratos recebem uma administração prévia de NEM comparada ao grupo de ratos que recebem somente a solução salina. Este aumento ocorre devido a alquilação dos grupamentos sulfidríla presentes naturalmente na mucosa gástrica tornando assim as substâncias sulfidríla indisponíveis para proteger a mucosa gástrica. Este mesmo efeito pode ser observado com os grupos que receberam somente as amostras e os grupos que receberam previamente o NEM em seguida as amostras.

A alquilação de grupamentos sulfidríla eliminou o efeito protetor da α -lactalbumina comercial e suas frações do hidrolisado sobre a mucosa gástrica, sugerindo, portanto, que as substâncias sulfidríla presentes naturalmente na mucosa gástrica e presentes nas amostras, podem ter participação nos mecanismos da citoproteção gástrica.

Observa-se também na Tabela 3.5 que a α -lactalbumina e seus hidrolisados quando administradas em dose única (200 mg/kg de pc, via oral por gavagem), não apresentaram atividade antiulcerogênica significativa comparados apenas com a salina. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU e a % de inibição do ILU estão mostrados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5- Efeito do bloqueio das substâncias sulfidrila no índice de lesões ulcerativas para a α -lactalbumina comercial e para as frações F1 e F2 em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos tratados previamente com NEM, comparados com ratos não tratados.

Tratamento	ILU	% inibição do ILU (relação à salina) ¹	% de aumento do ILU causado pelo tratamento com NEM ²
Salina	59,50 \pm 15,41 ^b		25,00
Salina + NEM	79,33 \pm 4,51 ^a	-	
La	47,33 \pm 16,55 ^b	20,45	49,76
La + NEM	94,20 \pm 21,92 ^a	-	
F1	52,40 \pm 14,96 ^b	11,93	32,39
F1 + NEM	77,50 \pm 10,13 ^a	-	
F2	47,20 \pm 17,14 ^b	20,67	38,06
F2 + NEM	76,20 \pm 20,27 ^a	-	

(ANOVA $F_{(7,33)} = 5,85$ $p < 0,0002$). Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). ¹ cálculo baseado no tratamento apenas com salina como controle. ² cálculo baseado em cada tratamento + NEM como controle.

• Estudo da participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica

Para avaliar a participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica, administrou-se previamente a indometacina, um inibidor da ciclooxigenase, na dose de 5 mg/kg de pc, por via intraperitoneal 30 minutos antes da administração das amostras (α -lactalbumina produzida em laboratório, α -lactalbumina comercial, e as frações do hidrolisado F1 e F2).

Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU e a % de inibição do ILU, estão apresentados na Figura 3.10.

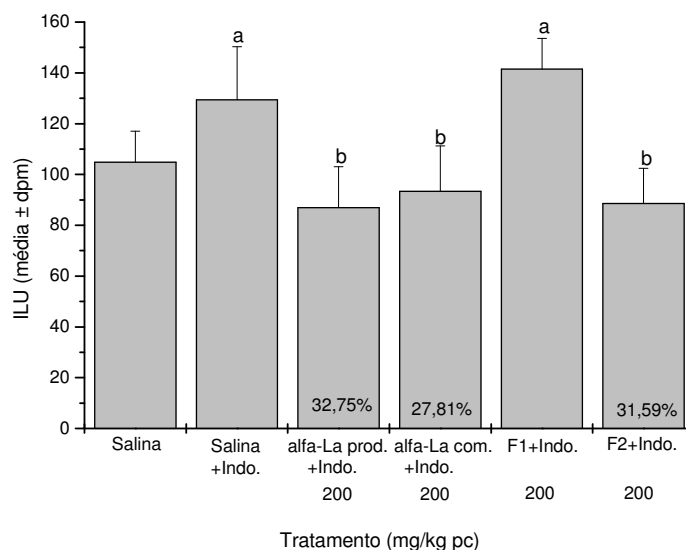


Figura 3.10- Efeito do tratamento repetitivo da α -lactalbumina (produzida em laboratório e comercial) e das frações do hidrolisado F1 e F2 em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos tratados previamente com indometacina. (ANOVA $F_{(5,26)} = 7,66$ $p < 0,001$). Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), em relação à salina + indometacina.

Analizando-se o efeito da indometacina nos tratamentos da Figura 3.10, observa-se um aumento no ILU quando os ratos recebem salina + indometacina, sugerindo que a inibição da prostaglandina diminui a proteção gástrica. Nos tratamentos da α -La produzida em laboratório, α -La comercial e a fração F2 do hidrolisado de α -La comercial (PM>1kDa) o tratamento com indometacina não impediu que essas amostras exerçam efeito protetor significativo sobre a mucosa gástrica, sugerindo que essas amostras dependeram menos da prostaglandina na sua proteção à mucosa. Por outro lado, a proteção exercida pela fração do hidrolisado de baixo peso molecular (F1) mostrou uma dependência maior da prostaglandina, sendo sua proteção eliminada totalmente na presença da indometacina.

- **Determinação quantitativa do muco aderido à mucosa gástrica**

A secreção de muco gástrico foi quantificada 1 hora após a administração das amostras (α -lactalbumina produzida em laboratório, α -lactalbumina comercial, F1 e F2). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.6, demonstrando os valores médios em μg de corante “Alcian Blue”/g de tecido úmido.

Tabela 3.6- Efeito da α -lactalbumina (produzida em laboratório e comercial), frações do hidrolisado (F1 e F2) e da carbenoxolona sobre a formação de muco gástrico.

Amostra	Dose (mg/kg pc)	Nº animais	Quantidade de muco (μ g Alcian Blue/g tecido)	% aumento
Salina	10 mL/kg	4	73,44 \pm 9,43 ^d	--
Carbenoxolona	200	6	121,40 \pm 11,27 ^b	65,30
α -La produzida	200	5	127,87 \pm 14,35 ^a	74,11
α -La comercial	200	6	112,97 \pm 6,48 ^b	53,83
F1 (< 1kDa)	200	5	98,43 \pm 6,35 ^c	34,03
F2 (> 1kDa)	200	6	80,61 \pm 12,61 ^d	9,76

ANOVA $F_{(5,26)} = 22,15$ $p < 0,001$. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), em relação à salina.

Observa-se na Tabela 3.6 que a α -La produzida em laboratório na dose de 200 mg/kg de pc aumentou o muco aderido à mucosa gástrica em 74,11%, e a α -La comercial proporcionou aumento de 53,83%, não havendo diferença estatística com a carbenoxolona, cujo aumento foi de 65,32%. A fração F1 aumentou o muco aderido em 34,03% e a fração F2 não apresentou aumento significativo, de apenas 9,76%, em relação ao tratamento com salina.

• **Determinação da concentração de prostaglandina E₂ (PGE₂) na mucosa gástrica**

Foi avaliada a propriedade da α -lactalbumina (produzida em laboratório e a comercial) e das frações do hidrolisado de α -lactalbumina comercial (F1 e F2) estímulo à síntese de prostaglandina na mucosa gástrica. Os resultados obtidos

estão apresentados na Tabela 3.7, demonstrando os valores médios em pg/mg de tecido.

Tabela 3.7- Efeito da α -lactalbumina (produzida em laboratório e comercial) e seus hidrolisados na síntese de prostaglandina na mucosa gástrica de ratos.

Amostra	Dose (mg/kg pc)	Nº animais	[] PGE ₂ na mucosa (pg/mg tecido)	% variação em relação salina
Salina	10 mL/kg	5	25,81 ± 9,73 ^d	--
Indometacina	30	5	7,85 ± 4,72 ^d	-69,59
Carbenoxolona	200	3	298,66 ± 25,74 ^a	1057,15
α -La produzida	200	4	68,36 ± 14,22 ^c	164,87
α -La comercial	200	3	62,53 ± 21,06 ^c	142,28
F1 (< 1kDa)	200	4	164,09 ± 15,60 ^b	535,74
F2 (> 1kDa)	200	4	70,44 ± 15,17 ^c	172,93

Anova $F_{(6,21)} = 157,98$ $p < 0,001$. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), em relação à salina.

Os dados demonstraram que o tratamento prévio dos ratos com indometacina reduziu em 69,59% e a carbenoxolona aumentou em 1057,15% a quantidade de prostaglandina sintetizada na mucosa gástrica em relação aos níveis quantificados na mucosa dos ratos tratados com salina.

A α -lactalbumina produzida em laboratório, a α -lactalbumina comercial, a fração do hidrolisado de α -lactalbumina comercial menor que 1 kDa (F1) e a fração maior que 1 kDa (F2) aumentaram em níveis estatisticamente significativos a quantidade de PGE₂ na mucosa gástrica (164,87%; 142,28%; 535,74% e 172,93%, respectivamente).

3.4 DISCUSSÃO

Estudos com o concentrado de proteína de soro de leite (ROSANELI et al., 2002, ROSANELI, 2002, Pacheco et al, 2004, ROSANELI et al. 2004) e com a α -lactalbumina (MATSUMOTO et al., 2001) demonstraram que estas proteínas apresentam atividade antiulcerogênica. MATSUMOTO et al. (2001) sugeriram que a α -lactalbumina é a proteína responsável pelo efeito protetor da mucosa gástrica pelas frações protéicas do soro de leite. Em continuação a esses estudos, o presente trabalho avaliou a atividade antiúlcera da α -lactalbumina (produzida em laboratório e a comercial) e duas frações de hidrolisado (F1 e F2) da α -lactalbumina comercial, visando determinar os níveis de ação protetora e as vias metabólicas envolvidas na atividade antiulcerogênica atribuída a estas proteínas.

Para avaliar a atividade antiulcerogênica da α -lactalbumina foram utilizados dois modelos de lesões gástricas: a úlcera induzida por etanol absoluto (ROBERT, 1979) e a úlcera induzida por indometacina (MORIMOTO et al., 1991).

As lesões produzidas na mucosa gástrica por agentes como o etanol absoluto, são causadas pela ação direta do etanol que destrói as células por contato (ROBERT et al., 1979) sendo que a acidez gástrica tem pequena participação neste tipo de lesão (SZABO, 1987). O etanol lesa o órgão diretamente do lúmen através da barreira da mucosa gástrica e então exerce sua ação diretamente na camada da mucosa (CHO, OGLE, 1992). As lesões são do tipo necróticas que se estendem aproximadamente até dois terços da mucosa (envolvendo a superfície do epitélio, e a região das células de muco) (ROBERT et al., 1979), o etanol concentrado entra em contato com a superfície da mucosa, o que resulta em liberação de mediadores vasoativos que desencadeiam a vasoconstrição. A forte dilatação arteriolar e arterial juntamente com severa constrição venosa causa hiperemia, edema e hemorragia (OATES, HAKKINEN, 1988).

Já a indometacina, bem como a maioria dos antiinflamatórios não esteróides como a aspirina, induzem lesões gástricas (ROBERT, 1979) por inibirem a síntese de prostaglandinas (VANE, 1971; MORIMOTO et al., 1991) e por afetar a secreção ácida gástrica (MORIMOTO et al., 1991), conseqüentemente, diminuindo os mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica mediados por estas substâncias. A indometacina é um antiinflamatório não esteróide inibidor da ciclooxigenase, enzima que catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, as quais são substâncias importantes na citoproteção gástrica (KATORI, MARIJA, 1997).

No modelo de úlcera induzida por indometacina determinou-se a ação antiulcerogênica da α -lactalbumina e seus hidrolisados comparativamente à cimetidina (controle positivo) e uma solução salina fisiológica (controle negativo). A cimetidina é um antagonista reversível e competitivo das ações da histamina que são exercidas sobre receptores H_2 , inibindo a secreção gástrica e também a secreção induzida por gastrina ou pentagastrina. A redução da secreção gástrica causada pela cimetidina protege os animais de experimentação da ulceração gástrica provocada por estresse, ligadura pilórica, tratamento com aspirina e inibidores relacionados à ciclooxigenase (DOUGLAS, 1985).

Em trabalhos reportados recentemente (ROSANELI et al., 2004, PACHECO et al., 2004) foi observado que o concentrado protéico de soro de leite (CPS) protege a mucosa gástrica de lesões induzidas por indometacina, sendo esta proteção, mais efetiva quando administrados em doses repetitivas.

A α -lactalbumina comercial, estudada nesta pesquisa, também foi efetiva em inibir as lesões induzidas pela indometacina reduzindo o índice de lesões ulcerativas (ILU) em 49,63%. A hidrólise enzimática (pancreatina) reduziu a atividade protetora da α -lactalbumina para 25,83% (Figura 3.5). A α -lactalbumina produzida em laboratório apresentou inibição do ILU de 30,81% em relação ao tratamento com salina.

No estudo realizado por PACHECO et al. (2004) os autores comparam o efeito protetor de um CPS, seu hidrolisado e a fração do hidrolisado com peso molecular < 1kDa. No modelo de úlcera induzida por indometacina observaram que o concentrado protéico de soro hidrolisado inibiu o ILU em 57% e a fração de hidrolisado menor que 1kDa apresentou inibição de 73,6%. A quantidade de amostra administrada aos ratos na pesquisa de PACHECO et al. (2004) foi de 1000 mg/kg de pc, que corresponderia a aproximadamente 200 mg de α -lactalbumina presente na amostra. Portanto, comparando a inibição determinada por PACHECO et al. (2004) para o CPS (57%) com a α -lactalbumina comercial utilizada neste trabalho (49,63%) haveria uma eficácia maior para a α -lactalbumina do CPS, comparada com a α -lactalbumina comercial. Por outro lado, a hidrólise enzimática não afetou a eficácia do CPS estudado por PACHECO et al. (2004) como aconteceu no presente trabalho (Figura 3.5).

Na pesquisa realizada para esta dissertação, utilizando o modelo etanol, em ensaio preliminar com o CPS que serviu de ponto de partida para os estudos que se seguiram, foi utilizado tratamento com 1000 mg de CPS / Kg de pc (equivalente a aproximadamente 200 mg de α -La) e foi detectada uma inibição do ILU de 53,6% contra valores encontrados de 73,1% e 69,4% respectivamente por ROSANELI et al. (2002) e PACHECO et al. (2004).

Esses resultados mostraram que o CPS que serviu de base para essa dissertação apresentou poder inibitório do ILU (53,6%) menor que o CPS usado previamente por ROSANELI et al. (2002) e PACHECO et al. (2004), respectivamente.

Os resultados dessa dissertação (Figura 3.6) para a α -lactalbumina comercial, uma α -lactalbumina produzida em laboratório e um hidrolisado da α -lactalbumina comercial ficaram em torno de 40% de inibição do ILU, praticamente

a metade do valor (82%) reportado por MATSUMOTO et al. (2001) para 200 mg/Kg de pc de uma α -lactalbumina, também comercial.

MATSUMOTO et al. (2001) usaram o modelo de úlcera induzida por etanol 60% + 100 mM HCl e compararam o efeito protetor de um isolado protéico de soro (WPI), da β -lactoglobulina, da soralbumina bovina, da γ -globulina e da α -lactalbumina. Demonstraram que a α -lactalbumina protegeu a mucosa gástrica quatro vezes mais que o isolado protéico de soro (WPI) e que as demais proteínas do soro de leite testadas não mostraram atividade.

Esta proteção mais acentuada da α -lactalbumina em relação ao CPS também foi observada nesta pesquisa, se considerada a inibição observada para o CPS (1000 mg/Kg de pc) de 53,6% e a inibição da α -lactalbumina comercial de 40,22% com 200 mg/Kg de pc confirmando, dessa forma, a especificidade a α -lactalbumina como fator protetor da mucosa gástrica contra etanol como agente ulcerogênico.

Como tentativa de explicar o resultado de inibição do ILU, mais elevado na pesquisa realizada por MATSUMOTO et al. (2001), repetiu-se o experimento com 200 mg de α -lactalbumina comercial, usando etanol 60% + 100 mM HCl como agente ulcerogênico. Não foi observada diferença significativa na % de inibição obtida com etanol absoluto segundo ROBERT, (1979) e com etanol 60% + 100 mM HCl, usado por MATSUMOTO et al., (2001).

Outros fatores poderiam ter proporcionado a diferença observada entre a inibição pela α -lactalbumina reportada por MATSUMOTO e colaboradores e a encontrada nesta pesquisa, a saber; baixa atividade antiulcerogênica do material de partida (CPS) usado neste trabalho e, diferença na metodologia de detecção e expressão dos resultados das lesões provocadas na mucosa. Em nossa pesquisa foi utilizada a metodologia descrita por GAMBERINI et al. (1991) no qual pontua as lesões subjetivamente através da somatória dos parâmetros descritos na Tabela

3.1, enquanto MATSUMOTO et al. (2001), calcularam o ILU pela soma total do comprimento (mm) de cada lesão por estômago.

MATSUMOTO et al. (2001) observaram que a proteção exercida pela α -lactalbumina à mucosa gástrica foi dose-dependente. Na presente pesquisa foi também observado esse comportamento para a α -lactalbumina comercial em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto. Foi ainda constatado ausência de atividade antiulcerogênica para a β -lactoglobulina preparada em laboratório.

No estudo das vias de proteção, não foram observadas alterações no volume da secreção ácida gástrica e na concentração hidrogeniônica do conteúdo gástrico dos animais tratados com α -lactalbumina intacta. USHIDA et al. (2003) demonstraram que a α -lactalbumina elevou significativamente o pH do fluido gástrico 30 minutos após sua administração. Essa elevação do pH não foi observada nesta pesquisa para a α -lactalbumina comercial, podendo estar relacionado ao tempo entre a administração e sacrifício dos animais que foi de 4 horas. A fração do hidrolisado maior que 1kDa diminuiu o volume do conteúdo estomacal, porém não alterou o pH. Já a fração do hidrolisado menor que 1kDa (F1) alterou o volume gástrico e a concentração hidrogeniônica aumentando o pH estomacal após 4 horas de piloro ligado. A concentração hidrogeniônica apresentada pela fração F1 (< 1kDa) comparada ao controle (1,0 e 1,2 mEq/L, respectivamente) apresenta pequena redução sugerindo que a atividade antiulcerogênica desta fração não envolve o mecanismo de ação da secreção ácida gástrica e sim, podem estar envolvidos fatores denominados citoprotetores da mucosa gástrica. A citoproteção poderá não estar relacionada com a inibição da secreção gástrica (ROBERT et al., 1979).

Sabe-se que o álcool é um estimulante muito eficaz da secreção de ácido gástrico. As lesões induzidas por etanol na mucosa gástrica ocorrem mais pelo contato do etanol que destroem as células (ROBERT et al., 1979) sendo que, a acidez gástrica tem pequena participação neste tipo de lesão (SZABO, 1987) e

estas lesões são mais inibidas por agentes que aumentam os fatores de defesa da mucosa. A redução da barreira de muco é uma provável causa da formação de lesões induzidas por indometacina e etanol (MORIMOTO et al., 1991).

O modelo de indução de úlcera por etanol absoluto (ROBERT, 1979) foi utilizado para estudar a participação da α -lactalbumina (produzida em laboratório e a comercial) e seus hidrolisados na citoproteção gástrica, uma vez que, este agente afeta os mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica. Para tanto, foi estudada a participação de substâncias sulfidríla e prostaglandina na citoproteção gástrica.

A alquilação de grupamentos sulfidríla com N-etilmaleimida (NEM) (Tabela 3.5), eliminou o efeito protetor exercido pela α -lactalbumina comercial e suas frações do hidrolisado sobre a mucosa gástrica. Esse resultado sugere, portanto, que a ação antiulcerogênica da α -lactalbumina comercial, da fração < 1 kDa (F1) e da fração > 1 kDa (F2) envolve a participação das substâncias sulfidrílas. Esse mesmo efeito foi demonstrado por ROSANELI et al. (2002) em estudo realizado com o concentrado protéico de soro de leite, e que sua proteção exercida sobre a mucosa gástrica envolve a participação de substâncias sulfidríla e a promoção da síntese de glutathiona. A promoção da síntese de glutathiona apresentado pelo CPS, segundo BOUNOUS et al. (1993) estaria relacionada à presença, nas proteínas, da seqüência de grupos glutamilsteína, que são precursores da síntese de glutathiona, presentes principalmente na molécula de albumina do soro bovino (BOUNOUS, GOLD, 1991).

Elevadas concentrações de glutathiona reduzida (substâncias sulfidríla não protéica) são encontradas na mucosa gástrica e sabe-se, que a presença destas substâncias está intimamente relacionada com a citoproteção gástrica por impedir um aumento da permeabilidade vascular e ainda por bloquear a ação de radicais livres tóxicos às células da mucosa, atuando como antioxidante (SZABO, TRIER, FRANKEL, 1981; TAKEUCHI et al., 1989).

Outros componentes envolvidos na citoproteção gástrica são as prostaglandinas, sendo um dos fatores mais importantes. A citoproteção gástrica e intestinal das prostaglandinas é definida como as propriedades que muitas prostaglandinas apresentam por protegerem a mucosa do estômago e intestino de inflamações e necrose, quando a mucosa é exposta a agentes nocivos (ROBERT et al., 1979).

A presença de prostaglandinas na mucosa é necessária para as células epiteliais gástrica e intestinais manterem sua integridade. Se o conteúdo de prostaglandinas é reduzido por tratamento prévio com antiinflamatórios não esteróide, tais como a indometacina e a aspirina, estas células ficam vulneráveis, podendo não resistir aos efeitos prejudiciais presentes no ambiente gástrico (VANE, 1971; ROBERT, 1979), devido à redução do efeito protetor da barreira gástrica (RANG, DALE, RITTER, 1997).

O bloqueio da síntese de prostaglandinas não impediu que a α -lactalbumina produzida em laboratório, a α -lactalbumina comercial e a fração de peso molecular maior que 1kDa (F2) exercessem efeito protetor significativo sobre a mucosa, sugerindo uma menor participação de prostaglandinas na sua proteção à mucosa gástrica por essas substâncias. Iste poderia ser devido ao protocolo aplicado nessa experiência (Figura 3.4) em que o primeiro tratamento foi feito com 24 horas de jejum, antes da administração da indometacina que poderia, em parte, ter minimizado a essencialidade da prostaglandina na proteção oferecida pelas amostras. Por outro lado, a proteção exercida pela fração do hidrolisado de peso molecular menor que 1kDa (F1) mostrou uma dependência maior da prostaglandina, sendo eliminada totalmente em presença da indometacina, bloqueadora da ação da ciclooxygenase. Outra evidência de que a fração F1 foi mais dependente da participação da prostaglandina pode ser inferida no estudo da secreção ácida gástrica, onde foi observado que a fração F1 diminuiu o volume gástrico e a concentração hidrogeniônica aumentando o pH estomacal após 4 horas de piloro ligado. As prostaglandinas por estimularem a secreção de muco e

bicarbonato, reduzem a secreção ácida e causam vasodilatação, aumentando desta forma a eliminação de ácidos que se difunde para dentro da submucosa (RANG, DALE, RITTER, 1997). A fração F1 também proporcionou aumento maior e significativo na concentração de PGE₂ na mucosa gástrica, conforme pode ver visualizado na Tabela 3.7.

Aumentos dos níveis de PGE₂, no tecido gástrico, também foram reportados por USHIDA et al. (2003). A α -lactalbumina, após 30 minutos da administração oral de 200mg/kg de pc, aumentou em 158% os níveis de PGE₂ na mucosa gástrica. No presente trabalho observou-se, aumentos da mesma ordem para a proteína intacta e para a fração do hidrolisado de peso >1kDa. Já para a fração do hidrolisado de peso molecular <1kDa esse aumento foi aproximadamente cinco vezes maior.

A α -lactalbumina (produzida em laboratório e a comercial) e a fração do hidrolisado <1kDa proporcionaram aumentos significativos de muco aderido à mucosa gástrica (Tabela 3.6). O muco pode ser encontrado no suco gástrico em solução ou como um gel, chamado muco visível o qual, se adere à mucosa formando uma barreira de muco (CORNE et al., 1974). O papel do muco na proteção da mucosa consiste em formar uma barreira, na superfície do epitélio, contra os fatores agressores naturais como o ácido e a pepsina. O aumento da camada de muco aderido, por secretagogos de muco como as prostaglandinas, aumentam a proteção (SELLERS, CARROLL, ALLEN, 1986).

Os resultados obtidos sugerem que há um conjunto de mecanismos envolvidos na proteção exercida pela α -lactalbumina e suas frações do hidrolisado sobre a mucosa gástrica, destacando, a participação de substâncias sulfidríla, aumento da atividade de prostaglandina e aumento dos níveis de prostaglandina E₂ na mucosa gástrica.

3.5 CONCLUSÕES

- No modelo de úlcera induzida por indometacina a α -lactalbumina comercial foi a amostra que apresentou maior porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas (49,63%).
- A α -lactalbumina produzida em laboratório, a α -lactalbumina comercial e as frações do hidrolisado de α -lactalbumina comercial (F1 e F2), administrados em ratos em tratamentos repetitivos, foram capazes de reduzir as lesões gástricas produzidas por etanol absoluto em 40,22%, 38,96%, 43,34% e 42,59%, respectivamente.
- No estudo do mecanismo de ação da secreção ácida gástrica através da ligadura do piloro, a α -lactalbumina comercial não alterou o volume do conteúdo gástrico, o pH e a concentração hidrogeniônica estomacal após 4 horas de piloro ligado. A fração do hidrolisado maior que 1 kDa (F2) diminuiu o volume do conteúdo estomacal porém não alterou o pH. Já a fração do hidrolisado menor que 1kDa (F1) alterou o volume do conteúdo gástrico e a concentração hidrogeniônica aumentando o pH estomacal após 4 horas de piloro ligado. A concentração hidrogeniônica apresentada pela fração F1 (< 1kDa) comparada ao controle (1,0 e 1,2 mEq/L, respectivamente) apresenta pequena redução sugerindo que a atividade antiulcerogênica desta fração e demais amostras não envolve o mecanismo da secreção ácida gástrica e sim, o envolvimento de fatores denominados citoprotetores da mucosa gástrica.
- A alquilação de grupamentos sulfidríla com N-etilmaleimida (NEM), eliminou o efeito protetor da mucosa gástrica apresentados pela α -lactalbumina comercial e das frações do hidrolisado (F1 e F2), sugerindo que a atividade antiulcerogênica envolve a participação de substâncias sulfidríla.

- O bloqueio da síntese de prostaglandinas com indometacina diminuiu a proteção sobre a mucosa gástrica pela α -lactalbumina produzida em laboratório e a comercial e a fração do hidrolisado de α -lactalbumina comercial maior que 1kDa e perda da atividade antiulcerogênica da fração do hidrolisado menor que 1kDa, demonstrando assim que as prostaglandinas têm importante participação na citoproteção gástrica pela α -lactalbumina e seus peptídios. A confirmação do envolvimento de prostaglandinas na citoproteção gástrica pela α -lactalbumina foi demonstrada pela dosagem de muco aderido à mucosa gástrica e pela quantificação de prostaglandina E_2 na mucosa. A α -lactalbumina produzida em laboratório e a α -lactalbumina comercial provocaram aumento significativo da concentração de muco aderido à mucosa. Já o aumento da concentração de PGE_2 na mucosa gástrica foi observado tanto para a α -lactalbumina intacta quanto para as frações do hidrolisado, principalmente para a fração do hidrolisado < 1 kDa.
- Os resultados obtidos nesse trabalho reforçam o papel das proteínas de soro de leite, especialmente da α -lactalbumina, na proteção da mucosa gástrica estimulando estudos clínicos para comparar o papel dessas substâncias na redução de risco de gastrite e úlceras.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-SALAM, O.M.E.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology – Paris**, Paris, v.95, n.1-6, p.105-127, 2001.
2. ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G.; GARNER, A.; KIVILAASKO, E. Gastroduodenal mucosal protection. **Physiological Reviews**, Baltimore, v.73, n.4, p.823-857, 1993.
3. BOUNOUS, G; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey protein: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v.14, n.4, p.296-309, 1991.
4. BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.; GOLD, P. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v.16, n.3, p.204-209, 1993.
5. CHO, C.H.; OGLE, C.W. The pharmacological differences and similarities between stress- and ethanol-induced gastric mucosal damage. **Life Sciences**, New York, v.51, n.24, p.1833-1842, 1992.
6. CORNE, S.J.; MORRISEY, S.M.; WOODS, R.J. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **Journal Physiology-London**, London, v.242, n.2, p.116-117P, 1974.
7. DOUGLAS, W.W. Autacóides, *in*: **Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. Volume 1, 6ª edição, Ed. Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 1985, p.533-565.

-
8. GAMBERINI, M.T.; SKORUPA, L.A.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* mart. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, (Suppl.II), p.137-139, 1991.
 9. KATORI, M.; MAJIMA, M. Multiple roles of inducible cyclooxygenase-2 and its selective inhibitors. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, Tokyo, v.109, n.6, p.247-258, 1997.
 10. KONTUREK, S.J.; PAWLIK, W. Physiology and pharmacology of prostaglandins. **Digestive Diseases and Science**, New York, v.31, n.2, p.6S-19S, 1986.
 11. MATSUMOTO, H; SHIMOKAWA, Y; USHIDA, Y; TOIDA, T; HAYASAWA, H. New biological function of bovine alpha-lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, Maio, v.65, n.5, p.1104-1111, 2001.
 12. MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; KAKAYUKI, S. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal loss and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japan Journal Pharmacological**, Osaka, v.57, n.4, p.495-505, 1991.
 13. OATES, P.J.; HAKKINEN, J.P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.94, n.1-2, p.10-21, 1988.
 14. PACHECO, M.T.B.; BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Atividade antiulcerogênica de peptídeos e hidrolisado de proteínas do soro de leite em ratos. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas (submetido para publicação), 2004.

15. PARODI, P.W. A role for milk protein in cancer prevention. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.53, n.1, p.37-47, 1998.
16. RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.
17. ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, Hypertonic NaCl, and Thermal injury. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.77, n.3, p.433-443, 1979.
18. ROBERT, A. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.77, n.4, p.761-767, 1979.
19. ROSANELI, C. F. Atividade antiulcerogênica de um concentrado de soro de leite bovino em modelos experimentais com ratos. Campinas, 2002. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
20. ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, v.5, n.4, p.221-228, 2002.
21. ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Protective effect of bovine whey protein concentrate on the ulcerative lesions caused by subcutaneous administration of indomethacin. **Journal of Medicinal Food**, v.7, n.3, p.309-314, 2004.

22. SELLERS, L.A.; CARROLL, N.J.S.; ALLEN, A. Misoprostol-Induced increase in adherent gastric mucus thickness and luminal mucus output. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v.31, n.2, p.91S-95S, 1986.
23. SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.5, p.43-61, 1945.
24. SZABO, S.; TRIER, J.S.; FRANKEL, P.W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, Washington, v.214, n.4517, p.201-202, 1981.
25. SZABO, S. Peptides, sulfhydryls, and glucocorticoids in gastric mucosal defense: Coincidence or Connection? **Gastroenterology**, Philadelphia, v.87, n.1, p.228-229, 1987.
26. TAKEUCHI, K.; OKADA, M.; NIIDA, H.; OKABE, S. Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: Relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v.248, n.2, p.836-841, 1989.
27. USHIDA, Y; SHIMOKAWA, Y; MATSUMOTO, H; TOIDA, T; HAYASAWA, H. Effects of bovine alpha-Lactalbumin on gastric defense mechanisms in naive rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.67, n.3, p.577-583, 2003.
28. VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature - New Biology**, London, v.231, p.232-235, 1971.
29. WALLACE, L.J.; CHIN, B.C. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v.214, n.3, p.192-203, 1997.

30. WILSON, D.E. Role of prostaglandins in gastroduodenal mucosal protection.
Journal Clinical Gastroenterology, New York, v.13, Suppl.1, p.65S-71S,
1991.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados das pesquisas que deram origem a esta dissertação permitem concluir:

A cromatografia de troca aniônica em resina *Q Sepharose fast flow* mostrou-se adequada para o isolamento da β -lactoglobulina, com 82% de rendimento e elevada pureza. Para a α -lactalbumina esse mesmo sistema não foi totalmente satisfatório pelo fato desta proteína ser eluída contaminada com outras proteínas do soro de leite.

A α -lactalbumina produzida em laboratório, a α -lactalbumina comercial e as frações de seu hidrolisado de peso molecular $>1\text{kDa}$ e peso molecular $<1\text{kDa}$, utilizadas no tratamento prévio dos ratos, foram capazes de reduzir as lesões gástricas produzidas por etanol absoluto. No modelo de úlcera induzida por indometacina a α -lactalbumina comercial apresentou maior porcentagem na inibição do índice de lesões ulcerativas. A atividade antiulcerogênica da α -lactalbumina e seus hidrolisados parecem não ser mediada pela secreção ácida gástrica, estudada pela ligadura do piloro. No estudo das vias de ação da α -lactalbumina e seus hidrolisados, observou-se a participação de substâncias sulfidrílica e a participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica. A confirmação de provável estímulo à síntese de prostaglandinas pela α -lactalbumina e seus hidrolisados foi observada pelo aumento de muco aderido à mucosa gástrica e pelo aumento de PGE_2 na mucosa gástrica. Estes resultados sugerem, portanto, que a α -lactalbumina e as frações testadas de seu hidrolisado protegem a mucosa gástrica através da ação de substâncias sulfidrílica e por estimular a síntese de prostaglandina.