

MAURO RAMALHO SILVA

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS
DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE
LEITE COM ALTO TEOR DE OLIGOPEPTÍDEOS E
ELEVADA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A
ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA,
UTILIZANDO A PANCREATINA E A PAPAÍNA**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010**

MAURO RAMALHO SILVA

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS
DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE
LEITE COM ALTO TEOR DE OLIGOPEPTÍDEOS E
ELEVADA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A
ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA,
UTILIZANDO A PANCREATINA E A PAPAÍNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS -PPGCA

MAURO RAMALHO SILVA

**“OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DO CONCENTRADO
PROTÉICO DO SORO DE LEITE COM ALTO TEOR DE
OLIGOPEPTÍDEOS E ELEVADA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A
ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA, UTILIZANDO A
PANCREATINA E A PAPAÍNA”**

APROVADA EM 31 DE MARÇO DE 2010

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. LÚCIA PERET DE ALMEIDA

Profa. Dra. MARIA BEATRIZ ABREU GLÓRIA

Profa. Dra. MARIALICE PINTO COELHO SILVESTRE
Orientadora

*À Deus, à minha família,
à Flávia e a todos que me apoiaram.*

AGRADECIMENTOS

À DEUS;

À Profa. Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre pela orientação deste trabalho, pelo incentivo e por todas as oportunidades que sempre me apresentou;

Aos membros da banca examinadora: Profa. Dra. Lúcia Peret de Almeida e Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória. Muito obrigado pelas sugestões e contribuições para este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, pela contribuição na minha formação científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos amigos do Laboratório Bromatologia/Pesquisa, pela convivência, pelas conversas e ajuda constante. Em especial à Débora Fernandes Rodrigues, Flávia de Carvalho Lana e Viviane Dias Medeiros Silva, pela infinita colaboração na execução deste trabalho.

Ao Harriman Aley Moraes que sempre me ajudou, incentivou e torceu por mim. Muito obrigado.

À minha família pelo incentivo e pela contribuição em todas as minhas conquistas.

À minha eterna companheira Flávia Campos Corgosinho, agradeço por sempre estar ao meu lado.

“É graça divina começar bem.
Graça maior persistir na caminhada certa.
Mas a graça das graças é não desistir nunca.”

Dom Hélder Câmara

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE SIGLAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
OBJETIVO GERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1 SORO DE LEITE.....	17
2 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	20
3 CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE.....	21
4 HIDROLISADOS PROTÉICOS.....	22
4.1 Hidrólise enzimática.....	24
4.1.1 Proteases.....	26
4.1.1.1 Pancreatina.....	26
4.1.1.2 Papaína.....	27
5 VALOR NUTRICIONAL E PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS.....	27
6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS.....	28
7 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA.....	29
7.1 Epidemiologia.....	29
7.2 Mecanismo de controle da pressão arterial.....	29
7.3 Diagnóstico e tratamento.....	31
8 PROPRIEDADES BIOATIVAS DE PEPTÍDEOS.....	32
9 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA E CAPACIDADE DE INIBIR A ECA DE HIDROLISADOS DE PROTEÍNAS.....	33
10 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A ECA.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
TRABALHO EXPERIMENTAL.....	46
CAPÍTULO I - PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE, OBTIDOS PELA AÇÃO DA PANCREATINA E DA PAPAÍNA.....	48
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
1 INTRODUÇÃO.....	50
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1 Material.....	51

2.2.	Métodos.....	52
2.2.1	Determinação da composição química do concentrado protéico do soro de leite	52
2.2.2	Preparo dos hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite	52
2.2.3	Ultrafiltração dos hidrolisados protéicos.....	53
2.2.4	Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....	54
2.2.5	Avaliação do efeito de alguns parâmetros.....	55
2.2.6	Análise estatística	55
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1	Composição química do concentrado protéico do soro de leite	55
3.2.	Caracterização dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite	56
3.2.1	Perfil peptídico.....	56
3.2.2	Teores de peptídeos e de aminoácidos livres.	58
3.3	Efeito de alguns parâmetros sobre o perfil peptídico.....	60
3.3.1	Efeito do tipo de enzima.	60
3.3.2	Efeito da relação enzima:substrato.	62
3.3.3	Efeito da ultrafiltração.....	64
4	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE, OBTIDOS PELA AÇÃO DA PANCREATINA E DA PAPAÍNA	70
	RESUMO	70
	ABSTRACT	71
1	INTRODUÇÃO	72
2	MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1	Material	73
2.2.	Métodos.....	74
2.2.1	Preparo dos hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite	74
2.2.2	Ultrafiltração dos hidrolisados protéicos.....	75
2.2.3	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade inibitória dos hidrolisados protéicos sobre a ECA	75
2.2.4	Avaliação do efeito de alguns parâmetros.....	76
2.2.5	Análise estatística	76
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1	Efeito de alguns parâmetros na atividade inibitória sobre a ECA.....	79
3.1.1	Efeito do tipo de enzima.	80
3.1.2	Efeito da relação enzima:substrato.	82
3.1.3	Efeito da ultrafiltração.....	84
4	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

1 - Classificação da pressão arterial (>18 anos).....	31
---	----

Capítulo I

I.1 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....	53
I.2 - Composição química do concentrado protéico do soro de leite.....	56
I.3 - Teores de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....	59

Capítulo II

II.1 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....	74
II.2 Atividade inibitória da ECA dos hidrolisados de WPC.....	78

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- 1 - Mecanismo de controle da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina.....30

Trabalho experimental

- 1 - Principais etapas do trabalho experimental.....47

Capítulo I

- I.1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado H5 a 230 nm.....57
- I.2 - Efeito do tipo de enzima sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....61
- I.3 - Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....63
- I.4 - Efeito da ultrafiltração sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....64

Capítulo II

- II.1 - Efeito do tipo de enzima sobre a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....81
- II.2 - Efeito da relação E:S sobre a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....83
- II.3 - Efeito da ultrafiltração sobre a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite.....85

LISTA DE SIGLAS

ACF	- Área Corrigida da Fração
AH	- Ácido Hipúrico
AI	- Atividade inibitória
E:S	- Enzima:substrato
ECA	- Enzima conversora de angiotensina
FA	- Furanacrílico
FAPGG	- Furanacrilóil-fenilalanilglicilglicina
FPLC	- Cromatografia líquida rápida de proteína
HAS	- Hipertensão arterial sistêmica
HHL	- Hipuril-histidil-leucina
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
LF	- Lactoferrina
PA	- Pressão Arterial
PHEA	- Poli (2-hidroxietil-aspartamido)-sílica
RP	- Fase reversa
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato
SE	- Exclusão molecular
UF	- Ultrafiltração
WPC	- Concentrado protéico de soro de leite
WPH	- Hidrolisado protéico do soro
WPI	- Isolado protéico de soro de leite
α-La	- α -lactalbumina
β-Lg	- β -lactoglobulina

RESUMO

Os hidrolisados protéicos vêm sendo empregados na prática clínica na fabricação de alimentos especiais para indivíduos com necessidades fisiológicas e nutricionais particulares. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite (WPC) ricos em oligopeptídeos e com atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina (ECA). Para tal, foram avaliados alguns parâmetros, como o tipo de enzima (pancreatina e papaína), a relação enzima:substrato (E:S = 0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100) e o emprego da ultrafiltração. Inicialmente, caracterizou-se o perfil peptídico dos hidrolisados pelo fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular, seguida da quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres pelo método da Área Corrigida da Fração. Vários hidrolisados apresentaram perfis peptídicos adequados nutricionalmente, sendo o melhor resultado encontrado para a ação da papaína, em uma relação E:S de 2:100, após a ultrafiltração, tendo sido obtidos 15,29% de di- e tripeptídeos, 47,83% de aminoácidos livres e 25,73% de grandes peptídeos. Posteriormente, foi avaliada a capacidade dos hidrolisados enzimáticos do WPC em inibir a ECA, empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. Os parâmetros avaliados apresentaram efeito variado sobre a atividade inibitória da ECA, resultando em percentuais de inibição na faixa de 17,29 a 91,88%. Os melhores resultados obtidos ao se utilizar a pancreatina nas relações E:S de 0,5:100 (na presença ou ausência da ultrafiltração) e de 3:100 (na presença da ultrafiltração).

Palavras-chave: concentrado protéico do soro de leite; hidrólise enzimática; relação enzima:substrato; ultrafiltração; perfil peptídico; enzima conversora de angiotensina.

ABSTRACT

PREPARATION OF ENZYMATIC HYDROLYSATES WITH HIGH OLIGOPEPTIDE CONTENT AND ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORY ACTIVITY FROM WHEY PROTEIN CONCENTRATE USING PANCREATIN AND PAPAINE.

Protein hydrolysates have been used in clinical practice in the manufacture of special foods for individuals with special physiological and nutritional needs. Thus, the aim of the present study was to obtain enzymatic hydrolysates from whey protein concentrate (WPC) with high oligopeptide content and inhibitory activity (IA) of the angiotensin-converting enzyme (ACE). Some parameters were evaluated such as type of enzyme (pancreatin and papain), enzyme:substrate ratio (E:S = 0.5:100, 1:100, 2:100 and 3:100), and the use of ultrafiltration. First, the peptide profiles of the hydrolysates were characterized using fractionation by size-exclusion-HPLC followed by a rapid Corrected Fraction Area method for the quantification of the peptide and free amino acid contents. Several hydrolysates showed nutritionally appropriate peptide profiles and the best result was obtained when using papain at an E:S ratio of 2:100, after ultrafiltration, reaching 15.29% of di- and tripeptides, 47.83% of free amino acids and 25.73% of large peptides. Then, the inhibition activity of WPC hydrolysates was evaluated using a fractionation method by reversed-phase HPLC. The assessed parameters showed varied effect on the AI of the ACE, resulting in percentages of inhibition between 17.29 and 91.88%. The best results were obtained using pancreatin at an E:S ratio of 0.5:100 (in the presence or absence of ultrafiltration) and 3:100 (in the presence of ultrafiltration).

Keywords: whey protein concentrate; enzymatic hydrolysis; enzyme:substrate ratio; ultrafiltration; peptide profile; angiotensin-converting enzyme.

INTRODUÇÃO

O concentrado protéico do soro de leite (WPC) é um produto obtido após a separação em membranas das proteínas do soro de leite, apresentando elevada quantidade de proteínas na faixa de 35 a 80% (BRANS et al., 2004). Além disso, consiste em um ingrediente amplamente utilizado na indústria alimentícia, devido as suas características físico-químicas e sensoriais favoráveis, como boa solubilidade em água, capacidade de transportar pequenas moléculas lipofílicas, ação tensoativa, propriedade geleificantes (OHATA et al., 2005). Ressalta-se, ainda, que suas proteínas apresentam elevado valor nutricional em virtude do alto conteúdo de aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 2004).

Um dos processos que promovem uma exponencial agregação de valor ao WPC consiste na hidrólise protéica, que é um procedimento caracterizado pelo rompimento da cadeia protéica liberando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres. Este tratamento hidrolítico pode ser feito por ácidos, bases ou enzimas, sendo que dentre as vantagens da hidrólise enzimática sobre a química, destacam-se a melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, poder emulsificante e textura, apresentando, desta forma, grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (PACHECO et al., 2005).

Além disso, o tratamento enzimático contribui para melhorar as características de absorção protéica, pois, sabe-se que o comprimento da cadeia dos peptídeos influencia sua taxa de absorção. Vários estudos têm relatado que fórmulas contendo alto teor de oligopeptídeos, principalmente di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou de proteínas intactas, apresentando desta forma maior valor nutricional (FRENHANI e BURINI, 1999).

Diante disso, os hidrolisados protéicos têm sido utilizados na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, tais como recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, quadros gerais de má-absorção e fenilcetonúria (BIZZOTTO et al., 2006). Além disso, essas preparações podem ser usadas na suplementação dietética de idosos (AFONSO et al., 2009), na nutrição de esportistas (ROGERO e TIRAPÉGUI, 2008) e em pessoas com alergia à proteínas, visto que o

decréscimo no tamanho dos peptídeos possui relação direta com a diminuição da imunogenicidade (LI-JUN et al., 2008).

Além dessas aplicações, vários trabalhos relatam o efeito benéfico de hidrolisados enzimáticos e de peptídeos, por possuírem capacidade de desempenhar várias funções no organismo, como antitrombótica, anticariogênica, hipocolosterêmica, anticâncer, antimicrobiana, antioxidante, antiulcerogênica, anti-hipertensiva, opióide e imunoestimulante (CHATTERTON et al., 2006; HARTMANN e MEISEL, 2007).

A hipertensão arterial sistêmica representa um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo, sendo que suas abordagens terapêuticas e preventivas visam combater os fatores de risco para esta doença, como sedentarismo, obesidade, hábito de fumar e consumo excessivo de sal e bebidas alcoólicas (BRASIL, 2006a). Quando as medidas anteriores não forem suficientes, o tratamento farmacológico torna-se necessário. Porém, o uso de drogas sintéticas pode gerar efeitos colaterais indesejáveis, devido à sua alta atividade e especificidade. Uma alternativa poderia estar relacionada ao uso de hidrolisados enzimáticos de proteínas, contendo peptídeos com atividade anti-hipertensiva, podendo ser usados no desenvolvimento de suplementos alimentares ou de medicamentos voltados para a prevenção ou tratamento dessa doença (LI et al., 2004).

Os peptídeos anti-hipertensivos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), têm recebido atenção especial na literatura. Seus efeitos estão relacionados à diminuição da produção do vasoconstritor angiotensina II, e ao aumento do vasodilatador bradicinina. Assim, vários autores relataram o efeito inibitório de hidrolisados enzimáticos de proteínas alimentares sobre a ECA, obtidos a partir de fontes alimentares, como leite e derivados, incluindo o WPC (COSTA et al., 2007; JIANG et al., 2007; OTTE et al., 2007); pescado (RAGHAVAN e KRISTINSSON, 2009); cogumelo (LEE et al., 2004); canola (WU et al., 2009); mostarda (PEDROCHE et al., 2007); soja (CHA e PARK, 2005; KUBA et al., 2005; LI et al., 2005); feijão (TORRUCO-UCO et al., 2009); glúten de milho (KIM et al., 2004) e trigo (MA et al., 2006).

Com relação ao estudo da capacidade dos hidrolisados enzimáticos do WPC em inibir a ECA, o presente trabalho representa um avanço no sentido de que, pela primeira vez, foram estudados os efeitos da ação da papaína no preparo dos hidrolisados. Além disso, apesar da pancreatina já ter sido utilizada por outros autores, apenas uma condição hidrolítica foi testada (8% de proteína; E:S = 0,003; pH = 8; 50 °C; 4 h) (MULLALLY et al., 1997). Quanto ao efeito da relação E:S, a faixa já

estudada (0,2 a 1,2%) está bem abaixo da que aqui foi testada, e o emprego da ultrafiltração com membrana de corte de 10 KDa, foi avaliado por outros grupos de pesquisa para apenas uma condição experimental (8% de proteína; E:S = 0,003; pH= 8; 50 °C; 4 h), ao contrário do presente estudo (WU et al., 2009).

OBJETIVO GERAL

Obter hidrolisados enzimáticos a partir do concentrado protéico do soro do leite (WPC), com perfil peptídico nutricionalmente adequado e elevada atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina (ECA), empregando-se a pancreatina e a papaína.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição química do WPC;
- Obter hidrolisados enzimáticos do WPC, empregando-se diversas condições experimentais;
- Caracterizar o perfil peptídico destes hidrolisados;
- Avaliar, *in vitro*, a capacidade destas preparações em inibir a ECA;
- Analisar o efeito do tipo de enzima, da relação enzima:substrato e do emprego da ultrafiltração sobre o perfil peptídico e a capacidade em inibir a ECA destes hidrolisados.

REVISÃO DE LITERATURA

1 SORO DE LEITE

O soro de leite é o subproduto da fabricação de queijos e da produção de caseína na indústria de laticínios. Este derivado lácteo corresponde a, aproximadamente, 85 a 90% do volume de leite e retém cerca de 55% dos seus nutrientes (SINHA et al., 2007), sendo os principais constituintes a água (93-94%), a lactose (4,5-5,0%), as proteínas solúveis (0,7-0,9%), os sais minerais (0,6-1,0%) e quantidades apreciáveis de outros componentes como vitaminas do complexo B (MORENO-INDIAS et al., 2009).

Em virtude do seu alto teor de matéria orgânica, principalmente, à presença de lactose (cerca de 75% do teor de sólidos totais), o soro é considerado como um agente de poluição ambiental, apresentando elevada demanda biológica de oxigênio (35 g de oxigênio/ kg de soro de leite) (MORENO-INDIAS et al., 2009).

Dois tipos de soro podem ser produzidos de acordo com o procedimento adotado. O soro doce (pH 6,0 - 7,0) é obtido pelo processo de coagulação enzimática da caseína do leite, utilizando a enzima quimosina. Por outro lado, o soro ácido (pH < 5,0) resulta da precipitação ácida no ponto isoelétrico (pH = 4,6) desta mesma proteína (CAPITANI et al., 2005; PELEGRINE e CARRASQUEIRA, 2008). Diante disso, são observadas algumas diferenças em relação à composição destes subprodutos, sendo que o soro ácido contém, geralmente, maior teor de cinzas e menor de proteínas quando comparado ao soro doce e, ainda, seu uso na alimentação é mais restrito, devido ao seu sabor ácido e alto teor salino (SGARBIERI, 2004).

Apesar do seu elevado valor nutricional, o emprego do soro *in natura* é limitado, em virtude das características perecíveis e da alta diluição dos seus componentes. Deste modo, várias tecnologias têm sido utilizadas visando agregar valor a esta matéria-prima. Assim, a concentração do soro pode ser realizada por procedimentos que envolvam o aquecimento e a secagem (evaporação, "spray-drier", liofilização) ou por osmose reversa, enquanto que a desmineralização pode ser feita por resinas de troca iônica ou eletrodialise. As tecnologias de separação por membranas vêm sendo,

igualmente, utilizadas para a obtenção de ingredientes protéicos a partir do soro de leite (BRANS et al., 2004).

Alguns produtos, obtidos pelo processamento do soro, incluem o soro desmineralizado e sem lactose; a lactose refinada; o concentrado protéico de soro (WPC), com teor protéico que varia de 35 a 80% e o isolado protéico de soro (WPI), que apresenta acima de 90% de proteína (VALDUGA et al., 2006).

As aplicações do soro na indústria alimentícia são inúmeras e envolvem, dentre outras, a fabricação de bebidas lácteas (KEMPKA et al., 2008; PELEGRINE e CARRASQUEIRA, 2008); a produção de ricota (PORTO et al., 2005); a atuação como coadjuvante tecnológico e ingrediente de produtos cárneos (TERRA et al., 2009); a formulação de hidrolisados protéicos, com baixa concentração de gordura e lactose, para alimentação de atletas (BUCKLEY et al., 2010); a utilização *in natura* para alimentação de animais (HAUPTLI et al., 2005; FONTES et al., 2006) e a formulação de hidrolisados protéicos com teor reduzido de fenilalanina para pacientes fenilcetonúricos (LARA et al., 2005; CABRERA-PADILLA et al., 2009). Com relação a esta última utilização, em estudos realizados, anteriormente, no mesmo laboratório do presente trabalho, grande parte da fenilalanina foi removida do soro ou do WPC, após a hidrólise enzimática de suas proteínas e o emprego do carvão ativado como meio adsorvente (DE MARCO et al., 2005; DELVIVO et al., 2006; LOPES et al., 2007; SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2009; SILVA et al., 2010).

As proteínas do soro de leite apresentam estrutura globular com algumas ligações dissulfeto, proporcionando um certo grau de estabilidade estrutural. Elas correspondem a aproximadamente 20% do conteúdo protéico do leite (JOVANOVIC et al., 2005), sendo as principais frações representadas pela β -lactoglobulina e α -lactalbumina. Outras proteínas ou peptídeos secundários estão presentes em concentrações menores, como imunoglobulinas, albumina, lisozima, lipase, lactoferrina e xantina oxidase (HARAGUCHI et al., 2006).

Com relação ao valor nutricional, estas proteínas possuem, no seu conjunto, um perfil em aminoácidos próximo dos padrões de necessidades recomendados. São constituídas por alto teor de aminoácidos essenciais, sulfurados e com cadeia ramificada. Apresentam, ainda, boa digestibilidade, o que faz com que o seu valor biológico seja elevado quando comparado com outras proteínas alimentares (SINHA et al., 2007).

A β -lactoglobulina (β -Lg) é considerada como a principal proteína do soro de leite dos ruminantes, representando em torno de 50% do teor protéico total (JOVANOVIC et al., 2005). É muito resistente à ação de ácidos e enzimas proteolíticas do estômago, sendo por isso considerada como um importante carreador de retinol (pró vitamina A) materno para o filhote, em animais. Esta função biológica é ausente em humanos, uma vez que a β -Lg não está presente no leite humano (HARAGUCHI et al., 2006).

A alergenicidade atribuída às proteínas do leite bovino está, essencialmente, associada à β -Lg, e afeta cerca de 1 a 2% de crianças com menos de 2 anos. Além disso, é fonte de cisteína, que é fundamental para a síntese de glutathione (GSH), que é considerada um tripeptídeo anticarcinogênico (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2008)

Outra importante proteína do soro é a α -lactalbumina (α -La), que é rica em aminoácidos essenciais, como a lisina, leucina, treonina, triptofano e cistina (JOVANOVIC et al., 2005). Suas funções estão relacionadas com a síntese de lactose (SGARBIERI, 2004) e com a atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas (HARAGUCHI et al., 2006). É utilizada em fórmulas infantis devido a sua similaridade estrutural e conformacional com as proteínas do leite materno, sendo também empregada em produtos para nutrição esportiva em razão do seu conteúdo de aminoácidos ramificados, os quais estão envolvidos no fornecimento de energia e síntese protéica muscular (SILVA, 2009).

Entre os componentes minoritários do soro, encontra-se a soro-albumina, que corresponde a cerca de 10% do total protéico. É um peptídeo de alto peso molecular (66 kDa), rico em cistina (aproximadamente 6%). Possui afinidade por ácidos graxos livres e outros lipídeos, favorecendo seu transporte na corrente sanguínea (HARAGUCHI et al., 2006).

Quatro classes de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM e IgE) também estão presentes no leite bovino, sendo a IgG a principal, constituindo cerca de 80% do total, sendo responsável pela imunidade passiva. No leite humano, a IgA constitui a principal imunoglobulina (>90%) e suas principais ações biológicas residem na imunidade passiva e atividade antioxidante (SGARBIERI, 2004).

A lactoferrina (LF) é uma glicoproteína que possui dois íons ferro em sua estrutura e apresenta massa molecular em torno de 80 KDa. Acredita-se que esta proteína possui atividade antibacteriana na glândula mamária e que, ainda, funcione como carreadora de íons ferro, tornando-os mais disponíveis para absorção no

intestino (COSTA, 2004). Outras funções associadas à LF incluem o crescimento celular, por estimular a síntese de DNA, a inibição da proliferação de câncer em células *in vitro* e a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas (AIMUTIS, 2004).

2 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas são consideradas como um valioso ingrediente alimentar com importantes propriedades nutricionais e funcionais. Diante disso, diversos métodos vêm sendo usados objetivando a obtenção destas proteínas sem impacto negativo nas suas propriedades, garantindo, desta forma, sua aplicação como ingrediente na indústria alimentícia (SMITHERS, 2008).

Os métodos de separação para a obtenção de ingredientes protéicos incluem: a centrifugação baseada em diferenças de densidade; o processo com membranas baseado na diferença de tamanho; a troca iônica, baseada nas diferenças de carga e a cromatografia por afinidade, baseada em ligação específica com uma matriz (BRANS et al., 2004).

A vantagem da separação por membranas, quando comparada aos processos físico-químicos, está relacionada ao fato deste procedimento ser termicamente suave e puramente mecânico, obtendo-se proteínas na sua forma nativa, sem impacto em suas propriedades funcionais e nutricionais, garantindo, desta forma, sua aplicação como ingrediente na indústria alimentícia (ROMAN e SGARBIERI, 2005). Além disso, os processos de separação por membranas consomem menos energia, quando comparados aos processos térmicos (OLIVEIRA, 2004).

Dentre os procedimentos que empregaram membranas encontram-se a microfiltração (MF), a ultrafiltração (UF), a nanofiltração (NF) e a osmose reversa (OR), baseadas na separação de componentes por diferença de tamanho de moléculas (BRANS et al., 2004).

Na separação física das micelas de caseína por MF, obtêm-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado protéico, de acordo com seu conteúdo em proteínas (AUSAR et al., 2001; SGARBIERI et al., 2004).

Utilizando-se a combinação de métodos de separação por membrana, pode-se recuperar todos os componentes do leite em frações distintas. Por exemplo, as

caseínas podem ser separadas em frações como α , β , e κ caseína, e, as proteínas do soro, em α -lactoalbumina e β -lactoglobulinas isoladamente (BRANS et al., 2004).

Porém, um aspecto que não deve ser negligenciado é a alta demanda biológica de oxigênio do permeado da UF não podendo, portanto, ser diretamente descartado nos esgotos como resíduo. Assim, novas tecnologias têm sido desenvolvidas como o emprego da NF para recuperar a lactose do permeado da UF, a qual pode ser usada na indústria de doces e processos fermentativos (ATRA et al., 2005).

As membranas poliméricas de UF são frequentemente usadas, porém as membranas cerâmicas estão ganhando mais atenção, devido a melhor resistência em relação à limpeza e desinfecção (BRANS et al., 2004). O leite desnatado pode ser separado em frações ricas em caseína e proteínas de soro, utilizando-se membranas cerâmicas e filtração transversal (PUNIDADAS e RIZVI et al., 1998; ROMAN e SGARBIERI, 2005).

Para promover uma maior concentração das proteínas, geralmente, é necessária a combinação da ultrafiltração com a diafiltração. Esta consiste em se fazer passar, após ter atingido a concentração desejada, um elevado volume de água deionizada através do concentrado para se retirar o máximo de lactose e outros compostos de baixo peso molecular, ao mesmo tempo concentrando e purificando ainda mais as proteínas (BORGES et al., 2001).

3 CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE

O concentrado protéico do soro de leite (*Whey Protein Concentrate* ou WPC) possui teor protéico na faixa de 35 a 80%, e um conteúdo lipídico superior a 4%. A presença dos lipídios afeta as propriedades funcionais do WPC e promove o desenvolvimento de reações de oxidação, as quais são responsáveis pelo surgimento de *off-flavor* ou aroma desagradável. Por essa razão, têm sido desenvolvidos métodos visando a redução do conteúdo lipídico em produtos de WPC, com destaque para a precipitação lipídica termocálcica pela adição de íons cálcio divalentes à solução de WPC, com ajuste do pH para valor de 7,3 e aquecimento da solução final. Este tratamento leva à agregação e precipitação do complexo fosfolipoprotéico, o qual é

removido por microfiltração, dando origem a um WPC com reduzido teor lipídico (0,5%) (SILVA, 2009).

Os produtos do concentrado protéico do soro existem no mercado em concentrações protéicas que variam de 34 a 85%. Na denominação comercial, é referido o teor aproximado de proteínas, assim o WPC 80 terá um teor de proteínas próximo a 80% (HUFFMAN e HARPER, 1999).

Considerando-se o conteúdo do soro de leite *in natura* em todos os aspectos que tangem as características nutricionais, é importante, para a utilização destas proteínas em suplementos alimentares, que as mesmas estejam sob a forma de WPC. Tal fato está associado a alguns fatores como o maior teor de proteínas do WPC comparado ao soro de leite, à maior estabilidade, à conservação das características físico-químicas dos componentes, além da facilidade de manipulação laboratorial (BRANS et al., 2004).

A produção do WPC inclui as etapas de clarificação, ultrafiltração, filtração e secagem. Originalmente, nos Estados Unidos, o WPC era produzido visando minimizar a poluição ambiental e utilizado, principalmente, para alimentação animal. Enquanto os Estados Unidos focavam na produção do WPC com 34% de proteínas, vários países buscavam desenvolver produtos com alta concentração protéica e propriedades funcionais específicas (SILVA, 2009).

O WPC é um ingrediente amplamente utilizado na indústria de alimentos devido às excelentes propriedades funcionais de suas proteínas, sendo usado em muitos produtos cárneos, bebidas, produtos de padaria e formulações infantis (BRANS et al., 2004). Dentre as propriedades funcionais que justificam seu uso, destacam-se: a solubilidade em água, a capacidade de transportar pequenas moléculas lipofílicas, a ação tensoativa e propriedade geleificantes (OHATA et al., 2005), além do elevado valor nutricional de suas proteínas em razão do seu alto conteúdo de aminoácidos essenciais (SINHA et al., 2007).

4 HIDROLISADOS PROTÉICOS

Os hidrolisados protéicos vêm sendo utilizados na prática clínica na fabricação de alimentos especiais para indivíduos com necessidades fisiológicas e nutricionais

particulares. Desde 1940, estas preparações têm sido usadas em formulações infantis e para a manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas. A partir da década de setenta, apresentou um crescimento significativo, tanto para finalidades clínicas quanto para a melhoria das propriedades funcionais das proteínas (CAPOBIANGO et al., 2006).

Além disso, os hidrolisados protéicos são utilizados na fabricação de alimentos para suplementação dietética de idosos (AFONSO et al., 2009), nutrição de esportistas (ROGERO e TIRAPEGUI, 2008) e em crianças que apresentam alergia à proteína intacta (LI-JUN et al., 2008), crianças com diarreia aguda ou crônica, intolerâncias alimentares ou erro inato de metabolismo, como a fenilcetonúria e a fibrose cística (BIZZOTTO et al., 2006).

Alguns autores têm demonstrado que hidrolisados protéicos e peptídeos exercem diversas atividades benéficas ao organismo, como antitrombótica, anticariogênica, hipocolerostêrêmica, antimicrobiana, antioxidante, antiulcerogênica, anti-hipertensiva, opióide e imunoestimulante (CHATTERTON et al., 2006; HARTMANN e MEISEL, 2007).

Além dos efeitos benéficos na manutenção do estado nutricional, os hidrolisados protéicos apresentam várias aplicações na indústria alimentícia associadas à melhoria das propriedades funcionais. Neste sentido, estes hidrolisados são utilizados como ingrediente em vários alimentos, como patês, pães, doces, produtos alimentícios fortificados e para crianças (PACHECO et al., 2005).

Alguns estudos sugerem que a taxa de absorção intestinal de aminoácidos livres é menor do que aquela dos pequenos peptídeos porque no caso de di- e tripeptídeos a competição pelo mesmo sistema de transporte é parcial ou completamente eliminada (FRENHANI e BURINI, 1999; HINSBERGER e SANDHU, 2004). Os di- e tripeptídeos são mais eficientemente absorvidos que os aminoácidos livres, os quais, por sua vez, são melhores que os tetra- ou peptídeos superiores. Em quantidades equivalentes de di- e tripeptídeos e misturas de aminoácidos livres, os di- e tripeptídeos apresentam velocidade de absorção aproximadamente 10 vezes maior (FRENHANI e BURINI, 1999).

Outras vantagens do uso desses hidrolisados, em relação às misturas de aminoácidos livres, incluem a menor osmolaridade, o que contribui para reduzir o risco de incidência de diarreia osmótica, sendo bem tolerados por indivíduos com dificuldade de absorção e o reduzido potencial antigênico. Além disso, são mais palatáveis, sendo,

portanto, mais tolerados por um longo período de tempo do que uma mistura de aminoácidos (FRENHANI e BURINI, 1999).

Outros benefícios do emprego de peptídeos, provenientes da hidrólise enzimática de proteínas, como ingrediente estão associados à fácil digestibilidade, à alta solubilidade em água, à resistência a agentes desnaturantes, à longa vida de prateleira, quando na forma desidratada, e à baixa viscosidade de soluções de hidrolisados protéicos, mesmo quando em altas concentrações (SILVA, 2009).

A alta solubilidade e a estabilidade dos hidrolisados protéicos em relação à mistura de aminoácidos se deve ao fato de que alguns aminoácidos apresentam problemas com relação a estas duas propriedades quando estão na forma livre. Assim, a tirosina e a cistina são pouco solúveis, a glutamina e a cisteína são instáveis em solução e facilmente destruídas durante as etapas de esterilização e armazenamento. Entretanto, sob a forma de di- e tripeptídeos, estes aminoácidos apresentam boa solubilidade e estabilidade (AFONSO, 2008).

De forma complementar, a utilização de hidrolisados protéicos, além de ser vantajosa do ponto de vista nutricional, é consideravelmente menos onerosa que o emprego de misturas de aminoácidos (AFONSO, 2008).

4.1 Hidrólise enzimática

A hidrólise protéica consiste no rompimento das ligações peptídicas das proteínas, liberando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres, sendo catalisada por ácidos, bases ou enzimas. Entretanto, a hidrólise química é um processo de difícil controle, originando produtos com reduzida qualidade nutricional, devido à formação de D-aminoácidos e de substâncias tóxicas, como a lisino-alanina. Esse método também pode destruir o triptofano, a lisina e a treonina e causar racemização da maioria dos aminoácidos (SINHA et al., 2007).

O processo enzimático de hidrólise apresenta uma série de vantagens sobre os métodos químicos, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação, o menor conteúdo de sal no hidrolisado final e, ainda, a formação mínima de subprodutos. O fato de que as enzimas possam ser empregadas, na maioria das vezes, em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é frequentemente desnecessária e mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser usados em concentrações maiores (BIASUTTI et al., 2007).

A hidrólise enzimática tem sido muito utilizada para melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em diversos produtos alimentícios (PACHECO et al., 2005).

Um aspecto negativo do processo enzimático está relacionado ao desenvolvimento de gosto amargo no decorrer da catálise, devido à liberação de grupamentos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas protéicas. Este fato constitui um dos principais obstáculos na aplicação dos hidrolisados, contudo, várias alternativas têm sido usadas para prevenir, eliminar ou mascarar este efeito, com destaque para o tratamento com carvão ativado, a extração com álcool, a precipitação isoelétrica, a cromatografia em sílica gel, a cromatografia de interação hidrofóbica, a adição de polifosfatos, glicina ou ciclodextrina durante o processo de hidrólise e a aplicação/tratamento por exopeptidases (FITZGERALD e O'CUINN, 2006). Outra técnica adotada para reduzir o sabor amargo dos hidrolisados protéicos consiste na sua encapsulação em lipoesferas e lipossomas, procedimento este utilizado pela mesma equipe do presente trabalho em hidrolisados de caseína obtidos pela ação da papaína (MORAIS et al., 2004, 2005).

O tipo e o controle da quantidade da enzima proteolítica são de extrema importância, uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos e ao teor de aminoácidos livres (SILVA, 2009).

A ação do calor sobre a atividade enzimática tem sido utilizada por alguns autores para interrupção da reação hidrolítica. Para isso, são empregadas temperaturas suficientemente altas para provocar a desnaturação da enzima (LOPES Jr., 2008).

Deste modo, percebe-se que o controle das condições hidrolíticas na hidrólise enzimática das proteínas consiste numa etapa fundamental para obtenção de produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características sensoriais agradáveis ao consumidor, o que já foi demonstrado em diversos estudos da mesma equipe do presente trabalho (BIZZOTTO et al., 2005; CAPOBIANGO et al., 2006; VIEIRA et al., 2006; BIASSUTI et al., 2007).

As proteases constituem um grupo grande e complexo, as quais diferem entre si por suas especificidades pelo substrato, sítio ativo e mecanismo catalítico, perfis de estabilidade e atividade quanto à temperatura e ao pH (BEYNON e BOND, 2001).

4.1.1 Proteases

Segundo o sistema internacional de nomenclatura, as proteases pertencem à subclasse 4 da classe das hidrolases. Estas enzimas constituem uma grande família e são divididas em endopeptidases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica (VIEIRA, 2007).

As endopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica, enquanto as exopeptidases atuam nas extremidades N- ou C-terminal. Estas enzimas são classificadas em quatro subgrupos de acordo com seu mecanismo catalítico: serina proteases, aspártico proteases, cisteína proteases, e metaloproteases (SOUZA, 2008).

As proteases podem ser obtidas a partir de plantas, animais ou microorganismos. Estes últimos são considerados as mais promissoras fontes, uma vez que produzem uma maior variedade de enzimas específicas (VIEIRA, 2007).

4.1.1.1 Pancreatina

A pancreatina (EC 3.4.21.4) é um complexo enzimático, obtido a partir do pâncreas suíno, e possui atividade aminolítica, proteolítica e lipolítica. As proteases pancreáticas possuem ação de endopeptidases (quimotripsina, tripsina e elastase) e de exopeptidases (carboxipeptidases A e B) (AFONSO et al., 2008).

A quimotripsina apresenta atividade específica para os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. A tripsina catalisa a hidrólise das ligações peptídicas em que o grupo carbonila é fornecido pelos aminoácidos básicos lisina e arginina. A elastase hidrolisa ligações entre resíduos de aminoácidos alifáticos (HINSBERGER e SANDHU, 2004).

A carboxipeptidase A também apresenta especificidade para aminoácidos aromáticos, entretanto, por ser uma exopeptidase, hidrolisa resíduos aromáticos na posição C-terminal. A carboxipeptidase B possui mecanismo de ação similar a carboxipeptidase A, contudo, atua especificamente em oligopeptídios com resíduo C-terminal lisina ou arginina (HINSBERGER e SANDHU, 2004).

4.1.1.2 Papaína

A papaína (EC 3.4.22.2) é uma cisteíno ou tiol protease obtida a partir do látex do mamão (*Papaya carica*). Na sua forma inativa encontra-se na forma de zimogênio (propapaína), com o grupo sulfidríla (SH) ativo ligado a outro resíduo de cisteína, formando uma ligação dissulfeto, sendo a forma ativa obtida após o tratamento com agentes redutores. É constituída por uma cadeia peptídica simples com 212 resíduos de aminoácidos, apresentando peso molecular de 23.350 Da (GHOSH, 2005).

Esta endopeptidase atua na clivagem de substratos contendo resíduos de aminoácidos de lisina, arginina ou valina. Apresenta pH ótimo de ação compreendido entre 6,0 e 7,5 e possui boa estabilidade em pH 5,0, que diminui severamente em pH abaixo de 3,0 e acima de 11,0. Trata-se de uma enzima muito estável a altas temperaturas, quando comparada com outras proteases (GHOSH, 2005).

A inibição provocada por metais pesados ou agentes oxidantes pode ser revertida na presença de EDTA ou agentes redutores, e a ativação da papaína pode ser viabilizada pela cisteína, cianetos, sulfitos e sulfatos (DE MARCO, 2004).

5 VALOR NUTRICIONAL E PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS

O valor nutricional dos hidrolisados protéicos está diretamente relacionado à proteína de origem, que deverá apresentar uma composição adequada de aminoácidos, especialmente os essenciais; e ao modo de hidrólise, que possibilite a formação de peptídeos de diferentes tamanhos (AFONSO et al., 2008).

Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois sabe-se que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção. Alguns autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, os quais são melhores absorvidos que a proteína intacta, apresentando assim maior valor nutritivo (FRENHANI e BURINI, 1999). Por este motivo, a caracterização nutricional destas preparações deve envolver o seu

fracionamento de acordo com o tamanho da cadeia dos peptídeos e a quantificação do conteúdo das frações obtidas (SILVESTRE et al., 1994).

6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS

Na literatura, são encontradas diversas técnicas para o fracionamento dos peptídeos de hidrolisados protéicos, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* - SDS-PAGE) (CHICÓN et al., 2009), cromatografia de exclusão molecular, cromatografia líquida de alta velocidade com eletrospray acoplado ao espectrômetro de massa (LI-JUN et al., 2008), cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) capilar (ITO et al., 2005), HPLC de fase reversa (NOGUEIRA et al., 2005), HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (600 x 7,5 mm) (LEMIEUX et al., 1991), cromatografia líquida rápida de proteína (*Fast protein liquid chromatography* - FPLC) (JE et al., 2007) e foco isoelétrico em fase líquida (SAINT-SAUVEUR et al., 2008).

Entretanto, ao contrário da técnica aqui utilizada a maioria destas metodologias apresenta uma série de inconvenientes. Assim, LI-JUN et al. (2008), empregando-se a SE-HPLC em coluna Sephadex G25 e a cromatografia líquida de alta velocidade acoplada a espectrômetro de massa em eletrospray relataram que estes métodos não foram capazes de fracionar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, especialmente os pequenos peptídeos. De acordo com NOGUEIRA et al. (2005), na HPLC de fase reversa há sobreposição de peptídeos e impureza nos picos. Além disso, também pode ocorrer sobrecarga de peptídeos básicos tanto na HPLC de fase reversa quanto na HPLC capilar (McCALLEY, 2004).

Tendo em vista que o fracionamento de oligopeptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, apresenta problemas complexos, pois envolve a interação com o suporte cromatográfico, a orientadora da presente dissertação desenvolveu um método eficiente para este fim, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli-2-hidroxietil-aspartamida-sílica (PHEA). Com este material, os autores puderam separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da (SILVESTRE et al., 1994).

Este método já foi usado em vários trabalhos no mesmo laboratório do presente estudo para fracionar e quantificar os peptídeos de diversas fontes protéicas, como hidrolisados enzimáticos de soro de leite (SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2008), de caseína (CARREIRA et al., 2004), concentrado protéico de soro de leite (AFONSO et al., 2008; AFONSO et al., 2009; SILVA et al., 2010), de leite desnatado (SOARES et al., 2006; SOARES et al., 2007) e de arroz (LOPES et al., 2008).

7 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

7.1 Epidemiologia

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) representa um sério problema de saúde pública, e constitui um dos mais importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares. No Brasil e no mundo, esta doença é responsável por, aproximadamente, 40% das mortes por acidente vascular cerebral, 25% das mortes por doença arterial coronariana e, quando associada com diabetes, é responsável por 50% dos casos de insuficiência renal terminal (BRASIL, 2006a).

No Brasil, inquéritos populacionais indicam uma prevalência de HAS entre 15 e 30% para homens e de 15 e 27% para mulheres (COSTA, 2004). Os dados epidemiológicos ainda apontam para alta taxa de desconhecimento da condição, 35 a 83%, e taxas insatisfatórias de controle desta doença, 75 a 92% (FUCHS et al., 2004).

Em relação ao desconhecimento, controle e tratamento da HAS, estudos brasileiros relatam que, em indivíduos adultos, 50,8% sabiam ser hipertensos, 40,5% estavam em tratamento e apenas 10,4% tinham pressão arterial controlada (<140/90 mmHg). De acordo com estes trabalhos, as menores taxas de controle desta doença estão relacionadas à idade avançada, obesidade e o baixo nível educacional (BRASIL, 2006a).

7.2 Mecanismo de controle da pressão arterial

Os níveis de pressão arterial (PA) são regulados por vários mecanismos inter-relacionados. O sistema nervoso simpático exerce efeito regulador a curto prazo pela

secreção do vasoconstritor norepinefrina, o qual aumenta a resistência periférica das pequenas artérias e arteríolas. Já, os rins exercem controle regulatório a longo prazo pelo controle do fluido extracelular e pelo sistema renina-angiotensina (GUYTON e HALL, 2006).

O sistema renina-angiotensina é considerado como um dos principais reguladores da PA. A renina é uma enzima produzida e armazenada sob a forma inativa, pró-renina, nas células justaglomerulares dos rins. Quando a pressão arterial diminui, a renina é liberada na corrente sanguínea e atua sobre seu substrato, o angiotensinogênio, formando a angiotensina I (decapeptídeo). Em seguida, ocorre a liberação de um octapeptídeo, a angiotensina II, devido à clivagem do dipeptídeo C-terminal da angiotensina I, o qual possui um efeito vasoconstritor. Esta reação é catalisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), presente principalmente nos pulmões. Além de aumentar a resistência periférica, a angiotensina II estimula a síntese de aldosterona pelo córtex suprarenal, o qual diminui a excreção de sal e água pelos rins, fazendo com que a PA aumente. Além de atuar na produção de angiotensina II, a ECA é responsável pela degradação de um vasodilatador, a bradicinina (GUYTON e HALL, 2006). O mecanismo de controle da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina está esquematizado na Figura 1.

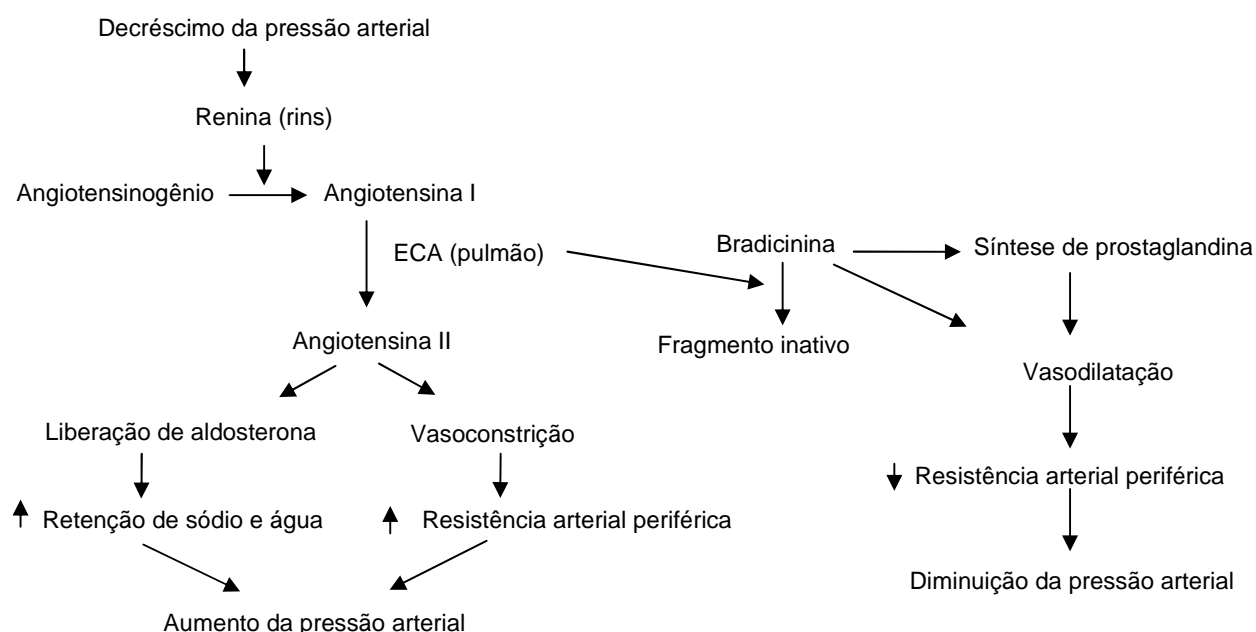


Figura 1 – Mecanismo de controle da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina.

Fonte: ADAPTADO de LI et al. (2004) e GUYTON e HALL (2006).

A ECA (dipeptidilcarboxipeptidase) é uma zinco-protease constituída de 1278 resíduos de aminoácidos e está presente em vários órgãos como rins, fígado, intestino, pâncreas, baço, glândulas adrenais, placenta, pulmões e cérebro (MURRAY et al., 2004). Esta enzima é responsável pela clivagem de cadeias polipeptídicas liberando unidades dipeptídicas.

7.3 Diagnóstico e tratamento

Os critérios de diagnóstico para HAS estão associados a uma pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg e a uma pressão arterial diastólica maior ou igual a 90 mmHg, em indivíduos que não estão fazendo uso de medicação anti-hipertensiva (BRASIL, 2006a). A classificação da pressão arterial para pessoas com idade acima de 18 anos está apresentada na Tabela 1.

As abordagens terapêuticas e preventivas para a HAS visam combater os fatores de risco para esta doença, tais como: sedentarismo, obesidade, hábito de fumar e consumo excessivo de sal e bebidas alcoólicas (BRASIL, 2006a). O tratamento farmacológico visa à redução da morbidade e da mortalidade cardiovascular do paciente hipertenso. Os agentes anti-hipertensivos devem promover a diminuição da pressão arterial e dos eventos cardiovasculares fatais e não fatais. Estes medicamentos são basicamente divididos em cinco classes principais: diuréticos, inibidores adrenérgicos, vasodilatadores diretos, antagonistas do sistema renina-angiotensina e bloqueadores dos canais de cálcio (BRASIL, 2006b).

Tabela 1 - Classificação da pressão arterial (>18 anos)

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	<120	<80
Normal	<130	<85
Limítrofe	130-139	85-90
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥180	≥110
Hipertensão sistólica isolada	≥140	<90

Fonte: BRASIL, 2006a.

O uso destas drogas sintéticas pode gerar efeitos colaterais indesejáveis, devido à sua alta atividade e especificidade. Uma alternativa seria o uso de peptídeos bioativos, representando uma forma de tratamento saudável e natural no controle da hipertensão (LI et al., 2005).

8 PROPRIEDADES BIOATIVAS DE PEPTÍDEOS

Peptídeos bioativos podem ser definidos como sequências de aminoácidos que se encontram inativas nas proteínas nativas, porém, após o processo de hidrólise, *in vitro* ou *in vivo*, tornam-se ativas, sendo capazes de modular respostas fisiológicas no organismo. Dentre as funções que estes peptídeos podem desempenhar destacam-se as atividades imunomoduladora, antimicrobiana, antiúlcera, anti-hipertensiva, anticariogênica, anticoagulante, opióide, hipocolesterolêmica e antioxidante (CHATTERTON et al., 2006; HARTMANN e MEISEL, 2007).

Estes peptídeos podem ser obtidos a partir de hidrólise enzimática de proteínas de origem vegetal ou animal. Dentre estas últimas, o destaque é para os peptídeos provenientes de leite e derivados, porém, citam-se, ainda outros alimentos, tais como ovos, carnes e peixes. No caso de fontes vegetais, as mais estudadas incluem a soja e o trigo (HARTMAN e MEISEL, 2007).

Entre os diferentes grupos de peptídeos bioativos, os anti-hipertensivos inibidores da ECA vêm recebendo atenção especial. Seus efeitos estão relacionados à diminuição da produção de um vasoconstritor, a angiotensina II, e ao aumento de um vasodilatador, a bradicinina, representando uma fonte alternativa na prevenção e no tratamento não medicamentoso da hipertensão arterial (LI et al., 2004).

Um modelo de interação entre os substratos e/ou inibidores competitivos, que incluem os peptídeos anti-hipertensivos, com o sítio ativo da ECA já foi estabelecido. Assim, a ligação destes compostos à ECA é fortemente influenciada pela sequência do tripeptídeo C-terminal das moléculas, o qual interage com o sítio ativo da enzima. Muitos substratos e inibidores competitivos da ECA contêm resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, com cadeia lateral aromática ou ramificada, no tripeptídeo C-terminal (FITZGERALD et al., 2004; LI et al., 2004).

Além disso, resultados de alguns trabalhos mostram que a presença de carga positiva na porção C-terminal contribui, também, substancialmente para a elevada atividade inibitória de vários peptídeos sobre a ECA (LI et al., 2004). Ainda, segundo FITZGERALD et al. (2004), peptídeos contendo valina e isoleucina na porção N-terminal apresentam, igualmente, potente efeito inibitório.

As atividades fisiológicas, *in vivo*, dos peptídeos bioativos ocorrem a nível do lúmen intestinal ou em órgãos periféricos após absorção. Depois de ingeridos, devem ser resistentes à ação das enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal e, caso sejam absorvidos, permanecer intactos até atingir o(s) órgão(s) sem sofrer ação das peptidases séricas. A absorção de di- e tripeptídeos é mais eficiente que a dos aminoácidos livres, os quais, por sua vez, são melhores que os tetra ou peptídeos maiores (FRENHANI e BURINI, 1999).

9 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA E CAPACIDADE DE INIBIR A ECA DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE PROTEÍNAS

Alguns autores relatam em estudos *in vitro* (JIANG et al., 2007; GUO et al., 2009) e *in vivo* (MUGUERZA et al., 2006; COSTA et al., 2007), a capacidade inibitória sobre a ECA e o efeito hipotensor de hidrolisados enzimáticos protéicos. No primeiro caso, essa atividade é expressa em percentual de inibição ou como valor IC_{50} , sendo este último definido como a concentração de hidrolisado ($mg.mL^{-1}$) necessária para reduzir a atividade desta enzima em 50% (COSTA, 2004).

Assim, Jiang et al. (2007) empregaram seis enzimas proteolíticas disponíveis comercialmente (alcalase, flavourzima, neutrase, papaína, pepsina e tripsina) para a obtenção de hidrolisados de caseína, proveniente do leite de iaque. A atividade inibitória da ECA destes hidrolisados foi, então, determinada *in vitro*, por método espectrofotométrico, sendo expressa como valor IC_{50} , que variou de $0,384 mg.mL^{-1}$, para o hidrolisado de neutrase, a $2,115 mg.mL^{-1}$, para o hidrolisado de flavourzima. Os autores concluíram que a caseína do leite de iaque poderia ser uma fonte de peptídeos anti-hipertensivos, os quais podem ser usados como ingredientes funcionais de diferentes alimentos.

GUO et al. (2009) avaliaram o efeito de várias condições hidrolíticas sobre a atividade inibitória da ECA de hidrolisados de WPC, a qual foi, igualmente, determinada pelo método espectrofotométrico, sendo expressa em percentual de inibição. Para isso, empregou-se uma protease do *Lactobacillus helveticus*, variando-se a temperatura, o pH, a relação enzima:substrato e o tempo de reação. O efeito dos parâmetros testados foi variado, tendo sido obtido hidrolisados cuja atividade inibitória da ECA variou de 15 a 63%. Desta forma, os autores demonstraram que a capacidade de inibição desta enzima pode ser regulada pelo controle de algumas condições experimentais.

COSTA et al. (2007) avaliaram a atividade hipotensora de hidrolisados derivados de WPI. Para tanto, as soluções protéicas, na concentração de 10 g%, foram previamente aquecidas a 65 ou a 95 °C e, posteriormente, hidrolisadas usando as enzimas alcalase, quimotripsina e proteomix. Os hidrolisados, assim obtidos, foram caracterizados com relação às suas atividades inibitórias da ECA, determinada por eletroforese capilar e expressa como valor IC₅₀, bem como pela medida da atividade hipotensora, *in vivo*, em ratos espontaneamente hipertensos, após administração oral ou intraperitoneal dos hidrolisados. Os autores observaram que os hidrolisados de α-quimotripsina apresentaram as maiores atividades inibitórias da ECA, todavia, os mais efetivos na redução da pressão arterial dos ratos, foram aqueles obtidos do WPI, previamente aquecido a 65 °C, empregando-se a alcalase, após administração intraperitoneal. Os autores concluíram que mesmo que os resultados obtidos nos estudos *in vitro* e *in vivo* não sejam coincidentes, isto indicaria que os hidrolisados podem sofrer degradação enzimática quando administrados oralmente, o que poderia interferir com a absorção dos peptídeos bioativos destas preparações.

Em outro estudo, MUGUERZA et al. (2006) avaliaram o efeito hipotensor do leite fermentado, obtido a partir de cepas de *Enterococcus faecalis* isolados de leite cru. A atividade inibitória da ECA foi avaliada *in vitro*, pelo método espectrofotométrico, cujo valor IC₅₀ variou de 34 a 59 µg.mL⁻¹. Após este teste, o leite fermentado foi administrado aos ratos por intubação gástrica, sendo observada uma redução significativa da pressão arterial, sistólica e diastólica, nos animais espontaneamente hipertensos.

Mais recentemente, TSAI et al. (2008) investigaram a atividade anti-hipertensiva do leite fermentado por bactérias ácido lácticas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*), ao qual foi adicionado a protease flavourzima. Após 5 h de fermentação a 43 °C, foi caracterizada a atividade inibitória da ECA, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, bem como seu efeito

hipotensor em ratos espontaneamente hipertensos. Observou-se que o valor IC_{50} variou de 0,708 a 0,266 $mg.mL^{-1}$ e a pressão arterial, sistólica e diastólica, foi reduzida significativamente após 8 semanas de administração oral do soro de leite (concentração peptídica de 4,9 $mg.mL^{-1}$).

10 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A ECA

Para a avaliação das propriedades anti-hipertensivas *in vitro*, emprega-se a determinação da atividade inibitória de peptídeos sobre a ECA. Para tal, diversos métodos têm sido descritos na literatura, incluindo espectrofotometria no UV (LEE et al., 2006; MA et al., 2006), fluorimetria (JALIL et al., 1999), eletroforese capilar (COSTA et al., 2007; HE et al., 2007), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (WU et al., 2002), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em eletrospray (XIAO et al., 2006).

Dentre estes métodos, o espectrofotométrico têm sido o mais citado na literatura (KIM et al., 2004; CHA e PARK, 2005; JUNG et al., 2005; LEE et al., 2006; MA et al., 2006; MUGUERZA et al., 2006; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2007; JANG et al., 2008). Este procedimento foi desenvolvido por CUSHMAN e CHEUNG (1971), e se baseia na clivagem do substrato hipuril-histidil-leucina (HHL) pela ECA com liberação do dipeptídeo histidil-leucina e do ácido hipúrico (AH), o qual, após extração com acetato de etila, é quantificado pela leitura em espectrofotômetro a 228 nm, medindo-se assim a atividade enzimática. No caso da determinação da atividade inibitória, os peptídeos são adicionados a esta reação durante a incubação da enzima e do substrato, e a atividade é expressa em percentual ou como valor IC_{50} , correspondendo à quantidade de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%.

Entretanto, este método apresenta algumas desvantagens, tais como o emprego de várias etapas para extrair e quantificar o produto da reação; o fato de que tanto o substrato (HHL) quanto o produto (AH) apresentarem máximo de absorção a 228 nm, podendo superestimar a quantidade do produto formado (SHALABY et al., 2006) e o tempo longo de incubação (30 minutos) (VERMEIRSSSEN et al., 2002).

Diante disso, alguns autores têm utilizado este método modificado (DIDELLOT et al., 2005; LIN et al., 2008; UDENIGWEA et al., 2009). Estas alterações foram propostas por HOLMQUIST et al. (1979) e se baseiam na incubação do substrato furanacrilóil-fenilalanilglicilglicina (FAPGG), em substituição ao HHL, com a enzima a 25 °C por 5 minutos, sendo o produto (furanacrílico, FA) quantificado pela medida da absorbância a 328 nm.

A eletroforese capilar também vem sendo utilizada por alguns autores para quantificação do ácido hipúrico (COSTA et al.; 2007; HE et al., 2007; TIENGO et al., 2009). Esta metodologia foi desenvolvida por SHIHABI (1999) e modificada por COSTA et al. (2007), usando uma etapa de pré-incubação do substrato com a enzima (37 °C por 5 min) e um tempo de incubação de 30 min, ao avaliar o efeito do tratamento enzimático e térmico na atividade anti-hipertensiva de hidrolisados protéicos de WPI. Posteriormente, HE et al. (2007) também validaram esta técnica para avaliação da atividade inibitória da ECA de hidrolisados enzimáticos de proteínas marinhas.

Outra modificação da metodologia de CUSHMAN e CHEUNG (1971) foi proposta por WU et al. (2002), que utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) para a determinação da atividade inibitória de peptídeos de hidrolisados protéicos de soja sobre a ECA. TSAI et al. (2008) usaram este método, com algumas modificações, para avaliação da atividade anti-hipertensiva de peptídeos de hidrolisados enzimáticos de leite fermentado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, W.O. *Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite com elevado teor de di-tripeptídeos para utilização em nutrição clínica*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2008. 88 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- AFONSO, W.O.; BIASUTTI, E.A.R.; CASTRO, V.M.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Utilização do soro de leite visando reduzir a poluição ambiental: hidrólise pela pancreatina. *Tecno-log.*, v. 12, n. 2, p. 7-16, 2008.
- AFONSO, W.O.; BIASUTTI, E.A.R.; GERALDI, L.M.; SILVA, V.D.M.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M.P.C. Use of enzymatic hydrolysis using subtilisin for increasing the nutritional value of whey. *Nutrire*, v. 34, n. 1, p. 97-114, 2009.
- AIMUTIS, W.R. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J. Nutr.*, v. 134, n. 4, p. 989S-995S, 2004.
- ATRA, R.; VATAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose *J. Food Eng.*, v. 67, n. 3, p. 325-332, 2005.
- AUSAR, S.F.I.; BIANCO, D.; BADINI, R.G.; CASTAGNA, L.F.; MODESTI, N.M.; LANDA, C.A.; BELTRAMO, D.M. Characterization of casein micelle precipitation by chitosans. *J. Dairy Sci.*, v. 84, p. 361-369, 2001.
- BIASUTTI, E.A.; LOPES, D.C.; SOUZA, M.W.S.; CAMPOS, R.B.D.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Obtenção de hidrolisados do soro de leite com alto teor de oligopeptídeos utilizando-se a subtilisina. *Braz. J. Food Technol.*, v. 10, n. 4, p. 225-232, 2007.
- BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado. *Cienc. Agrotec.*, v. 30, n. 2, p. 308-316, 2006.
- BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluation of functional properties of a blood protein. *Pak. J. Nutr.*, v. 4, n. 1, p. 11-16, 2005.
- BEYNON, R.; BOND, J.S. *Proteolytic Enzymes*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. 340 p.
- BORGES, P.F.Z.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.P.; PACHECO, M.T.B.; JACOBUCCI, H.B.; BALDINI, V.L.S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. *Braz. J. Food Technol.*, v. 4, p. 1-8, 2001.
- BRANS, G.; SCHROËN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M.; BOOM, R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J. Memb. Sci.*, v. 243, n. 1-2, p. 263-272, 2004.

- BRASIL. Ministério da Saúde. *V Diretrizes Brasileira de Hipertensão*. São Paulo: MS, 2006a. 50 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Hipertensão arterial sistêmica para o Sistema Único de Saúde*. Brasília: MS, 2006b. 58 p. (Cadernos de Atenção Básica; 16). (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- BUCKLEY, J.D.; THOMSON, R.L.; COATES, A.M.; HOWE, P.R.C.; DENICHILO, M.O.; ROWNEY, M.K. Supplementation with a whey protein hydrolysate enhances recovery of muscle force-generating capacity following eccentric exercise. *J. Sci. Med. Sport*, v. 13, p. 178-181, 2010.
- CABRERA-PADILLA, R.Y.; PINTO, G.A.; GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C. A new conception of enzymatic membrane reactor for the production of whey hydrolysates with low contents of phenylalanine. *Process Biochem.*, v. 44, p. 269-276, 2009.
- CAPITANI, C.D.; PACHECO, M.T.B.; GUMERATO, H.F.; VITALI, A.; SCHMIDT, F.L. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 40, n. 11, p. 1123-1128, 2005.
- CAPOBIANGO, M.; BIZZOTTO, C.S.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVESTRE, M.P.C. Action of pepsin on emulsifying properties of globin. *Int. J. Food Prop.*, v. 9, n. 2, p. 357-364, 2006.
- CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm. Bon.*, v. 23, n. 1, p. 17-25, 2004.
- CHA, M.; PARK, J.R. Production and characterization of a soy protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysates. *J. Med. Food*, v. 8, n. 3, p. 305-310, 2005.
- CHATTERTON, D.E.W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin - Technological implications for processing. *Int. Dairy J.*, v. 16, p. 1229-1240, 2006.
- CHICÓN, R.; BELLOQUE, J.; ALONSO, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food Hydrocoll.*, v. 23, n. 3, p. 593-599, 2009.
- COSTA, E.L. *Efeito do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados do isolado protéico do soro de leite com atividade anti-hipertensiva*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. 2004. 115 p. (Tese, Doutorado em Alimentos e Nutrição).
- COSTA, E.L.; GONTIJO, J.A.R.; NETTO, F.M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *Int. Dairy J.*, v. 17, p. 632-640, 2007.
- CUSHMAN, D.W.; CHEUNG, H. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharm.*, v. 20, p. 1637-1648, 1971.

- DE MARCO, L.M. *Uso da papaína imobilizada em carvão ativado e em alumina no preparo de formulações dietéticas para fenilcetonúricos, à base de soro de leite*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2004. 99 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso do carvão ativado para remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos, obtidos pela ação da papaína imobilizada. *Braz. J. Food Technol.*, v. 8, n. 3, p. 210-219, 2005.
- DELVIVO, F.M.; VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *Am. J. Food Technol.*, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2006.
- DIDELOT, S.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ROSENFELD, E.; FRUITIER-ARNAUDIN, I.; PIOT, J.; SANNIER, F. Preparation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory hydrolysates from unsupplemented caprine whey fermentation by various cheese microflora. *Int. Dairy J.*, v. 16, p. 976-983, 2006.
- FITZGERALD, R.J.; MURRAY, B.A.; WALSH, D.J. Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.*, v. 134, p. 980-988, 2004.
- FITZGERALD, R.J.; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotechnol. Adv.*, v. 24, p. 234-237, 2006.
- FONTES, F.A.P.V.; COELHO, S.G.; LANA, A.M.Q.; COSTA, T.C.; CARVALHO, A.U.; FERREIRA, M.I.C.; SATURNINO, H.M.; REIS, R.B.; SERRANO, A.L. Desempenho de bezerros alimentados com dietas líquidas à base de leite integral ou soro de leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, n. 2, p. 212-219, 2006.
- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arq. Gastroenterol.*, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.
- FUCHS, C.C.; CASTRO, M.S.; FUCHS, F.C. Adesão ao tratamento anti-hipertensivo. *Rev. Bras. Hipertens.*, v. 7, n. 3, p. 90-93, 2004.
- GHOSH, S. Physicochemical and conformational studies of papain/sodium dodecyl sulfate system in aqueous medium. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, v. 264, p. 6-16, 2005.
- GUO, Y.; PAN, D.; TANOKURA, M. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chem.*, v. 114, p. 328-333, 2009.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, 1115 p.
- HARAGUCHI, F.K.; ABREU W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev. Nutr.*, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 18, p. 163-169, 2007.
- HAUPTLI, L.; LOVATTO, P.A.; SILVA, J.H.S.; GARCIA, G.G.; BRUM Jr., B.S.; OLIVEIRA, J.L.S. Níveis de soro de leite integral na dieta de leitões na creche. *Cienc. Rur.*, v. 35, n. 5, p.1161-1165, 2005.
- HE, H.-L.; CHEN, X.-L.; WU, H.; SUN, C.-Y.; ZHANG, Y.-Z.; ZHOU, B.-C. High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. *Bioresour. Technol.*, v. 98, p. 3499-3505, 2007.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; AMIGO, L. α -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*, v. 35, n. 2, p. 257-265, 2008.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; RAMOS, M.; AMIGO, L. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.*, v. 12, p. 805-812, 2002.
- HINSBERGER, A.; SANDHU, B.K. Digestion and absorption. *Curr. Paediatr.*, v. 14, p. 605-611, 2004.
- HOLMQUIST, B.; BUNNING, P.; RIORDAN, J.E. A continuous spectrophotometric assay for the angiotensin converting enzyme. *Anal. Biochem.*, v. 95, p. 40-48, 1979.
- HUFFMAN, L.M.; HARPER, W.J. Maximizing the value of milk through separation technologies. *J. Dairy Sci.*, v. 82, p. 2238-2244, 1999.
- ITO, S.; YOSHIOKA, S.; OGATA, I.; YAMASHITA, E.; NAGAI, S.; OKUMOTO, T.; ISHII, K.; ITO, M.; KAJI, H.; TAKAO, K.; DEGUCHI, K. Capillary high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap time-of-flight mass spectrometry using a novel nanoflow gradient generator. *J. Chromatogr. A*, v. 1090, p. 178-183, 2005.
- JALIL, J.E.; OCARANZA, M.P.; PIDDO, A.M.; JALIL, R. Reproducibility of plasma angiotensin-converting enzyme activity in human subjects determined by fluorimetry with Z-phenylalanine-histidyl-leucine as substrate. *J. Lab. Clin. Med.*, p. 501-506, 1999.
- JANG, A.; JO, C.; KANG, K.-S.; LEE, M. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chem.*, v. 107, p. 327-336, 2008.
- JE, J.-Y.; QIAN, Z.-J.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process. Biochem.*, v. 42, p. 840-846, 2007.
- JIANG, J.; CHEN, S.; REN, F.; LUO, Z.; ZENG, S.S. Yak milk casein as a functional ingredient: Preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *J. Dairy Res.*, v. 74, p. 18-25, 2007.
- JOVANOVIC, S.; BARAC, M.; MACEJ, O. Whey proteins-properties and possibility of application. *Mljedarstvo*, v. 55, p. 215-233, 2005.

- JUNG, K.-A.; SONG, T.-C.; HAN, D.; KIM, I.-H.; KIM, Y.-E.; LEE, C.-H. Cardiovascular protective properties of kiwifruit extracts *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 28, n. 9, p. 1782-1785, 2005.
- KEMPKA, A.P.; KRÜGER, R.L.; VALDUGA, E.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.; OLIVEIRA, D. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêsego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v. 28, supl., p. 170-177, 2008.
- KIM, J.M.; WHANG, J.H.; SUH, H.J. Enhancement of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and improvement of the emulsifying and foaming properties of corn gluten hydrolysate using ultrafiltration membranes. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 218, p. 133-138, 2004.
- KUBA, M.; TANA, C.; TAWATA, S.; YASUDA, M. Production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. *Process. Biochem.*, v. 40, p. 2191-2196, 2005.
- LARA, M.G.; IZUMI, C.; GREENE, L.J.; VILELA, L.; FREITAS, O. Preparation and scaling up of a low phenylalanine enzymatic hydrolysate of bovine whey proteins. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 41, n. 4, p. 459-466, 2005.
- LEE, D.H.; KIMA, J.H.; Park, J.S.; CHOI, Y.J.; LEE, J.S. Isolation and characterization of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides*, v. 25, p. 621-627, 2004.
- LEE, J.-E.; BAE, I.Y.; LEE, H.G.; YANG, C.-B. Tyr-Pro-Lys, an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from broccoli (*Brassica oleracea Italica*). *Food Chem.*, v. 99, p. 143-148, 2006.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J.M.; GUILLOCHON, D.; AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J. Chromatogr.*, v. 32, n. 11/12, p. 499-504, 1991.
- LI, G.H.; LE, G.W.; LIU, H.; SHI, Y.H. Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Sci. Technol. Int.*, v. 11, n. 4, p. 281-287, 2005.
- LI, G.H.; LE, G.W.; SHI, Y.H.; SHRESTHA, S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr. Res.*, v. 24, p. 469-486, 2004.
- LI-JUN, L.; CHUAN-HE, Z.; ZHENG, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food Bioproduct. Process.*, v. 86, p. 1-6, 2008.
- LIN, S.-Y.; WANG, C.-C.; LU, Y.-L.; WUD, W.-C.; HOU, W.-C. Antioxidant, anti-semicarbazide-sensitive amine oxidase, and anti-hypertensive activities of geraniin isolated from *Phyllanthus urinaria*. *Food Chem. Toxicol.*, v. 46, p. 2485-2492, 2008.
- LOPES, D.C.F.; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.M.; AFONSO, W.O.; LOPES Jr., C.O.; SILVESTRE, M.P.C. Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins. *J. Food Technol.*, v. 6, n. 2, p. 57-65, 2008.

- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *J. Food Technol.*, v. 5, n. 2, p. 191-197, 2007.
- LOPES Jr., C.O. *Extração protéica e obtenção de hidrolisados protéicos de feijão com baixo teor de fenilalanina*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2008. 81 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- MA, M.-S.; BAE, I.Y.; LEE, H.G.; YANG, C.-B. Purification and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Food Chem.*, v. 96, p. 36-42, 2006.
- McCALLEY, D.V. Effect of buffer on peak shape of peptides in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1038, n. 1-2, p. 77-84, 2004.
- MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Aliment.*, v. 34, n. 1, p. 59-69, 2005.
- MORAIS, H.A.; SILVA, V.D.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Characterization of free aromatic amino acids and estimation of exposition rate of phenylalanine in casein hydrolysates by second derivative spectrophotometry. *Acta Cient. Venez.*, v. 55, n. 1, p. 1-6, 2004.
- MORENO-INDIAS, I.; CASTRO, N.; MORALES-DELANUEZ, A.; SÁNCHEZ-MACÍAS, D.; ASSUNÇÃO, P.; CAPOTE, J.; ARGÜELLO, A. Farm and factory production of goat cheese whey results in distinct chemical composition. *J. Dairy Sci.*, v. 92, p. 4792-4796, 2009.
- MUGUERZA, B.; RAMOS, M.; SÁNCHEZ, E.; MANSO, M.A.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A.; DELGADO, M.A.; RECIO, I. Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int. Dairy J.*, v. 16, n. 1, p. 61-69, 2006.
- MULLALLY, M.M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R.J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int. Dairy J.*, v. 7, p. 299-303, 1997.
- MURRAY, B.A.; WALSH, D.J.; FITZGERALD, R.J. Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 59, p. 127-137, 2004.
- NOGUEIRA, R.; LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J. Chromatogr. A*, v. 1089, p. 158-169, 2005.
- OHATA, S.M.; ZACARCHENCO, P.B.; AULER, F.; ANTUNES, A.J. Adição de concentrado protéico de soro (CPS) em mousse de maracujá. *Rev. Cienc. Exatas Nat.*, v. 7, n. 1, p. 53-66, 2005.

- OLIVEIRA, M.C.L. *Avaliação sensorial e caracterização química de queijo fresco cremoso obtido por ultrafiltração de leite fermentado e de bebida láctea elaborada a partir do permeado*. Florianópolis: Curso de Pós-Graduação da UFSC. 2004. 83 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- OTTE, J.; SHALABY, S.M.A.; ZAKORA, M.; NIELSEN, M.S. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *Int. Dairy J.*, v. 17, p. 1460-1472, 2007.
- PACHECO, M.T.B.; DIAS, N.F.G.; BALDINI, V.L.S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005.
- PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; LQARI, H.; MEGIAS, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; MILLÁN, F. Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. *Food Res. Int.*, v. 40, p. 931-938, 2007.
- PELEGRINE, D.H.G.; CARRASQUEIRA, R.L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. *Braz. J. Food Technol.*, VII BMCFB, p. 145-151, 2008.
- PORTO, L.M.; SANTOS, R.C.; MIRANDA, T.L.S. Determinação das melhores condições operacionais do processo de produção da ricota. *Bol. Cent. Pesqui. Process. Aliment.*, v. 23, n. 1, p. 173-182, 2005.
- PUNIDADAS, P.; RIZVI, S.S.H. Separation of milk proteins into fractions rich in casein or whey proteins by cross flow filtration *Food Res. Int.*, v. 31, n. 4, p. 265-272, 1998.
- RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H.G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chem.*, v. 117, p. 582-588, 2009.
- ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 44, n. 4, p. 563-575, 2008.
- ROMAN, J.A.; SGARBIERI, V. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. *Rev. Nutr.*, v. 18, n. 1, p. 75-83, 2005.
- SAINT-SAUVEUR, D.; GAUTHIER, S.F.; BOUTIN, Y.; MONTONI, A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *Int. D. J.*, v. 18, p. 260-270, 2008.
- SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev. Nutr.*, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.
- SHALABY, S.M.; ZAKORA, M.; OTTE, J. Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *J. Dairy Res.*, v. 73, p. 178-186, 2006.
- SHIHABI, Z.K. Analysis of angiotensin-converting enzyme by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, v. 853, p. 185-188, 1999.

- SILVA, M.C. *Hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro do leite: remoção de fenilalanina, grau de hidrólise e perfil peptídico*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2009. 112 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- SILVA, M.C.; SILVA, V.D.M.; LANA, A.M.Q.; SILVESTRE, M.P.C. Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite. *Aliment. Nutr.*, 2010 (no prelo).
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am. J. Food Technol.*, v. 2, p. 327-341, 2007.
- SILVESTRE, M.P.C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 12, p. 2778-2782, 1994.
- SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem.*, v. 101, p. 1501-1508, 2007.
- SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins – From ‘gutter-to-gold’. *Int. Dairy J.*, v. 18, p. 695-704, 2008.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm. Bon.*, v. 25, n. 3, p. 325-332, 2006.
- SOARES, R.D.L.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVESTRE, M.P.C. Enzyme catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotechnol.*, v. 21, p. 45-56, 2007.
- SOUZA, M.W.S. *Hidrólise protéica e remoção de fenilalanina, na obtenção de leite para pacientes fenilcetonúricos: emprego da protease do *Aspergillus sojae* e da subtilisina*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2009. 106 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- SOUZA, M.W.S.; BIASUTTI, E.A.R.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Obtaining oligopeptides from whey: use of subtilisin and pancreatin. *Am. J. Food Technol.*, v. 3, n. 5, p. 315-324, 2008.
- SOUZA, M.W.S.; LIMA, L.G.; SILVA, V.D.M.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Obtenção de leite com teor reduzido de fenilalanina pela ação da protease do *Aspergillus sojae* e uso do carvão ativado. *E-xacta*, v. 2, p. 23-33, 2009.
- TERRA, N.N.; FRIES, L.L.M.; MILANI, L.I.G.; RICHARDS, N.S.P.S.; REZER, A.P.S.; BACKES, A.M.; BEULCH, S.; SANTOS, B.A. Emprego de soro de leite líquido na elaboração de mortadela. *Cienc. Rural*, v. 39, n. 3, p. 885-890, 2009.

- TIENGO, A.; FARIA, M.; NETTO, F.M. Characterization and ACE-inhibitory activity of amaranth proteins. *J. Food Sci.*, v. 74, n. 5, 2009.
- TORRUCO-UCO, J.; CHEL-GUERRERO, L.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; BETANCUR-ANCONA, D. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *Food Sci. Technol.*, v. 42, p. 1597-1604, 2009.
- TSAI, J.F.; CHEN, T.J.; PAN, B.S.; GONG, S.D.; CHUNG, M.Y. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chem.*, v. 106, p. 552-558, 2008.
- UDENIGWEA, C.C., LIN, Y.-S.; HOU, W.-C.; ALUKO, R.E. Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. *J. Funct. Foods*, v. 1, n. 1, p. 199-207, 2009.
- VALDUGA, E.; PAVIANI, L.C.; MAZUR, S.P.; FINZER, J.R.D. Aplicação do soro de leite em pó na panificação. *Alim. Nutr.*, v. 17, n. 4, p. 393-400, 2006.
- VERMEIRSEN, V.; CAMP, J.V.; VERSTRAETE, W. Optimization and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J. Biochem. Biophys.*, v. 51, p. 75-87, 2002.
- VIEIRA, C.R. *Extração, hidrólise e remoção de fenilalanina das proteínas de farinha de arroz*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 94 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Effect of salt on the solubility and emulsifying properties of casein and its tryptic hydrolysates. *Ars Pharm.*, v. 47, p. 281-292, 2006.
- WU, J.; ALUKO, R.E.; MUIR, A.D. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-I-converting enzyme-catalyzed reactions. *J. Chromatogr. A*, v. 950, p. 125-130, 2002.
- WU, J.; ALUKO, R.E.; MUIR, A.D. Production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from defatted canola meal. *Bioresour. Technol.*, v. 100, p. 5283-5287, 2009.
- XIAO, X.; LUO, X.; CHEN, B.; YAO, S. Determination of angiotensin converting enzyme inhibitory activity by high-performance liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, v. 834, p. 48-54, 2006.

113 REFERÊNCIAS

TRABALHO EXPERIMENTAL

APRESENTAÇÃO

A parte experimental deste trabalho está apresentada na forma de fluxograma, na Figura 1. Os resultados foram divididos em dois capítulos e redigidos sob a forma de artigos científicos.

O primeiro capítulo refere-se à obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. Avaliou o efeito de alguns parâmetros, usados no preparo destes hidrolisados, sobre o perfil peptídico, tais como o tipo de enzima (pancreatina e papaína) e da relação E:S (0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100). Algumas amostras foram submetidas à ultrafiltração e diafiltração, e o efeito deste processo sobre o perfil peptídico foi, igualmente, avaliado.

No segundo capítulo, estes mesmos hidrolisados protéicos foram analisados quanto a sua capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina, tendo sido estudado da mesma maneira que o Capítulo I, o efeito do tipo de enzima, da relação E:S e da ultrafiltração sobre esta propriedade.

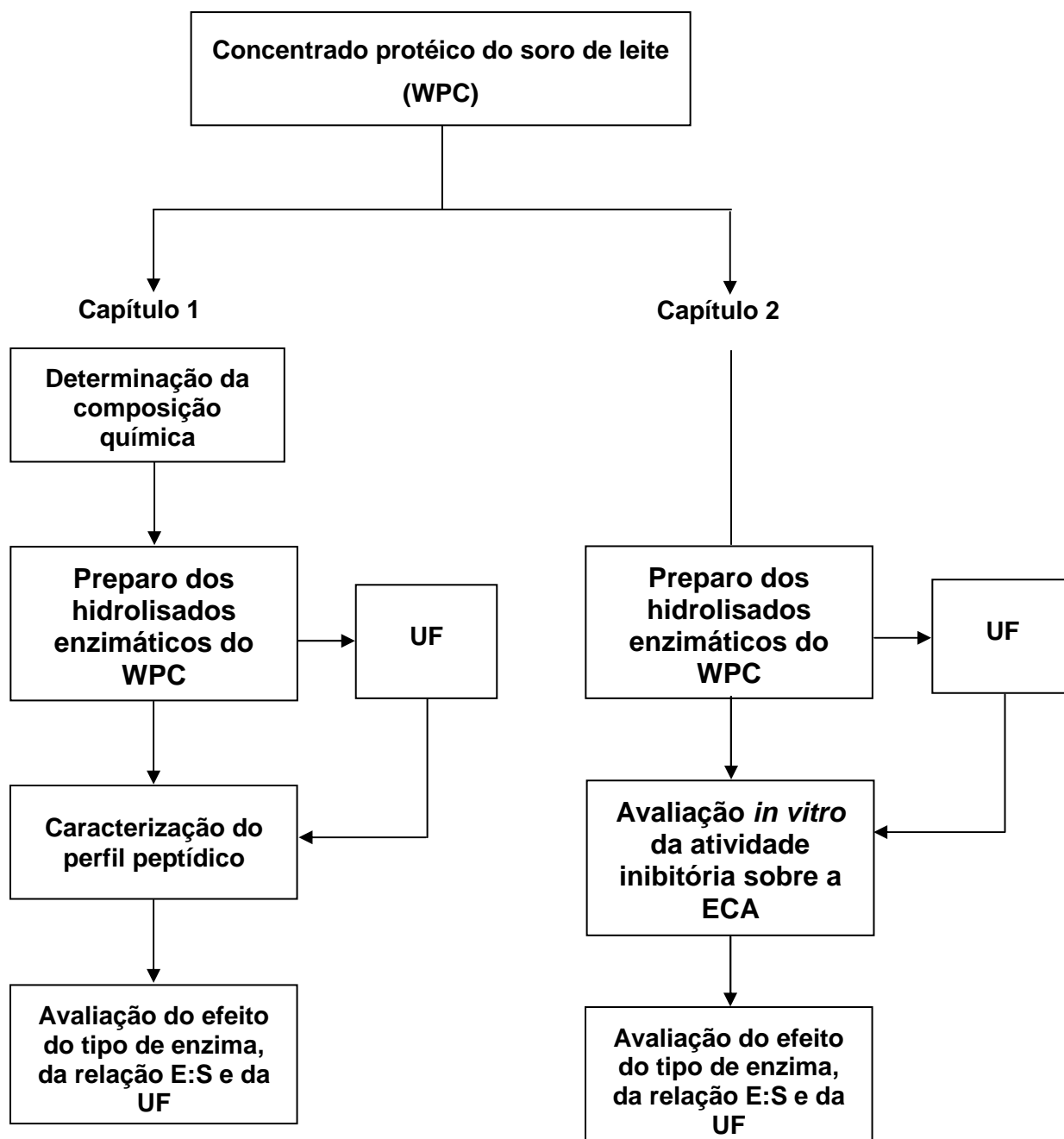


Figura 2 - Principais etapas do trabalho experimental.

E:S = enzima:substrato; UF = ultrafiltração; ECA = enzima conversora de angiotensina

Capítulo I

PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE, OBTIDOS PELA AÇÃO DA PANCREATINA E DA PAPAÍNA

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos, principalmente di- e tripeptídeos, e de aminoácidos livres, além de quantidade reduzida de grandes peptídeos. Para tal, diferentes parâmetros foram avaliados como: tipo de enzima (pancreatina e papaína), relação enzima:substrato (0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100) e o emprego da ultrafiltração. Caracterizou-se o perfil peptídico pelo fracionamento dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular e, para a quantificação dos componentes das frações cromatográficas, empregou-se o método rápido da Área Corrigida da Fração. Os resultados obtidos indicam que, em termos de número de casos analisados, a ação da pancreatina foi mais vantajosa do que a da papaína. Entretanto, o melhor perfil peptídico foi obtido pela ação desta segunda enzima, dando origem a 15,29% de di- e tripeptídeos, 47,83% de aminoácidos livres e 25,73% de grandes peptídeos. A utilização da menor relação E:S (0,5:100) foi benéfica em alguns casos para ambas as enzimas, enquanto que a ausência da ultrafiltração mostrou-se favorável apenas para a pancreatina.

Palavras-chave: concentrado protéico do soro de leite; relação enzima:substrato; hidrólise enzimática; ultrafiltração; perfil peptídico.

ABSTRACT

PEPTIDE PROFILE OF ENZYMATIC HYDROLYSATES FROM WHEY PROTEIN CONCENTRATE OBTAINED BY ACTION OF PANCREATIN AND PAPAIN.

The aim of this study was to obtain enzymatic hydrolysates from whey protein concentrate with high oligopeptide, especially di- and tripeptides, and free amino acid contents, besides small amount of large peptides. Different parameters were evaluated such as type of enzyme (pancreatin and papain), enzyme:substrate ratio (0.5:100, 1:100, 2:100 and 3:100), and the use of ultrafiltration. The peptide profiles of the hydrolysates were characterized using a fractionation method by size-exclusion-HPLC followed by a rapid Corrected Fraction Area method for quantifying the components of the chromatographic fractions. The results showed that in terms of number of analyzed samples the pancreatin action was more advantageous than papain. However, the best peptide profile was obtained by papain, reaching 15.29% of di- and tripeptides, 47.83% of free amino acids and 25.73% of large peptides. The use of the smallest enzyme:substrate ratio (0.5:100) was beneficial in some cases for both enzymes, while the lack of ultrafiltration was favorable just for pancreatin.

Keywords: whey protein concentrate; enzyme:substrate ratio; enzymatic hydrolysis; ultrafiltration; peptide profile.

1 INTRODUÇÃO

O concentrado protéico do soro de leite (WPC – *Whey Protein Concentrate*), produto originado da separação em membranas das proteínas do soro de leite, contém de 35 a 80% de proteínas, o que contribui para agregar valor ao soro de leite. Ressalta-se, ainda, sua maior estabilidade e conservação das características físico-químicas dos componentes, além da facilidade de manipulação laboratorial (BRANS et al., 2004).

Diversas aplicações estão associadas ao WPC, devido às excelentes propriedades funcionais destas proteínas, sendo um ingrediente amplamente utilizado na indústria de alimentos em uma grande variedade de produtos como carnes, bebidas, produtos de padaria e formulações infantis (BRANS et al., 2004).

A hidrólise enzimática tem sido utilizada na melhoria das propriedades funcionais e nutricionais das proteínas, influenciando principalmente as características de absorção protéica. Assim, vários estudos têm demonstrado que formulações contendo elevado teor de oligopeptídeos, principalmente di- e tripeptídeos provenientes da hidrólise enzimática de proteínas, são absorvidos mais efetivamente do que a proteína intacta ou uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando, assim, um maior valor nutritivo (FHENHANI e BURINI, 1999; HINSBERGER e SANDHU, 2004).

Nesse sentido, hidrolisados protéicos vêm sendo utilizados na prática clínica com finalidades terapêuticas relacionadas à manutenção do estado nutricional de indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e/ou fisiológicas não cobertas pela alimentação convencional. Estes hidrolisados têm sido empregados na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, tais como recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção (BIZZOTTO et al., 2006), suplementação para idosos (AFONSO et al., 2009), nutrição de esportistas (ROGERO e TIRAPEGUI, 2008), e pessoas com alergia a proteínas (LI-JUN et al., 2008).

A avaliação da qualidade dos hidrolisados protéicos envolve a determinação dos teores de peptídeos obtidos durante o processo hidrolítico. Neste sentido, algumas técnicas cromatográficas têm sido descritas na literatura, entretanto, estes métodos apresentam vários inconvenientes associados às interações entre o soluto e a fase estacionária e a ineficiência em separar os pequenos peptídeos (NOGUEIRA et al., 2005; LI-JUN et al., 2008).

Deste modo, Silvestre et al. (1994a) desenvolveram um método para o fracionamento e a quantificação dos peptídeos, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-aspartamida)-sílica (PHEA), que lhes possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da, sendo este método empregado neste estudo.

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrolisados enzimáticos de WPC com elevado teor de oligopeptídeos, principalmente di- e tripeptídeos, e de aminoácidos livres, assim como quantidade reduzida de grandes peptídeos, avaliando-se o efeito de diversos parâmetros como tipo de enzima, relação E:S e o emprego da ultrafiltração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O concentrado protéico de soro de leite (WPC - *Whey Protein Concentrate*) na forma de pó (Kerrylac 750) foi doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). A pancreatina (Corolase PP), EC 3.4.21.4, atividade 34,71 U.mL⁻¹ e a papaína (Corolase L10), EC 3.4.22.2, atividade 31,56 U.mL⁻¹ foram doadas pela AB Enzymes® (Barueri, SP, Brasil). O ácido fórmico foi adquirido da Merck (Whitehouse Station, NJ, EUA); a bomba peristáltica foi obtida da Millan (Colombo, PR, Brasil); as membranas de fluoreto de polivinilideno para filtração das amostras (0,22 µm) e dos solventes (0,45 µm), assim como o sistema de fluxo tangencial com porosidade de corte para peso molecular de 10 KDa foram adquiridos da Millipore (São Paulo, SP, Brasil). Todos os demais reagentes empregados neste trabalho eram de grau analítico.

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usado no fracionamento dos hidrolisados protéicos era constituído por uma coluna cromatográfica PHEA [poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-sílica], 250 x 9,4 mm, 5 µm e 200 Å (PolyIC, Columbia, MD, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP 1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPchemstation, Avondale, EUA). A água usada no

cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, EUA).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Determinação da composição química do concentrado protéico do soro de leite

A composição química do concentrado protéico do soro de leite (WPC) foi determinada segundo os métodos descritos na *Association of Official Analytical Chemists* (1995). A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa ventilada (Quimis Q-314M242, série 020, Diadema, SP, Brasil) a 105 °C até peso constante; as cinzas, por incineração, em mufla (MDS, Fornitec, São Paulo, SP, Brasil) a 550 °C; os lipídeos, por extração com éter etílico (Soxhlet modificado, Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, SP, Brasil); as proteínas foram determinadas pelo método de micro-Kjeldahl (bloco digestor modelo MA4025 e destilador de nitrogênio modelo MA036, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). A lactose foi quantificada por determinação de glicídios redutores em lactose. O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 6,38 (NIELSEN, 1998).

2.2.2 Preparo dos hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite

Foram preparados dezesseis hidrolisados enzimáticos, variando-se os seguintes parâmetros: tipo de enzima, relação enzima:substrato (E:S) e o emprego da ultrafiltração. As condições empregadas no preparo destes hidrolisados estão apresentadas na Tabela I.1.

As soluções a 10 g% (p/v) de concentrado protéico de soro de leite foram preparadas em água destilada, correspondendo a 3,42% de proteína, sendo o pH ajustado para 7,0 com solução de NaOH a 3 mol.L⁻¹. Posteriormente, foram aquecidas em banho de vaselina, sob agitação constante em agitador magnético (modelo 752A, Fisatom, São Paulo, SP, Brasil), na temperatura ótima de cada enzima (50 °C ou 55 °C), seguida da adição de pancreatina ou papaína, respectivamente, para se obter a relação E:S desejada. O tempo total de hidrólise foi de 5 horas e, após este período, as

enzimas foram inativadas por aquecimento em banho-maria a 75 °C, por 15 segundos. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas (Freeze Dry System/FreeZone 4,5, model 77500, LABCONCO, Kansas City, MO, EUA).

Tabela I.1 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite

Hidrolisados	Tipo de enzima	E:S	Ultrafiltração
H1	Pancreatina	0,5:100	Não
H2	Pancreatina	0,5:100	Sim
H3	Pancreatina	1:100	Não
H4	Pancreatina	1:100	Sim
H5	Pancreatina	2:100	Não
H6	Pancreatina	2:100	Sim
H7	Pancreatina	3:100	Não
H8	Pancreatina	3:100	Sim
H9	Papaína	0,5:100	Não
H10	Papaína	0,5:100	Sim
H11	Papaína	1:100	Não
H12	Papaína	1:100	Sim
H13	Papaína	2:100	Não
H14	Papaína	2:100	Sim
H15	Papaína	3:100	Não
H16	Papaína	3:100	Sim

E:S = relação enzima substrato.

2.2.3 Ultrafiltração dos hidrolisados protéicos

Algumas amostras dos hidrolisados protéicos (Tabela I.1) foram submetidas ao processo de ultrafiltração e diafiltração, utilizando uma quantidade de água equivalente a dez vezes o volume inicial. Para tal, empregou-se um sistema de fluxo tangencial com porosidade de corte para peso molecular de 10 KDa e uma bomba peristáltica. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas.

2.2.4 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite

A caracterização do perfil peptídico foi realizada em duas etapas: fracionamento dos peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, e sua posterior quantificação. O fracionamento dos peptídeos foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (*Size-Exclusion High Performance Liquid Chromatography - SE-HPLC*) em coluna PHEA, conforme descrito por SILVESTRE et al. (1994a). As amostras foram dissolvidas em uma concentração de 1 g% (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05 mol.L⁻¹, pH 2,5), filtradas por meio de membranas de 0,22 µm e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, durante 35 min, o volume injetado foi de 20 µL. A fase móvel foi filtrada, através da membrana de 0,45 µm e desgaseificada em ultrassom (modelo T14, Thornton, Vinhedo, SP, Brasil), sob vácuo, por 30 minutos. As frações foram separadas de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 11,5 a 16,0 min (grandes peptídeos, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2, de 16,0 a 19,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3, de 19,5 a 20,5 min (di- e tripeptídeos); e F4, de 20,5 a 32,0 min (aminoácidos livres).

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por SILVESTRE et al. (1994b), foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados do soro de leite. Resumidamente, foram preparados cinco hidrolisados padrão (dois com tripsina e três com pancreatina) os quais foram fracionados por HPLC de exclusão molecular em coluna PHEA. As quatro frações obtidas foram coletadas (Coletor de Frações, modelo CF-1, Spectrum/Chrom, Houston, TX, EUA) sendo o solvente removido de cada fração em evaporador Centrivap (modelo 78100-00D, Labconco, Kansas City, MO, EUA). Posteriormente, as frações foram submetidas à análise de aminoácidos. O cálculo da ACF foi realizado por meio de fórmulas desenvolvidas por SILVESTRE et al. (1994b), após a multidetecção das frações a 230 nm, 280 nm e 300 nm, para se eliminar a interferência devida à absorção dos aminoácidos aromáticos. Traçou-se, então, uma curva padrão, plotando-se ACF em função do teor de aminoácidos (SILVESTRE et al., 1994b; MORATO et al., 2000; BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004; LOPES et al., 2005; MORAIS et al., 2005; DE MARCO et al., 2005; DELVIVO et al., 2006; SOARES et al., 2006; SILVA et al., 2007).

2.2.5 Avaliação do efeito de alguns parâmetros

O efeito de alguns parâmetros (tipo de enzima, relação E:S e ultrafiltração) sobre o perfil peptídico dos hidrolisados enzimáticos de WPC foi avaliado. Assim, no preparo destes hidrolisados foram utilizadas duas enzimas (pancreatina e papaína) nas relações E:S de 0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100. Além disso, para cada um destes casos, as amostras foram ou não submetidas ao processo de ultrafiltração.

2.2.6 Análise estatística

Todos os experimentos e análises foram feitos em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e, para a avaliação das diferenças entre as médias dos teores de peptídeos e aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite, foi utilizado o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$) (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE

A necessidade da determinação da composição química do WPC é relevante, uma vez que esse concentrado representou no presente trabalho, a matéria-prima para o preparo de hidrolisados protéicos.

Observa-se na Tabela I.2 que o teor de proteínas é similar aos dois valores encontrados na literatura, enquanto que os resultados de umidade, lipídeos e lactose estão muito próximos aos relatados por um dos autores consultados (SILVA et al., 2010), porém diferentes do outro (AFONSO et al., 2009). O teor de cinzas totais aqui obtido foi inferior aos dois valores da literatura. Ressalta-se, ainda, que o resultado de umidade está de acordo com o citado na ficha técnica do produto, a qual informa apenas sobre este componente (> 5 g%).

Estas diferenças, citadas acima, devem estar relacionadas, principalmente, às variações entre lotes diferentes, uma vez que diversos fatores como raça das vacas,

alimentação (plano de nutrição e forma física da ração), temperatura ambiente, manejo e intervalo entre as ordenhas, produção de leite e presença de infecção da glândula mamária, podem interferir na composição do leite e, conseqüentemente, na do soro (EMBRAPA, 2010).

Tabela I.2 – Composição química do concentrado protéico do soro de leite

Componentes	¹ Valores obtidos			
	(g %)	WPC1	WPC2	WPC3
Proteínas	34,23	---	35,8	32,64
Umidade	5,29	>5	8,38	5,06
Lipídeos	0,17	---	0,05	0,15
Cinzas totais	4,74	---	5,30	7,40
Lactose	54,79	---	50,18	54,75

¹Valores encontrados após análise do concentrado protéico do soro de leite utilizado no experimento (KERRYLAC 750, Kerry do Brasil Ltda, MG, Brasil). WPC 1 - Valores disponibilizados na ficha técnica do produto; WPC 2 e WPC 3 – Valores encontrados por AFONSO et al. (2009) e por SILVA et al.(2009), respectivamente, analisando o produto citado anteriormente, porém, em lotes diferentes.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE

3.2.1 Perfil peptídico

A técnica de SE-HPLC, utilizada no presente trabalho, foi eficiente na caracterização de hidrolisados protéicos, especialmente com relação ao fracionamento de peptídeos de baixas massas moleculares, ou seja, inferiores a 1000 Da. Assim, os hidrolisados protéicos foram separados em quatro frações (F1, F2, F3 e F4), conforme descrito anteriormente em diversos trabalhos realizados no mesmo laboratório do presente estudo (SILVESTRE et al., 1994b, MORATO et al., 2000, CARREIRA et al., 2004; LOPES et al., 2005; MORAIS et al., 2005; DELVIVO et al., 2006; SOARES et al., 2006; SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2008). A fração F1 corresponde aos peptídeos com mais de 7 resíduos de aminoácidos, a fração F2 aos peptídeos médios contendo de 4 a 7 resíduos de aminoácidos, a fração F3 contém os di- e tripeptídeos e a fração F4 os aminoácidos livres. A título de exemplo, o perfil cromatográfico do hidrolisado H5, a 230 nm, está apresentado na Figura I.1.

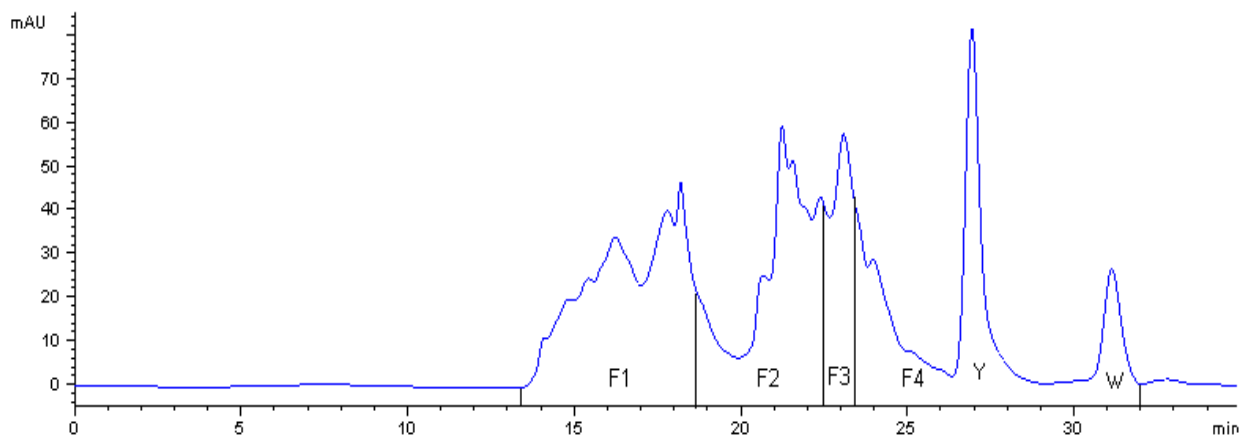


Figura I.1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado H5 a 230 nm.

F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado H5: substrato a 10%; enzima pancreatina, tempo de hidrólise = 5 h; relação E:S = 2:100, pH 7.

Na literatura, são encontradas diversas técnicas para o fracionamento dos peptídeos de hidrolisados protéicos, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* - SDS-PAGE) (CHICÓN et al., 2009), cromatografia de exclusão molecular (LI-JUN et al., 2008), cromatografia líquida de alta velocidade com eletrospray acoplado ao espectrômetro de massa (LI-JUN et al., 2008), HPLC capilar (ITO et al., 2005), HPLC de fase reversa (NOGUEIRA et al., 2005), HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (600 x 7,5 mm) (LEMIEUX et al., 1991) e coluna Superose -12HR 10/30 (GOLOVCHENKO et al., 1992; VISSER et al., 1992), cromatografia líquida rápida de proteína (*Fast protein liquid chromatography* - FPLC) (JE et al., 2007) e foco isoelétrico em fase líquida (SAINT-SAUVEUR et al., 2008).

Entretanto, ao contrário da técnica aqui utilizada, a maioria destes métodos apresenta uma série de inconvenientes associados à dificuldade de se separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo sido observada sobreposição de peptídeos de tamanhos diferentes e ocorrência de interações eletrostáticas ou hidrofóbicas com a fase estacionária (VISSER et al., 1992; NOGUEIRA et al., 2005).

A metodologia de fracionamento de peptídeos do presente trabalho foi, previamente, utilizada pela mesma equipe para a caracterização do perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos de diversas fontes protéicas e em condições de reações variadas. Dentre estes estudos, destacam-se os realizados com caseína (MORATO et al., 2000; BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004;

MORAIS et al., 2005), soro de leite (DELVIVO et al., 2006; SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2008), concentrado protéico de soro de leite (AFONSO et al., 2008; AFONSO et al., 2009; SILVA et al., 2010), leite (LOPES et al., 2005; SOARES et al., 2007) e arroz (LOPES et al., 2008).

3.2.2 Teores de peptídeos e de aminoácidos livres

Observa-se na Tabela I.3, uma significativa variação do perfil peptídico entre os diferentes hidrolisados enzimáticos do WPC. Para a escolha do hidrolisado que apresentou o melhor perfil peptídico, do ponto de vista nutricional, as ponderações de alguns autores devem ser consideradas. Assim, segundo FRENHANI e BURINI (1999), durante o metabolismo de proteínas, o primeiro estágio de hidrólise leva à formação de oligopeptídeos, contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos, e de aminoácidos livres. Estes peptídeos são, então, quebrados e, finalmente, absorvidos na forma de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres. Ainda, de acordo com estes mesmos autores, os di- e tripeptídeos são mais eficientemente absorvidos que os aminoácidos livres, os quais, por sua vez, são melhores que os tetra- ou peptídeos maiores. Em quantidades equivalentes de di- e tripeptídeos e misturas de aminoácidos livres, os di- e tripeptídeos apresentam velocidade de absorção aproximadamente 10 vezes maior. GONZÁLEZ-TELLO et al. (1994) também relatam as vantagens dos di- e tripeptídeos sobre os aminoácidos livres por apresentarem maior velocidade de absorção.

Deste modo, conclui-se que, do ponto de vista nutricional, o melhor perfil peptídico foi obtido para o hidrolisado H14, pois apresentou um dos maiores teores de di- e tripeptídeos (15,29%) e de aminoácidos livres (47,83%), assim como um dos menores teores de grandes peptídeos (25,73%). Entretanto, outros hidrolisados apresentaram perfis peptídicos próximos ao do H14 do ponto de vista nutricional. Este é o caso dos hidrolisados H4, H5, H6 e H7 que apresentaram como desvantagens em relação a H14 e de di- e tripeptídeos (H4), um menor teor de aminoácidos livres (H4, H5, H6 e H7), assim como um maior conteúdo de grandes peptídeos (H4, H5 e H6). Por outro lado, estes hidrolisados revelaram alguma superioridade em relação ao perfil peptídico do H14, com destaque para H5 que apresentou maior teor de di- e tripeptídeos e de peptídeos médios (F2). Para os outros três hidrolisados (H5, H6 e H7), a única vantagem observada refere-se aos seus teores mais elevados de peptídeos médios.

Tabela I.3 – Teores de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite

Hidrolisados	F1 (>7 resíduos de AA)	F2 (4-7 resíduos de AA)	F3 (2-3 resíduos de AA)	F4 (AA livres)
H1	65,94 ^{bA}	21,51 ^{fgB}	2,31 ^{gD}	10,24 ^{hC}
H2	39,88 ^{fA}	31,08 ^{cB}	9,38 ^{eD}	19,66 ^{fC}
H3	36,08 ^{ghA}	31,02 ^{cB}	14,77 ^{cD}	18,13 ^{fC}
H4	30,25 ^{iB}	23,27 ^{eC}	12,15 ^{dD}	34,33 ^{cA}
H5	31,55 ^{iB}	33,49 ^{abA}	16,98 ^{aC}	17,99 ^{fC}
H6	30,55 ^{iA}	27,07 ^{dB}	14,67 ^{cC}	27,71 ^{dB}
H7	25,04 ^{jC}	32,61 ^{bA}	15,46 ^{bcD}	26,89 ^{dB}
H8	21,20 ^{kC}	34,27 ^{aA}	15,97 ^{bD}	28,56 ^{dB}
H9	71,00 ^{aA}	16,11 ^{iB}	2,25 ^{gD}	10,65 ^{hC}
H10	57,10 ^{dA}	20,41 ^{ghB}	7,48 ^{fD}	15,01 ^{gC}
H11	63,44 ^{cA}	22,77 ^{efB}	2,32 ^{gD}	11,47 ^{hC}
H12	30,37 ^{iB}	10,43 ^{jD}	11,98 ^{dC}	47,23 ^{aA}
H13	54,57 ^{eA}	19,29 ^{hC}	2,29 ^{gD}	23,85 ^{eB}
H14	25,73 ^{jB}	11,15 ^{jD}	15,29 ^{bcC}	47,83 ^{aA}
H15	36,76 ^{gA}	19,43 ^{hB}	7,08 ^{fC}	36,73 ^{bA}
H16	34,65 ^{hB}	19,91 ^{hC}	7,17 ^{fD}	38,27 ^{bA}

Todos os valores são apresentados em % nmols das quatro frações. AA: aminoácidos. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de diferentes frações de um mesmo hidrolisado (linha). Médias indicadas por letras minúsculas não diferem entre si a 5% de significância na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados (coluna).

O perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do WPC foi, anteriormente, avaliado em dois estudos realizados pela mesma equipe. No primeiro, diversas enzimas proteolíticas foram empregadas para hidrolisar o WPC, sendo que o melhor perfil peptídico, obtido pela ação de uma protease do *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme, AB Enzymes) (E:S 1:100, 50 °C) foi inferior ao do H14 em termos de uma quantidade bem menor de aminoácidos livres (18,43%). Por outro lado, a quantidade de di- e tripeptídeos foi próxima (16,14%) e o teor de grandes peptídeos (18,76%) foi inferior ao do H14, o que representa uma vantagem do ponto de vista nutricional (SILVA et al., 2010).

No segundo estudo, uma subtilisina comercial (Prozyn, São Paulo, SP) foi empregada para hidrolisar o WPC, tendo sido obtido um perfil peptídico inferior ao do

H14, com relação ao menor teor de di- e tripeptídeos (13,34%). Por outro lado, a quantidade de aminoácidos livres (45,56%) foi próxima e a de grandes peptídeos foi inferior (12,28%) à do H14, sendo isto considerado uma vantagem do ponto de vista nutricional (AFONSO et al., 2009).

Ressalta-se, ainda, que não foram encontrados na literatura relatos de outros autores que avaliaram o perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de WPC.

3.3 EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE O PERFIL PEPTÍDICO

O efeito do tipo de enzima, da relação enzima:substrato (E:S) e do emprego da ultrafiltração (UF) foi avaliado sob dois diferentes aspectos: obtenção do melhor perfil peptídico do ponto de vista nutricional, e redução de custos do processo para adaptação em larga escala (utilização da menor E:S e ausência de UF).

Não foram encontrados na literatura relatos de outros autores abordando o efeito destes parâmetros sobre o perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de WPC. Portanto, os resultados aqui obtidos foram comparados com os anteriormente encontrados pela mesma equipe do presente trabalho.

3.3.1 Efeito do tipo de enzima

A Figura I.2 permite avaliar a influência do tipo de enzima sobre o perfil peptídico dos hidrolisados enzimáticos do WPC. Com o intuito de manter os demais parâmetros constantes, devem ser comparadas as seguintes amostras: H1 com H9, H3 com H11, H5 com H13, H7 com H15, H2 com H10, H4 com H12, H6 com H14 e H8 com H16. Em cada uma das partes A e B da Figura I.2, estão apresentados quatro destes grupos.

Observa-se nesta figura que, em termos de número de casos, a utilização da pancreatina foi mais vantajosa do que a papaína, tanto na ausência quanto na presença da UF. Na primeira situação, encontrou-se menor teor de grandes peptídeos em todos os casos, maior quantidade de di- e tripeptídeos em três casos (H11 com H3, H13 com H5 e H15 com H7), e maior conteúdo de aminoácidos livres em um caso (H11 com H3). Enquanto que, sob ação da papaína, também na ausência da UF, a única vantagem foi apresentar maior teor de aminoácidos livres em dois casos (H5 com H13, H7 com H15).

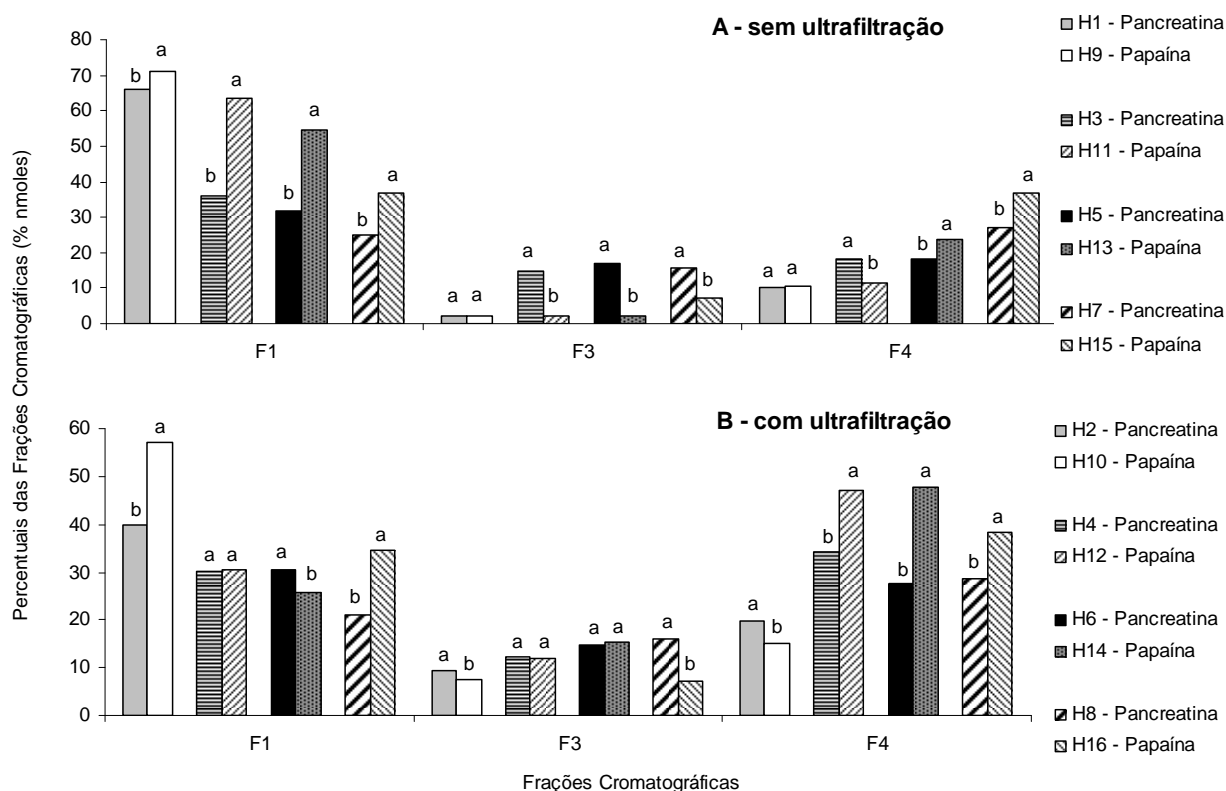


Figura I.2: Efeito do tipo de enzima sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite. Enzimas utilizadas: pancreatina (H1 a H8), papaína (H9 a H16). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos (2 e 3 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

A vantagem da pancreatina sobre a papaína, na situação em que se empregou a UF, pode ser observada na Figura I.2, tendo sido obtidos para alguns casos, menores quantidades de grandes peptídeos (H10 com H2, H16 com H8), maiores teores de di- e tripeptídeos (H10 com H2 e H16 com H8) e de aminoácidos livres (H10 com H2). Contudo, a ação da papaína foi mais favorável, em um número inferior de casos, levando a um menor conteúdo de grandes peptídeos (H6 com H14) e quantidade mais elevada de aminoácidos livres (H4 com H12, H6 com H14 e H8 com H16).

Ressalta-se, entretanto, que no cômputo geral a ação da papaína foi mais vantajosa do que a da pancreatina, pois levou à obtenção do melhor perfil peptídico, entre todos os hidrolisados analisados (H14).

Este resultado revela que nem sempre uma enzima de ação mais ampla, como é o caso da pancreatina que possui atividade de endo- e exopeptidase, produz o melhor

perfil peptídico. Tudo leva a crer que a ação mais restrita de uma enzima, como a papaína, que é uma endopeptidase, dependendo das condições empregadas no preparo de hidrolisados protéicos, pode ser mais vantajosa, levando à obtenção de teores mais elevados de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres.

A influência do tipo de enzima sobre o perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de soro de leite e de WPC, foi, anteriormente, avaliada em três estudos realizados no mesmo laboratório do presente estudo. Desta maneira, ao se utilizar a mesma pancreatina e uma subtilisina (Prozyn, São Paulo, SP) para hidrolisar soro de leite em pó, observou-se que os três melhores perfis peptídicos foram obtidos, também, pela pancreatina, apresentando, em média, teores de 22,63%, 10,30% e 40,97% para grandes peptídeos, di- e tripeptídeos e aminoácidos livres, respectivamente (SOUZA et al., 2008).

No segundo estudo, avaliou-se o efeito das enzimas citadas acima na hidrólise de WPC, e observou-se uma similaridade entre os perfis peptídicos obtidos pela ação destas enzimas. Assim, obtiveram-se teores de di- e tripeptídeos estatisticamente iguais (13,34% para subtilisina e 12,11%, em média, para pancreatina) e valores próximos de aminoácidos livres (45,56% para subtilisina e 49,06%, em média, para a pancreatina) e de grandes peptídeos (12,28% para subtilisina e 12,80%, em média, para a pancreatina), apesar de serem estatisticamente diferentes (AFONSO et al., 2008).

Em outro estudo, o emprego de diferentes enzimas proteolíticas na hidrólise de WPC, afetou de forma variada o perfil peptídico, sendo que o melhor resultado foi obtido pela ação da protease de *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme, AB Enzymes), apresentando teores de 18,76%, 16,43% e 18,43% para os grandes peptídeos, di- e tripeptídeos e aminoácidos livres, respectivamente (SILVA et al., 2010).

3.3.2 Efeito da relação enzima:substrato

A influência da relação E:S (0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100) no processo de hidrólise das proteínas do WPC pode ser avaliada na Figura I.3. Com o intuito de manter os demais parâmetros hidrolíticos constantes, a análise dos dados deve considerar quatro grupos contendo, cada um, quatro hidrolisados: grupo 1 (H1, H3, H5 e H7), grupo 2 (H2, H4, H6 e H8), grupo 3 (H9, H11, H13 e H15) e grupo 4 (H10, H12, H14 e H16). Em cada uma das partes A e B da Figura I.3, estão apresentados dois destes grupos.

Como pode ser observado na Figura I.3, a utilização de uma menor relação E:S foi vantajosa no caso da ação da pancreatina para alguns casos. Assim, na ausência da UF, obteve-se maior teor de di- e tripeptídeos, ao se passar de 3:100 para 2:100 (H7 e H5), enquanto que utilizando-se a UF encontrou-se uma quantidade mais elevada de aminoácidos livres, ao se passar de 2:100 para 1:100 (H6 e H4).

Com relação à ação da papaína, observa-se na Figura I.3 que a utilização de uma menor E:S foi benéfica, apenas quando se empregou a UF, tendo sido encontrados menores teores de grandes peptídeos e maior conteúdo de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres quando se passou de 3:100 para 2:100 (H16 e H14).

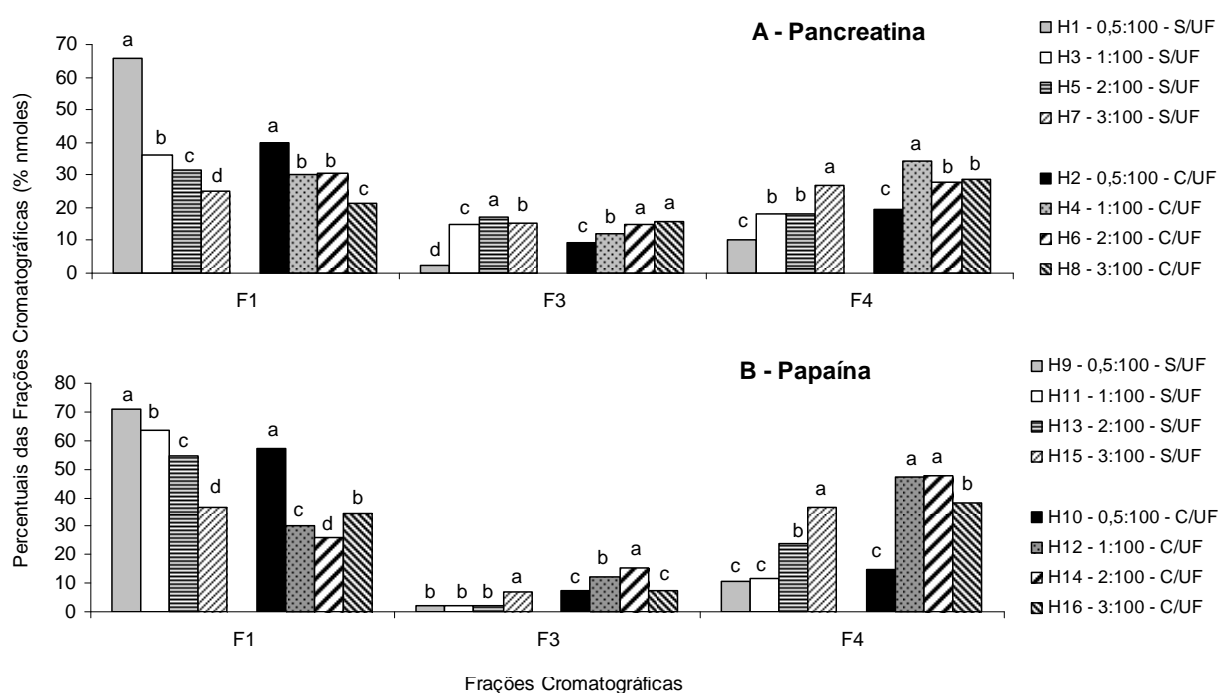


Figura I.3: Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite. Relações E:S utilizadas: 0,5:100 (H1, H2, H9 e H10), 1:100 (H3, H4, H11, H12), 2:100 (H5, H6, H13, H14) e 3:100 (H7, H8, H15, H16). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos (2 e 3 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. S/UF: sem ultrafiltração; C/UF: com ultrafiltração. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

O efeito benéfico da utilização de uma menor relação E:S sobre o perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de WPC já havia sido, anteriormente, demonstrado em dois estudos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho. Assim, ao se utilizar a mesma pancreatina, foi possível obter menor teor de grandes peptídeos e maior de aminoácidos livres, ao se passar de 4:100 para 2:100 (SILVA et al., 2010). Empregando-se uma subtilisina comercial com E:S de 1:100, 2:100 e 4:100, foi

mostrado, em alguns casos, a vantagem da utilização de menor valor ao se passar de 4:100 para 2:100, assim como de 2:100 para 1:100, tendo sido observada uma redução do teor de grandes peptídeos e um aumento da quantidade de aminoácidos livres (AFONSO et al., 2009).

3.3.3 Efeito da ultrafiltração

Para analisar o efeito da ultrafiltração sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos, devem ser comparadas as seguintes amostras: H1 com H2, H3 com H4, H5 com H6, H7 com H8, H9 com H10, H11 com H12, H13 com H14, H15 com H16, uma vez que os parâmetros tipo de enzima e relação E:S são mantidos constantes. Em cada uma das partes A e B da Figura I.4, estão apresentados quatro destes grupos.

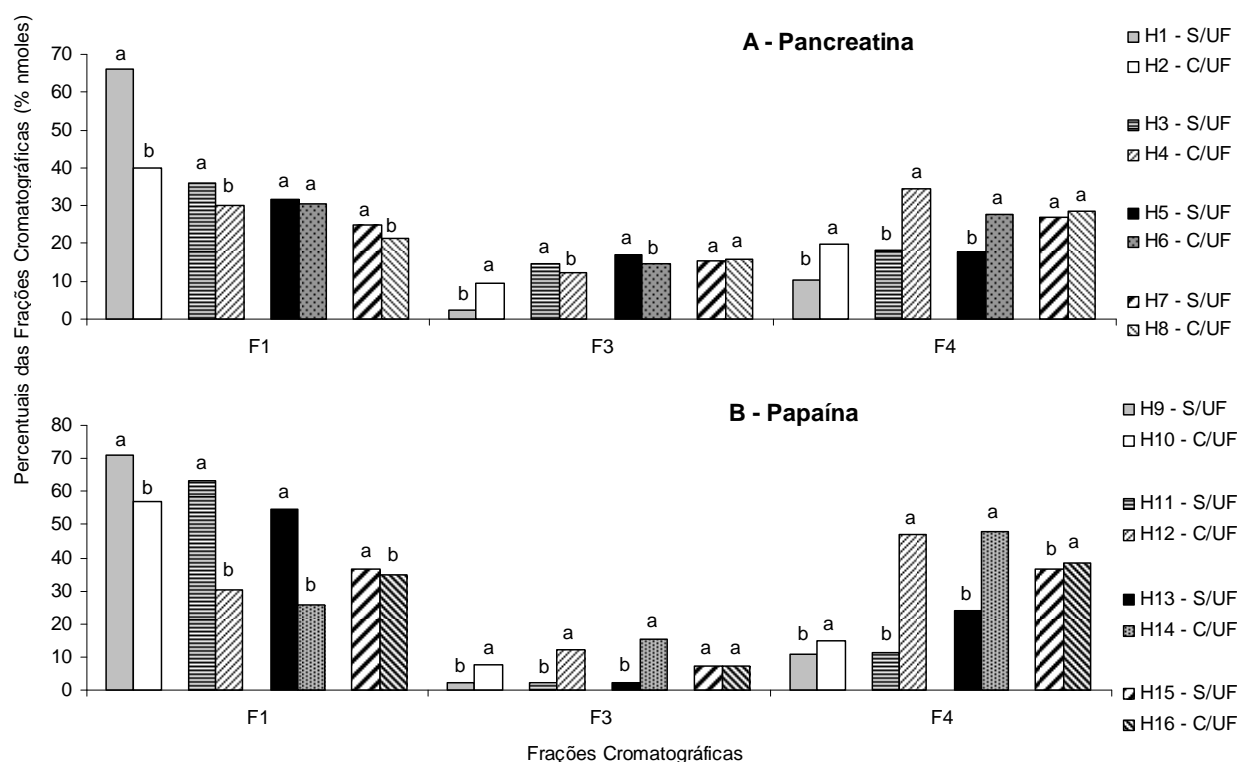


Figura I.4: Efeito da ultrafiltração sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite. Hidrolisados sem ultrafiltração (S/UF): H1, H3, H5, H7, H9, H11, H13 e H15. Hidrolisados com ultrafiltração (C/UF): H2, H4, H6, H8, H10, H12, H14, H16. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos (2 e 3 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. S/UF: sem ultrafiltração; C/UF: com ultrafiltração. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

Observa-se na figura I.4 que a ausência da ultrafiltração (UF) foi vantajosa para alguns casos, ao se empregar a pancreatina. Deste modo, obteve-se maior teor de di-

e tripeptídeos ao se comparar os hidrolisados H4 com H3 e o H6 com H5. Não foi observado o efeito benéfico da ausência da UF em termos de grandes peptídeos e de aminoácidos livres. Em relação à ação da papaína, não foi observada a vantagem da ausência da UF sobre o perfil peptídico dos hidrolisados enzimáticos de WPC.

Este parâmetro foi, igualmente, avaliado, anteriormente, neste mesmo laboratório, em hidrolisados de soro de leite em pó, utilizando uma pancreatina comercial (Sigma, St. Louis, MO, EUA), sendo que, ao contrário da pancreatina aqui utilizada, o efeito benéfico da ausência da UF não foi observado, pois sua ação não produziu maior quantidade das frações peptídicas mais desejadas (di- e tripeptídeos, aminoácidos livres), além de não reduzir os teores de grandes peptídeos, em relação às amostras para as quais se empregou a ultrafiltração (DELVIVO et al., 2005).

Deve-se considerar que na fabricação de hidrolisados protéicos, em larga escala, o emprego da UF elevaria o custo da produção por constituir uma etapa suplementar no processo. Por outro lado, as vantagens imunológicas e nutricionais da UF não podem ser negligenciadas, já que pode diminuir o poder alergênico destes preparados enzimáticos (VAN BERESTEIJN et al., 1994; EXL, 2001; CHANDRA, 2002), além de enriquecê-los em oligopeptídeos (VAN BERESTJEIN et al., 1994), visto que a membrana empregada, restringe a passagem de moléculas maiores que 10.000 Da.

4 CONCLUSÃO

O emprego da pancreatina e da papaína foi eficiente na obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite com perfil peptídico nutricionalmente adequado. O efeito dos parâmetros testados foi variado, sendo que o melhor perfil peptídico foi encontrado ao se empregar a papaína em uma E:S de 2:100, após a ultrafiltração, tendo sido obtidos 15,29% de di- e tripeptídeos, 47,83% de aminoácidos livres e 25,73% de grandes peptídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, W.O.; BIASUTTI, E.A.R.; CASTRO, V.M.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Utilização do soro de leite visando reduzir a poluição ambiental: hidrólise pela pancreatina. *Tecno-log.*, v. 12, n. 2, p. 7-16, 2008.
- AFONSO, W.O.; BIASUTTI, E.A.R.; GERALDI, L.M.; SILVA, V.D.M.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M.P.C. Use of enzymatic hydrolysis using subtilisin for increasing the nutritional value of whey. *Nutrire*, v. 34, n. 1, p. 97-114, 2009.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official methods of analysis*. 16. ed. 3. rev. Arlington: AOAC International, 1995. 1141 p.
- BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J. Sci. Food Agric.*, v. 84, n. 14, p. 1891-1900, 2004.
- BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado. *Rev. Cienc. Agrotec.*, v. 30, n. 2, p. 308-316, 2006.
- BRANS, G.; SCHROËN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M.; BOOM, R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J. Memb. Sci.*, v. 243, n. 1-2, p. 263-272, 2004.
- CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm. Bon.*, v. 23, n. 1, p. 17-25, 2004.
- CHANDRA, R.K. Breast feeding, hydrolysates formulas and delayed introduction of selected foods in the prevention of food hypersensitivity and allergic disease. *Nutr. Res.*, v. 22, p. 125-135, 2002.
- CHICÓN, R.; BELLOQUE, J.; ALONSO, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food hydrocoll.*, v. 23, n. 3, p. 593-599, 2009.
- DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso do carvão ativado para remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos, obtidos pela ação da papaína imobilizada. *Braz. J. Food Technol.*, v. 8, n. 3, p. 210-219, 2005.
- DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, H.A.; FIGUEIREDO, A.F.S.; AGUIAR, M.J.B.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Desenvolvimento de formulação dietética para fenilcetonúricos à base de hidrolisados de soro de leite. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, v. 20, n. 3, p. 117-126, 2005.

- DELVIVO, F.M.; VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *Am. J. Food Technol.*, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2006.
- EXL, B.M. A review of recent developments in the use of moderately hydrolyzed whey formulae in infant nutrition. *Nutr. Res.*, v. 21, p. 355-379, 2001.
- EMBRAPA, 2010. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em: 10 nov. 2010.
- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arq. Gastroenterol.*, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.
- GOLOVCHENKO, N.; KATAEVA, I.A.; AKIMENKO, V.K. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J. Chromatogr. A*, v. 591, n. 4, p.121-128, 1992.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.
- HINSBERGER, A.; SANDHU, B.K. Digestion and absorption. *Curr. Paediatr.*, v. 14, p. 605-611, 2004.
- ITO, S.; YOSHIOKA, S.; OGATA, I.; YAMASHITA, E.; NAGAI, S.; OKUMOTO, T.; ISHII, K.; ITO, M.; KAJI, H.; TAKAO, K.; DEGUCHI, K. Capillary high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap time-of-flight mass spectrometry using a novel nanoflow gradient generator. *J. Chromatogr. A*, v. 1090, p. 178-183, 2005.
- JE, J.-Y.; QIAN, Z.-J.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Proc. Biochem.*, v. 42, p. 840-846, 2007.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J.M.; GUILLOCHON, D.; AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J. Chromatogr.*, v. 32, n. 11/12, p. 499-504, 1991.
- LI-JUN, L.; CHUAN-HE, Z.; ZHENG, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food Bioprod. Process.*, v. 86, n. 1, p. 1-6, 2008.
- LOPES, D.C.F.; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.M.; AFONSO, W.O.; LOPES Jr., C.O.; SILVESTRE, M.P.C. Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins.. *J. Food Technol.*, v. 6, n. 2, p. 57-65, 2008.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Brit. Food J.*, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.

- MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, v. 34, n. 1, p. 59-69, 2005.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J. Food Comp. Anal.*, v. 13, p. 843-857, 2000.
- NIELSEN, S.S. *Food Analysis*. Gaithersburg: Aspen Publisher, 1998. 630 p.
- NOGUEIRA, R.; LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J. Chromatogr. A*, v. 1089, p. 158-169, 2005.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14. ed. Piracicaba: Livraria Nobel, 2000. 477 p.
- ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 44, n. 4, p. 563-575, 2008.
- SAINT-SAUVEUR, D.; GAUTHIER, S.F.; BOUTIN, Y.; MONTONI, A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *Intern. D. J.*, v. 18, p. 260–270, 2008.
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; AFONSO, W.O.; LOPES, D.C.F.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.; STARLING, A.L.P.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of lowphenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am. J. Food Technol.*, v. 2, n. 5, p. 327-341, 2007.
- SILVA, M.C.; SILVA, V.D.M.; LANA, A.M.Q.; SILVESTRE, M.P.C. Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de concentrado protéico do soro do leite. *Aliment. Nutr.*, 2010 (no prelo).
- SILVESTRE, M.P.C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 12, p. 2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M.P.C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 12, p. 2783-2789, 1994b.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm. Bon.*, v. 25, n. 3, p. 325-332, 2006.
- SOARES, R.D.L.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVESTRE, M.P.C. Enzyme catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotechnol.*, v. 21, p. 45-56, 2007.

- SOUZA, M.W.S.; BIASUTTI, E.A.R.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Obtaining oligopeptides from whey: use of subtilisin and pancreatin. *Am. J. Food Technol.*, v. 3, n. 5, p. 315-324, 2008.
- VAN BERESTEIJN, E.C.H.; PEETERS, R.A.; KAPER, J.; MEIJER, R.J.G.M.; ROBBEN, A.J.P.M.; SCHMIDT, D.G. Molecular mass distribution, immunological properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. *J. Food Prot.*, v. 57, p. 619-625, 1994.
- VISSER, S.; SLAGEN, C.J.; ROBBEN, A.J.P.M. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 599, p. 205-209, 1992.

Capítulo II

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DO CONCENTRADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE, OBTIDOS PELA AÇÃO DA PANCREATINA E DA PAPAÍNA

RESUMO

No presente estudo, vários parâmetros foram avaliados visando a obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite (WPC) com atividade inibitória (AI) da enzima conversora de angiotensina (ECA). Para isso, foram investigados o tipo de enzima (pancreatina e papaína), a relação enzima:substrato (0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100) e o emprego da ultrafiltração. A atividade inibitória da ECA do WPC foi observada somente após o tratamento enzimático, resultando em taxas de inibição na faixa de 17,29 a 91,88%. Dos dezesseis hidrolisados avaliados, sete apresentaram AI muito alta (>80%), indicando que poderiam ser utilizados como ingrediente na formulação de alimentos funcionais para a indústria alimentícia. Os hidrolisados obtidos pela ação da pancreatina apresentaram maior atividade inibitória da ECA, em comparação com a papaína, tanto na ausência quanto na presença da ultrafiltração. A utilização da menor relação E:S (0,5:100) foi benéfica para a pancreatina, ao passo que a ausência da ultrafiltração mostrou-se vantajosa apenas para a papaína, dando origem a hidrolisados com maior atividade inibitória da ECA em vários casos (E:S de 0,5:100, 1:100 e 2:100).

Palavras-chave: concentrado protéico do soro de leite; hidrolisados protéicos; condições hidrolíticas; papaína; pancreatina; enzima conversora de angiotensina.

ABSTRACT

***IN VITRO* EVALUATION OF INHIBITORY ACTIVITY OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME OF ENZYMATIC HYDROLYSATES FROM WHEY PROTEIN CONCENTRATE, OBTAINED BY ACTION OF PANCREATIN AND PAPAIN.**

In the present study several parameters were evaluated in order to obtain enzymatic hydrolysates from whey protein concentrate (WPC) with inhibition activity (IA) of the angiotensin-converting enzyme (ACE). For that, the type of enzyme (pancreatin and papain), the enzyme:substrate ratio (0.5:100, 1:100, 2:100 and 3:100), and the use of ultrafiltration were investigated. The inhibition activity of ACE was observed only after the enzymatic treatment, resulting in high rates of inhibition, ranging from 17.29 to 91.88%. Among the sixteen hydrolysates that were evaluated seven presented high IA (>80%), indicating that they could be used by food industries as ingredients in the manufacturing of functional foods. The hydrolysates obtained by pancreatin action showed higher IA of the ACE compared with papain, either in the absence or in the presence of ultrafiltration. The use of the smallest enzyme:substrate ratio (0.5:100) was beneficial for pancreatin, while the absence of ultrafiltration proved to be advantageous only for papain, giving rise to hydrolysates with higher ACE inhibition activity in several cases (enzyme:substrate ratio of 0.5:100, 1:100 and 2:100).

Keywords: whey protein concentrate; protein hydrolysates; hydrolytic conditions; papain; pancreatin; angiotensin-converting enzyme.

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) representa um sério problema de saúde pública e constitui um dos mais importantes fatores de risco para diversas doenças cardiovasculares. Além disso, é considerada uma doença, responsável, no Brasil e no mundo, por, aproximadamente, 40% das mortes por acidente vascular cerebral, 25% das mortes por doença arterial coronariana e, quando associada com diabetes, é responsável por 50% dos casos de insuficiência renal terminal (BRASIL, 2006).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) desempenha uma importante função na regulação da pressão arterial, catalisando a conversão da angiotensina I em um potente vasoconstritor, a angiotensina II. Além disso, a ECA inativa a bradicinina, um importante vasodilatador (GUYTON e HALL, 2006).

Vários autores têm demonstrado o efeito inibitório de peptídeos e hidrolisados protéicos sobre a ECA. Estes inibidores podem ser obtidos a partir da hidrólise enzimática de várias fontes protéicas, como leite e derivados (COSTA et al., 2007; JIANG et al., 2007; OTTE et al., 2007), pescado (RAGHAVAN e KRISTINSSON, 2009), cogumelo (LEE et al., 2004), canola (WU et al., 2009), mostarda (PEDROCHE et al., 2007), soja (CHA e PARK, 2005; KUBA et al., 2005; LI et al., 2005; LEE et al., 2008), feijão (TORRUCO-UCO et al., 2009), milho (KIM et al., 2004) e trigo (MA et al., 2006).

Estes peptídeos, denominados de bioativos, representam sequências de aminoácidos que se encontram inativas na proteína intacta, porém, após a hidrólise, tornam-se ativas, sendo capazes de exercer diversas atividades benéficas ao organismo, tais como: antitrombótica, anticariogênica, hipocolosterêmica, antimicrobiana, antioxidante, antiulcerogênica, anti-hipertensiva, opióide e imunoestimulante (HARTMANN e MEISEL, 2007).

Atualmente, grande destaque tem sido dado às proteínas do soro de leite devido ao seu elevado teor de aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 2004). Porém, seu uso, *in natura*, é limitado em virtude das características perecíveis do soro e à alta diluição dos seus componentes. O concentrado protéico do soro do leite (WPC) consiste em um produto originado da separação em membranas das proteínas do soro do leite, podendo apresentar de 35 a 80% de proteínas, sendo um ingrediente alimentar amplamente utilizado na indústria alimentícia em vários produtos, devido às excelentes propriedades funcionais destas proteínas (BRANS et al., 2004).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite com atividade inibitória sobre a ECA, avaliando-se o efeito de alguns parâmetros como tipo de enzima, relação E:S e o emprego da ultrafiltração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O concentrado protéico de soro de leite (WPC - *Whey Protein Concentrate*) na forma de pó com teor protéico de 34,23% (Kerrylac 750) foi doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). A pancreatina (Corolase PP), EC 3.4.21.4, atividade 34,71 U.mL⁻¹ e a papaína (Corolase L10), EC 3.4.22.2, atividade 31,56 U.mL⁻¹ foram doadas pela AB Enzymes® (Barueri, SP, Brasil). A enzima conversora de angiotensina (ECA) proveniente de pulmão de coelho, 0,25 unidades/mg proteína, EC 3.4.15.1, o hipuril-histidil-leucina (HHL) e o ácido hipúrico foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). O ácido trifluoroacético grau HPLC foi obtido da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil); a acetonitrila grau HPLC foi fornecida pela J. T. Backer (Phillipsburg, NJ, EUA); as membranas de fluoreto de polivinilideno para filtração das amostras (0,22 µm) e dos solventes (0,45 µm), assim como o sistema de fluxo tangencial com porosidade de corte para peso molecular de 10 KDa foram adquiridos da Millipore (São Paulo, SP, Brasil). Todos os demais reagentes empregados neste trabalho eram de grau analítico.

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (*Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography* – RP-HPLC), usado na avaliação da atividade inibitória da ECA dos hidrolisados protéicos era constituído por uma coluna cromatográfica GraceSmart RP-18, 150 x 4,6 mm, 5 µm e 120 Å (Grace Davison, Deerfield, IL, EUA), uma bomba quaternária e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP 1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPchemstation, Avondale, EUA). A água usada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, EUA).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparo dos hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite

Foram preparados dezesseis hidrolisados enzimáticos, variando-se os seguintes parâmetros: tipo de enzima, relação enzima:substrato (E:S) e o emprego da ultrafiltração. As condições empregadas no preparo destes hidrolisados estão apresentadas na Tabela II.1.

Tabela II.1 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite

Hidrolisados	Tipo de enzima	E:S	Ultrafiltração
H1	Pancreatina	0,5:100	Não
H2	Pancreatina	0,5:100	Sim
H3	Pancreatina	1:100	Não
H4	Pancreatina	1:100	Sim
H5	Pancreatina	2:100	Não
H6	Pancreatina	2:100	Sim
H7	Pancreatina	3:100	Não
H8	Pancreatina	3:100	Sim
H9	Papaína	0,5:100	Não
H10	Papaína	0,5:100	Sim
H11	Papaína	1:100	Não
H12	Papaína	1:100	Sim
H13	Papaína	2:100	Não
H14	Papaína	2:100	Sim
H15	Papaína	3:100	Não
H16	Papaína	3:100	Sim

E:S = relação enzima substrato.

As soluções a 10 g% (p/v) de concentrado protéico de soro de leite foram preparadas em água destilada, correspondendo a 3,42% de proteína, sendo o pH ajustado para 7,0 com solução de NaOH a 3 mol.L⁻¹. Posteriormente, foram aquecidas

em banho de vaselina, sob agitação constante em agitador magnético (modelo 752A, Fisatom, São Paulo, SP, Brasil), na temperatura ótima de cada enzima (50 °C ou 55 °C), seguida da adição de pancreatina ou papaína, respectivamente, para se obter a relação E:S desejada. O tempo total de hidrólise foi de 5 horas e, após este período, as enzimas foram inativadas por aquecimento em banho maria a 75 °C, por 15 segundos. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas (Freeze Dry System/FreeZone 4,5, model 77500, LABCONCO, Kansas City, MO, EUA) para a avaliação da atividade inibitória sobre a ECA.

2.2.2 Ultrafiltração dos hidrolisados protéicos

Algumas amostras dos hidrolisados protéicos (Tabela I.1) foram submetidas ao processo de ultrafiltração e diafiltração, utilizando uma quantidade de água equivalente a dez vezes o volume inicial. Para tal, empregou-se um sistema de fluxo tangencial com porosidade de corte para peso molecular de 10 KDa e uma bomba peristáltica. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas.

2.2.3 Avaliação *in vitro* da atividade inibitória dos hidrolisados protéicos sobre a ECA

A avaliação da atividade inibitória dos hidrolisados enzimáticos de WPC sobre a ECA foi realizada de acordo com o método desenvolvido por WU et al. (2002), empregando-se a RP-HPLC.

Inicialmente, um volume de 12,5 µL do substrato hipuril-histidil-leucina (HHL) (2,17 mM) foi misturado com 50 µL do hidrolisado de WPC (10 mg.mL⁻¹), ambos preparados em tampão borato a 100 mM, contendo solução de NaCl a 300 mM em pH 8,3, e a mistura foi incubada a 37 °C por 10 min. Um volume de 200 µL de ECA (4 mU), preparada no mesmo tampão, foi submetido a este mesmo tratamento. Em seguida, as duas soluções foram misturadas e, após incubação a 37 °C por 30 min, a reação foi interrompida pela adição de 125 µL de HCl (1 mol.L⁻¹). A mistura foi, então, filtrada em membrana de 0,22 µm para análise por RP-HPLC.

Posteriormente, as amostras foram analisadas em coluna GraceSmart RP-18, sendo o ácido hipúrico e o HHL detectados a 228 nm. A eluição ocorreu a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ com dois tipos de fase móvel, sendo uma composta por ácido

trifluoroacético a 0,05%, dissolvido em água deionizada, e a outra constituída por este mesmo ácido a 0,05% em acetonitrila, com gradiente de 5-60% para os 10 primeiros minutos de corrida, mantendo por 2 min a 60%, e retornando a 5% após 1 minuto. Seguiu-se, então, uma eluição isocrática por 4 min a um fluxo constante de 0,5 mL.min⁻¹.

A atividade inibitória sobre a ECA foi expressa de duas maneiras, ou seja, em percentual de inibição e como valor IC₅₀, definido como a concentração de hidrolisado (mg.mL⁻¹) necessária para reduzir a atividade desta enzima em 50%.

2.2.4 Avaliação do efeito de alguns parâmetros

O efeito de alguns parâmetros (tipo de enzima, relação E:S e ultrafiltração) sobre a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados enzimáticos de WPC foi avaliado. Assim, no preparo destes hidrolisados foram utilizadas duas enzimas (pancreatina e papaína) nas relações E:S de 0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100. Além disso, para cada um destes casos, as amostras foram ou não submetidas ao processo de ultrafiltração.

2.2.5 Análise estatística

Todos os experimentos e análises foram feitos em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e, para a avaliação das diferenças entre as médias dos valores de IC₅₀ e das atividades inibitórias dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite sobre a ECA, foi utilizado o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$) (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se na Tabela 2 que, dentre os dezesseis hidrolisados avaliados, sete apresentaram atividade inibitória (AI) da ECA que poderia ser considerada muito alta (>80%: H1, H2, H3, H5, H6, H7 e H8), e quatro que poderia ser classificada como alta (>70%: H4, H13, H14 e H16), quando comparados com as faixas de valores relatadas na literatura (OTTE et al., 2007). Além disso, três hidrolisados (H9, H11 e H15)

revelaram atividade inibitória moderada (40-60%) e, apenas duas amostras (H10 e H12) demonstraram possuir baixa capacidade para inibir a ECA (<20%).

Ressalta-se, ainda, que os maiores resultados para a atividade inibitória da ECA foram obtidos quando se empregou a pancreatina nas relações E:S de 0,5:100 (na presença ou ausência da UF) e de 3:100 (na presença da UF).

Cabe aqui relatar que nenhuma atividade inibitória da ECA foi encontrada para o WPC, indicando que o tratamento enzimático, o qual dá origem a moléculas de tamanhos menores, é necessário para a manifestação desta propriedade bioativa. Fato semelhante já havia sido relatado na literatura por alguns autores. Assim, MULLALLY et al. (1997) encontraram baixos valores de atividade inibitória da ECA para a α -lactalbumina (3,5%), WPC (7,1%) e β -lactoglobulina (9,6%), antes de se proceder a hidrólise por meio de várias enzimas proteolíticas. HERNÁNDEZ-LEDESMA et al. (2002) não citaram qualquer valor para a atividade inibitória da ECA da β -lactoglobulina intacta. JIANG et al. (2007) demonstraram que a caseína de leite de iaque não hidrolisada apresentou AI da ECA muito fraca (<5%). Mais recentemente, GUO et al. (2009) mostraram que para um grau de hidrólise nulo, não foi encontrada qualquer AI da ECA para o WPC.

Esta associação do tamanho dos peptídeos e a atividade inibitória já foi discutida por alguns autores. Assim, COSTA et al. (2007), demonstraram que esta propriedade é manifestada por peptídeos de baixa massa molecular, especialmente, pelos que possuem uma quantidade inferior a doze resíduos de aminoácidos. Ainda, de acordo com estes autores, mesmo quando a atividade inibitória está presente *in vitro*, pode não ocorrer a queda da pressão arterial *in vivo*, uma vez que o peptídeo deve ser absorvido intacto.

Este fato poderia indicar que hidrolisados com maior teor de di- e tripeptídeos poderiam ser mais benéficos em relação à esta propriedade bioativa, já que, como demonstrado por FHENHANI e BURINI (1999), a proteína alimentar é absorvida na forma destes pequenos peptídeos, além de aminoácidos livres. Na verdade, dentre os onze hidrolisados com atividades inibitórias consideradas muito alta e alta, nove apresentaram teores de di- e tripeptídeos (Capítulo I) situados nos patamares mais elevados. Por outro lado, dois hidrolisados (H1 e H13) fugiram à esta regra, tendo apresentado AI muito alta ou alta, mas com teores destes peptídeos muito baixos, em torno de 2%.

Esta correlação entre tamanho de peptídeos e atividade inibitória da ECA foi, igualmente, mencionada por OTTE et al. (2007) ao relatar que os peptídeos mais

potentes obtidos pela hidrólise enzimática da α -lactoalbumina e da β -caseína, apresentaram massas moleculares ao redor de 1000 Da e 2000 Da, respectivamente, demonstrando que mesmo peptídeos contendo acima de doze resíduos de aminoácidos poderiam apresentar atividade inibitória da ECA considerável.

Tabela II.2 – Atividade inibitória da ECA dos hidrolisados de WPC

Hidrolisados	Inibição sobre a ECA (%)	IC ₅₀
H1	91,88 ^a	0,10 ^k
H2	90,73 ^{ab}	0,10 ^{jk}
H3	81,14 ^{cd}	0,15 ^h
H4	79,28 ^{de}	0,16 ^{gh}
H5	82,86 ^c	0,13 ⁱ
H6	88,35 ^b	0,12 ^j
H7	80,74 ^{cd}	0,15 ^h
H8	89,96 ^{ab}	0,11 ^{jk}
H9	44,15 ⁱ	0,35 ^b
H10	17,92 ^j	0,48 ^a
H11	50,46 ^h	0,32 ^c
H12	17,29 ^j	0,50 ^a
H13	78,17 ^{de}	0,18 ^{fg}
H14	72,76 ^f	0,20 ^e
H15	62,33 ^g	0,26 ^d
H16	76,86 ^e	0,18 ^f

WPC= Concentrado protéico do soro de leite; ECA: enzima conversora de angiotensina. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan, na mesma coluna.

Considerando que apenas dois trabalhos sobre atividade inibitória da ECA de hidrolisados enzimáticos de WPC foram encontrados na literatura, os resultados aqui obtidos foram, também, comparados com os relatados para os hidrolisados de outras proteínas lácteas. Com relação ao WPC, MULLALLY et al. (1997), empregando cinco diferentes proteases, obtiveram hidrolisados cuja AI variou de 60,8 a 88,6%, valores estes próximos aos encontrados para alguns hidrolisados no presente estudo.

GUO et al. (2009) empregaram apenas uma enzima para hidrolisar o WPC (protease do *L. helveticus*), variando-se a temperatura, o pH, a relação enzima:substrato e o tempo de reação, tendo obtido hidrolisados cuja atividade

inibitória da ECA variou de 15 a 63%, valores estes que estão próximos dos cinco hidrolisados do presente estudo, que apresentaram AI moderada ou baixa.

Quando o substrato protéico utilizado foi a β -lactoglobulina, dois trabalhos foram encontrados na literatura, nos quais várias proteases foram empregadas na reação hidrolítica. Assim, MULLALLY et al. (1997) relataram valores que variaram de 63,4 a 89,8%, enquanto que as condições de hidrólise empregadas por HERNÁNDEZ-LEDESMA et al. (2002) deram origem a hidrolisados com AI variando de 27 a 91%. A hidrólise da α -lactoalbumina por diversas proteases, possibilitou a MULLALLY et al. (1997) a obtenção de hidrolisados cujos valores de AI variaram de 56,8 a 87,1%.

No caso de hidrolisados enzimáticos da caseína, dois trabalhos foram encontrados na literatura. No primeiro, foi utilizada uma associação sucessiva da pepsina com a tripsina para a hidrólise protéica, tendo levado a uma AI de 86%, que se encontra próxima aos maiores valores obtidos no presente trabalho (PIHLANTO-LEPPALA et al., 1998). Utilizando várias proteases para o preparo de hidrolisados de caseína, JIANG et al. (2007) conseguiram resultados de inibição da ECA que variaram de 40 a 80%, faixa esta que coincide com a maioria dos dados encontrados para as amostras aqui analisadas.

O soro de leite foi utilizado por PIHLANTO-LEPPALA et al. (1998), como substrato protéico para ação da pepsina em associação sucessiva com a tripsina, tendo sido obtidos três hidrolisados com AI de 50, 57 e 61%, valores estes inferiores à maioria dos encontrados para as amostras analisadas no presente estudo.

Ao utilizar o WPI como fonte protéica e a alcalase, a quimotripsina e o Proteomix, para a hidrólise enzimática, COSTA et al. (2007) obtiveram valores de IC_{50} de 0,73, 0,40 e 0,89, respectivamente, podendo-se concluir que apenas a ação da quimotripsina deu origem a hidrolisado protéico com capacidade de inibir a ECA próxima à obtida no presente estudo, quando se utilizou a papaína (0,35 = H9 e 0,48 = H10). As outras duas enzimas empregadas por estes autores produziram hidrolisados protéicos bem mais potentes dos que aqui foram obtidos.

3.1 EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS NA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A ECA

O efeito do tipo de enzima, da relação enzima:substrato (E:S) e do emprego da ultrafiltração (UF) foi avaliado sob dois diferentes aspectos: obtenção de hidrolisados

com maior atividade inibitória sobre a ECA e redução de custos do processo para adaptação em larga escala (utilização de menor E:S e ausência de UF).

3.1.1 Efeito do tipo de enzima

A influência deste parâmetro sobre a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados protéicos pode ser observada na Figura II.1. Com o intuito de manter os demais parâmetros constantes, a análise dos dados deve considerar oito grupos, sendo quatro para cada tipo de tratamento: sem ultrafiltração e com ultrafiltração, e valores de E:S de 0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100. Em cada uma das partes A e B da Figura II.1, estão apresentados quatro destes grupos.

Constata-se nesta figura que a utilização da pancreatina foi mais vantajosa do que a da papaína para todos os casos, sendo este efeito mais evidente quando se empregou os menores valores de E:S (0,5:100 e 1:100) e o tratamento pela ultrafiltração.

A escolha da enzima para a hidrólise protéica pode afetar a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados obtidos, uma vez que a presença de determinados aminoácidos na porção C- ou N-terminal influenciam esta propriedade (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2002; COSTA et al., 2007). Desta forma, sabe-se que os inibidores mais potentes consistem nos peptídeos que contêm na porção N-terminal resíduos de aminoácidos dicarboxílicos ou aminoácidos ramificados, como valina e isoleucina. Além disso, é desejável a presença de aminoácidos hidrofóbicos, como triptofano, tirosina, fenilalanina ou da prolina, na porção C-terminal (COSTA et al., 2007).

Estes relatos explicam, pelo menos em parte, o melhor desempenho da pancreatina, em comparação com a papaína, uma vez que a ação da quimotripsina, uma das enzimas presentes nesse complexo enzimático, está associada à quebra de ligações peptídicas na posição C-terminal dos aminoácidos aromáticos, liberando, assim, peptídeos com atividade inibitória da ECA. Por outro lado, a papaína é uma endopeptidase e atua na clivagem de substratos contendo resíduos de aminoácidos de lisina, arginina ou valina, dando origem a peptídeos menos potentes (BEYNON e BOND, 2001).

A influência do tipo de enzima sobre a atividade inibitória da ECA de hidrolisados protéicos foi, anteriormente, estudada por outros autores. Considerando que apenas um trabalho utilizou o WPC, os resultados aqui obtidos foram comparados com os de outras fontes protéicas de origem láctea. No que se refere ao WPC, MULLALLY et al.

(1997) avaliaram o efeito de cinco enzimas, tendo mostrado que as mais eficientes foram a tripsina (88,6%), e a quimotripsina (87,7%), seguidas pela corolase PP (78,2%) que é uma pancreatina, PTN 3.0S (60,8%) e, por último, a elastase (35,5%). Segundo estes autores, a PTN refere-se a uma preparação enzimática comercial enriquecida com tripsina.

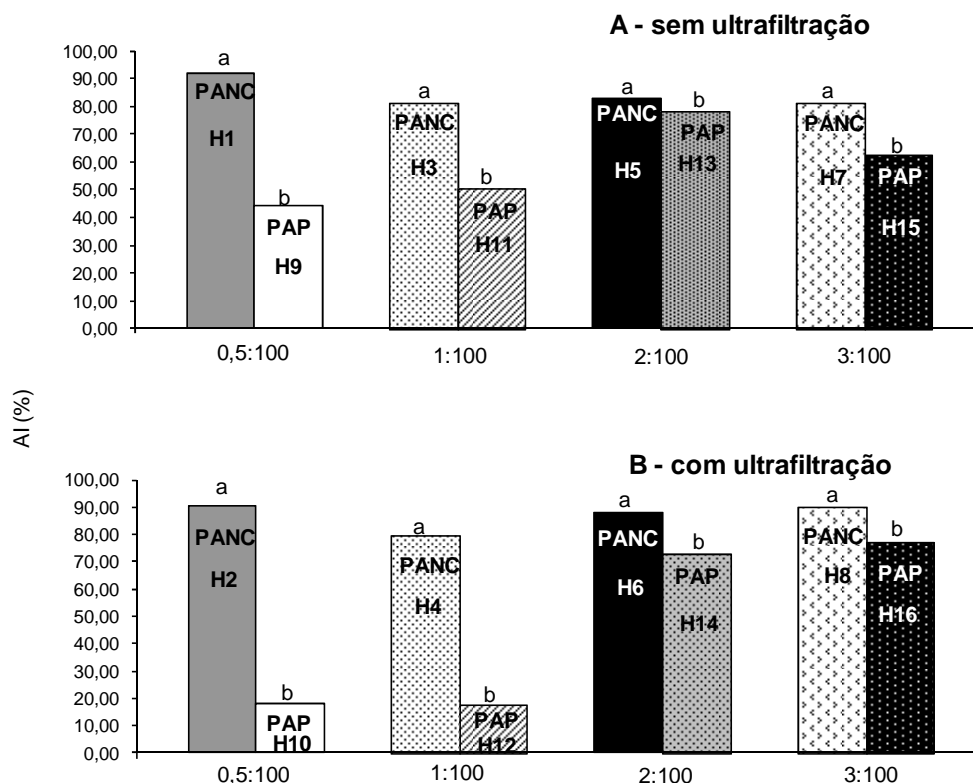


Figura II.1: Efeito do tipo de enzima sobre a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite. PANC = pancreatina; PAP = papaína. Valores de relação enzima:substrato = 0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de um mesmo grupo para os diferentes hidrolisados.

Estas mesmas enzimas, além da pepsina que atuou isoladamente ou em associação com a tripsina, foram utilizadas por estes autores para hidrolisar a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina. Em ambos os casos, os maiores valores de atividade inibitória (87,7% e 89,8%, respectivamente) foram obtidos pela ação em conjunto destas duas enzimas, principalmente quando a adição da tripsina precedeu a da pepsina. Da mesma maneira, para ambas as proteínas, a ação da elastase foi a menos eficiente, dando origem a hidrolisados protéicos com AI de 56,8 e 63,4%, respectivamente. As explicações dos autores para estes resultados estão associadas a dois pontos principais. O primeiro refere-se ao fato de que a elastase possui ampla especificidade e hidrolisa ligações peptídicas envolvendo grupos carboxila de

aminoácidos com cadeias laterais não carregadas, ou seja, alanina, valina, leucina, isoleucina, glicina e serina. O segundo ponto procura explicar a razão da hidrólise pela corolase PP ter originado hidrolisados com AI inferior aos obtidos pela ação da PTN, da tripsina e da pepsina, pelo fato de que a corolase possui atividade de elastase, a qual está ausente nas demais enzimas testadas.

A utilização de quatro enzimas (tripsina, quimotripsina, proteinase K e termolisina) para a hidrólise da β -lactoglobulina, revelou que a termolisina foi a mais eficiente e a quimotripsina a menos favorável na obtenção de hidrolisados protéicos com atividade inibitória da ECA (91 e 27%, respectivamente). Entretanto, os autores não apresentaram justificativas para os resultados obtidos (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2002). COSTA et al. (2007), avaliando o efeito das enzimas alcalase, quimotripsina e proteomix na atividade inibitória da ECA de hidrolisados enzimáticos de WPI, observaram que o melhor resultado foi obtido pela quimotripsina, apresentando IC_{50} de $0,40 \text{ mg.mL}^{-1}$, devido à liberação de aminoácidos aromáticos na posição C-terminal.

Em outro estudo, o emprego de seis enzimas proteolíticas (alcalase, flavourzima, neutrase, papaína, pepsina e tripsina) afetou de forma variada a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados de caseína, proveniente do leite de iaque, sendo que o melhor resultado foi obtido pela ação da neutrase e da papaína, apresentando valores em torno de 80%, que não foram explicados pelos autores (JIANG et al., 2007).

3.1.2 Efeito da relação enzima:substrato

A Figura II.2 permite avaliar a influência da relação E:S (0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100) sobre a atividade inibitória da ECA de hidrolisados enzimáticos de WPC. Com o intuito de manter os demais parâmetros constantes, a análise dos dados deve considerar quatro grupos, sendo dois para cada enzima, pancreatina e papaína, na ausência e na presença da ultrafiltração. Em cada uma das partes A e B da Figura II.2, estão apresentados dois destes grupos.

Observa-se nesta figura que, para a pancreatina na ausência da UF, a AI decresceu bastante ao se passar de 0,5:100 para 1:100, mantendo-se constante a partir daí até a E:S de 3:100. Por outro lado, na presença da UF, a atividade inibitória apresentou uma queda acentuada ao se passar de 0,5:100 para 1:100, mas elevou-se ao patamar inicial para os valores de E:S de 2:100 e 3:100.

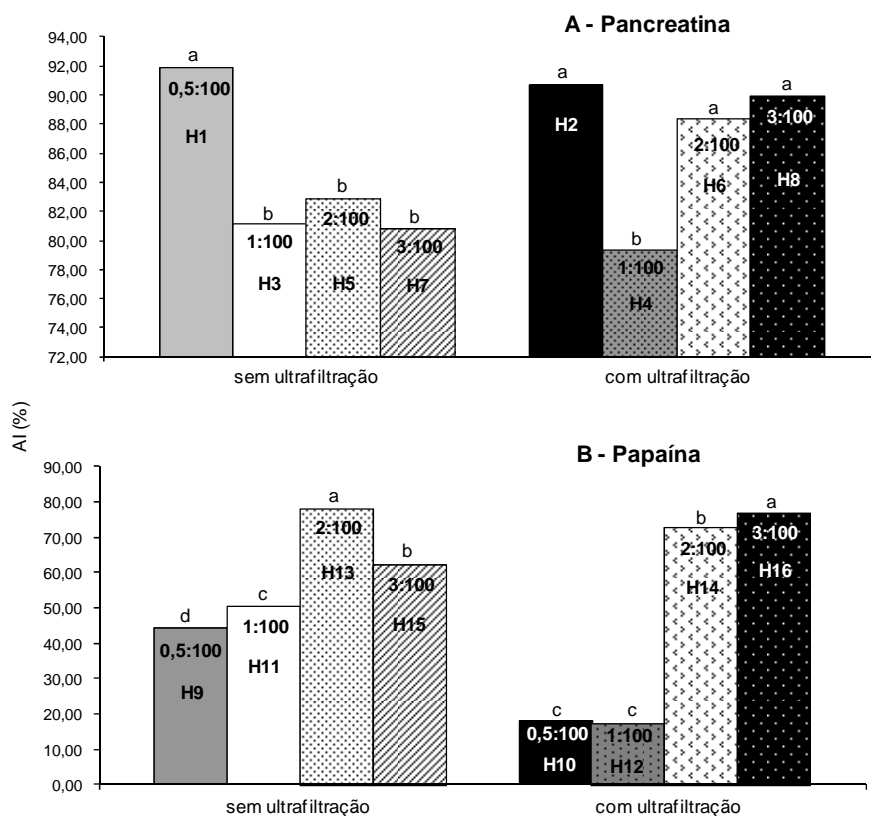


Figura II.2: Efeito da relação E:S sobre a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite. Relações E:S utilizadas: 0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de um mesmo grupo para os diferentes hidrolisados.

No caso da papaína, na ausência da UF, a atividade inibitória cresceu ao se passar de 0,5:100 para 1:100 e para 2:100, onde atingiu o seu máximo, tendo decaído após este ponto quando a E:S foi de 3:100. Com o emprego da UF, a AI não se alterou ao se passar de 0,5:100 para 1:100, tendo, entretanto, apresentado uma elevação acentuada ao se passar de 1:100 para 2:100, e crescido um pouco mais para a E:S de 3:100, onde atingiu o seu máximo. Estes resultados revelam a vantagem, do ponto de vista de custos, da utilização da pancreatina sobre a papaína, pois o emprego da menor E:S (0,5:100) permitiu obter hidrolisados enzimáticos de WPC dentre as mais elevadas atividades inibitórias da ECA, tanto na ausência quanto na presença de UF.

O fato de que, em alguns casos, o emprego de uma menor relação E:S possa levar à obtenção de hidrolisados com maior atividade inibitória da ECA, poderia estar relacionado à existência de uma condição ótima de hidrólise, fora da qual poderia ocorrer maior degradação do que formação de peptídeos inibidores da ECA, diminuindo assim a atividade inibitória (RAGHAVAN e KRISTINSSON, 2009).

No único trabalho encontrado na literatura onde se estudou o efeito da relação E:S sobre a atividade inibitória da ECA de hidrolisados protéicos, GUO et al. (2009) mostraram que na ação de uma protease do *Lactobacillus helveticus* sobre o WPC, a AI cresceu ao se passar a E:S de 0,2:100 até 0,8:100, quando atingiu o seu valor máximo (63%), mantendo-se inalterada a partir daí até E:S de 1,2:100.

3.1.3 Efeito da ultrafiltração

O efeito da ultrafiltração na atividade inibitória da ECA dos hidrolisados protéicos, pode ser avaliado na Figura II.3. Objetivando manter os demais parâmetros constantes, a análise dos dados deve considerar oito grupos, sendo quatro para cada tipo de enzima, pancreatina e papaína, e relações E:S de 0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100. Em cada uma das partes A e B da Figura II.3, estão apresentados quatro destes grupos.

Como pode ser observado nesta figura, a ausência da ultrafiltração (UF) não foi vantajosa em relação ao emprego deste processo ao se empregar a pancreatina, em nenhum dos casos estudados, pois produziu hidrolisados protéicos com menor AI do que na presença da UF (E:S de 2:100 e de 3:100) ou, na melhor das hipóteses, não foram reveladas diferenças significativas entre os valores de AI, para os dois tipos de tratamento testados (E:S de 0,5:100 e de 1:100). Por outro lado, quando se utilizou a papaína, a ausência da UF produziu hidrolisados com maior AI do que na presença da UF em três casos (E:S de 0,5:100, 1:100 e 2:100). Apenas em um caso (E:S de 2:100), esta situação se inverteu. Ao contrário do observado no estudo do efeito da relação E:S, os resultados aqui obtidos indicam a vantagem da utilização da papaína sobre a pancreatina, em termos de redução de custos para aplicação do processo em larga escala.

A obtenção de maior AI na ausência da UF poderia ser, provavelmente, explicada por dois fatos. Em primeiro lugar, de acordo com a afirmativa de RAGHAVAN e KRISTINSSON (2009), para justificar seus resultados obtidos com hidrolisados de isolados protéicos de tilápia, no hidrolisado integral (não submetido a qualquer processo de separação de peptídeos) ocorre uma ação sinérgica entre todos os peptídeos que estão presentes juntos nesta amostra. Além disso, dependendo das condições empregadas, o processo de UF poderia reter peptídeos, cuja estrutura (presença de aminoácidos aromáticos ou da prolina na porção C-terminal) favorece a atividade inibitória da ECA.

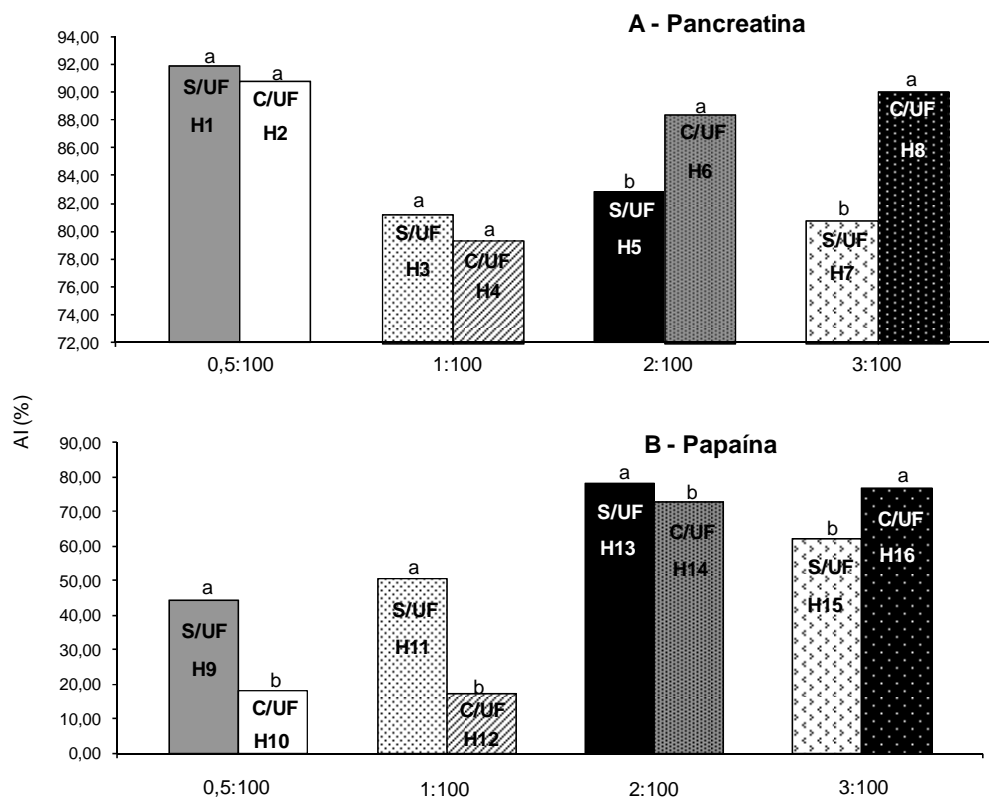


Figura II.3: Efeito da ultrafiltração sobre a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite. S/UF= sem ultrafiltração; C/UF = com ultrafiltração; valores de E:S utilizados: 0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de mesmo grupo para diferentes hidrolisados.

Apenas dois trabalhos foram encontrados na literatura, abordando o estudo da influência da ultrafiltração sobre a atividade inibitória da ECA de hidrolisados enzimáticos de proteínas lácteas. No primeiro, duas fontes protéicas foram escolhidas por MULLALLY et al. (1997), o WPC e a β -lactoglobulina, para serem hidrolisadas pela tripsina e submetidas, posteriormente, ao processo de ultrafiltração. Assim, estes autores demonstraram que o emprego de membrana com ponto de corte de 10 KDa, não alterou ou reduziu a atividade inibitória da ECA, para os hidrolisados de WPC e de β -lactoglobulina, respectivamente. Portanto, pode-se concluir que a ausência da UF foi benéfica apenas para esta segunda proteína, não tendo afetado a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados de WPC, como ocorreu ao se empregar a pancreatina para hidrolisar este concentrado protéico.

No trabalho de JIANG et al. (2007), uma neutrase foi utilizada para hidrolisar a caseína de leite de iaque, procedendo, em seguida, à ultrafiltração em membrana com ponto de corte de 10 KDa. O resultado obtido revelou que este processo não afetou a atividade inibitória da ECA, a qual foi semelhante à do hidrolisado não submetido à UF.

O conjunto destes resultados indica que, embora a ultrafiltração seja considerada por alguns autores como um método de enriquecimento de hidrolisados protéicos com peptídeos portadores de atividade inibitória da ECA (JIANG et al. 2007), nem sempre esta afirmativa é confirmada e, dependendo das condições empregadas, especialmente no preparo dos hidrolisados protéicos, a ausência deste processo pode favorecer esta propriedade, o que seria uma vantagem, em termos de custo, para aplicação em larga escala.

4 CONCLUSÃO

Os hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite apresentaram, em geral, elevada capacidade em inibir a ECA. O tipo de enzima, a relação E:S e o emprego da ultrafiltração (UF) afetaram esta propriedade, sendo que os maiores resultados para a atividade inibitória da ECA foram obtidos quando se empregou a pancreatina nas relações E:S de 0,5:100 (na presença ou ausência da UF) e de 3:100 (na presença da UF).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEYNON, R.; BOND, J.S. *Proteolytic Enzymes*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. 340 p.
- BRANS, G.; SCHROËN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M.; BOOM, R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J. Memb. Sci.*, v. 243, n. 1-2, p. 263-272, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *V Diretrizes Brasileira de Hipertensão*. São Paulo: MS, 2006. 50 p.
- CHA, M.; PARK, J.R. Production and characterization of a soy protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysates. *J. Med. Food*, v. 8, n. 3, p. 305-310, 2005.
- COSTA, E.L.; GONTIJO, J.A.R.; NETTO, F.M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *Int. Dairy J.*, v. 17, p. 632-640, 2007.
- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arq. Gastroenterol.*, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.
- GUO, Y.; PAN, D.; TANOKURA, M. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chem.*, v. 114, p. 328-333, 2009.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, 1115 p.
- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 18, p. 163-169, 2007.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; RAMOS, M.; AMIGO, L. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.*, v. 12, p. 805-812, 2002.
- JIANG, J.; CHEN, S.; REN, F.; LUO, Z.; ZENG, S.S. Yak Milk Casein as a functional ingredient: Preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *J. Dairy Res.*, v. 74, p. 18-25, 2007.
- KIM, J.M.; WHANG, J.H.; SUH, H.J. Enhancement of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and improvement of the emulsifying and foaming properties of corn gluten hydrolysate using ultrafiltration membranes. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 218, p. 133-138, 2004.

- KUBA, M.; TANA, C.; TAWATA, S.; YASUDA, M. Production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. *Process Biochem.*, v. 40, p. 2191-2196, 2005.
- LEE, D.H.; KIMA, J.H.; Park, J.S.; CHOI, Y.J.; LEE, J.S. Isolation and characterization of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides*, v. 25, p. 621-627, 2004.
- LEE, J.-S.; YOO, M.A.; KOO, S.H.; BAEK, H.-H.; LEE, H.G. Antioxidant and ACE inhibitory activities of soybean hydrolysates: effect of enzyme and degree of hydrolysis. *Food Sci. Biotechnol.*, v. 17, n. 4, p. 873-877, 2008.
- LI, G.H.; LE, G.W.; LIU, H.; SHI, Y.H. Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Sci. Technol. Int.*, v. 11, n. 4, p. 281-287, 2005.
- MA, Min-Suk; BAE, I.Y.; LEE, H.G.; YANG, C.-B. Purification and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Food Chem.*, v. 96, p. 36-42, 2006.
- MULLALLY, M.M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R.J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int. Dairy J.*, v. 7, p. 299-303, 1997.
- OTTE, J.; SHALABY, S.M.A.; ZAKORA, M.; NIELSEN, M.S. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *Int. Dairy J.*, v. 17, p. 1460-1472, 2007.
- PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; LQARI, H.; MEGIAS, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; MILLÁN, F. Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. *Food Res. Int.*, v. 40, p. 931-938, 2007.
- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; ROKKA, T.; KORHONEN, H. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int. Dairy J.*, v. 8, p. 325-331, 1998.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14. ed. Piracicaba: Livraria Nobel, 2000. 477 p.
- RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H.G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chem.*, v. 117, p. 582-588, 2009.
- SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev. Nutr.*, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.
- TORRUCO-UCO, J.; CHEL-GUERRERO, L.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; BETANCUR-ANCONA, D. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *Food Sci. Technol.*, v. 42, p. 1597-1604, 2009.

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

WU, J.; ALUKO, R.E.; MUIR, A.D. Production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from defatted canola meal. *Bioresour. Technol.*, v. 100, p. 5283-5287, 2009.